

Funktion von Microcephalin, Pericentrin und Checkpoint Kinase 1 in den zentrosomalen Mechanismen der Mitoseregulation

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades des

Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

eingereicht am Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie

der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Alexandra Tibelius

aus Pewek/Russland

2009

Die vorliegende Arbeit wurde im Zeitraum Dezember 2006 bis Oktober 2009 im Labor von Prof. Dr. Alwin Krämer am Deutschen Krebsforschungszentrum in Heidelberg angefertigt.

Erstgutachter: Prof. Dr. Klaus Hausmann

Zweitgutachter: Prof. Dr. Alwin Krämer

Disputation am: 16.12.2009

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung.....	1
1.1.	Zentrosomen: Struktur und Funktion	1
1.2.	Zentrosomen und Zellzyklusregulation.....	3
1.3.	Zentrosomenzyklus.....	6
1.4.	Zentrosomen und genotoxischer Stress.....	8
1.5.	Zentrosomen in der Pathogenese humaner Erkrankungen	10
1.5.1.	Primäre Mikrozephalie und MCPH1.....	11
1.5.2.	MOPD II, Seckel-Syndrom und Pericentrin.....	16
1.6.	Zielsetzung der Arbeit	20
2.	Material und Methoden.....	21
2.1.	Material	21
2.1.1.	Bakterienstämme	21
2.1.2.	Zelllinien	21
2.1.3.	Hefestämme.....	22
2.1.4.	Expressionskonstrukte.....	22
2.1.5.	Oligonukleotide	23
2.1.6.	Antikörper	25
2.1.7.	Enzyme und Reaktionskits.....	27
2.1.8.	Molekulargewichtsstandards.....	28
2.1.9.	Medien und Lösungen.....	28
2.1.10.	Chemikalien und Verbrauchsmaterialien	32
2.1.11.	Detergenzien	33
2.1.12.	Geräte	33
2.1.13.	Software	35
2.2.	Methoden.....	35
2.2.1.	Molekularbiologische Methoden.....	35
2.2.2.	Zellbiologische Methoden	40

2.2.3. Proteinchemische Methoden.....	46
2.2.4. Arbeiten mit <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	50
3. Ergebnisse.....	54
3.1. Chk1-Delokalisation von Zentrosomen in MCPH1- und PCNT- defizienten Zellen.....	54
3.2. MCPH1 lokalisiert an Zentrosomen in humanen Interphasezellen.....	59
3.3. MCPH1 interagiert mit Chk1 <i>in vivo</i>	60
3.4. Chk1-Depletion hat keinen Einfluss auf die zelluläre Lokalisation von MCPH1	61
3.5. Reduktion von zentrosomalem PCNT in MCPH1-defizienten Zellen.....	62
3.6. MCPH1 interagiert mit PCNT <i>in vivo</i>	67
3.7. PCNT interagiert mit Chk1 <i>in vivo</i>	68
3.8. Die zentrosomale Lokalisation von PCNT ist unabhängig von Chk1	69
3.9. Chk1, PCNT und GFP-MCPH1 liegen in einem Proteinkomplex vor	70
3.10. Vorzeitige Aktivierung des Cyclin B/Cdk1-Komplexes in MCPH1- und PCNT-defizienten Zellen	71
3.10.1. Zentrosomale Delokalisation von Chk1 führt zur vorzeitigen Aktivierung von zentrosomen-assoziiertem Cdc25B und Cdk1.....	71
3.10.2. Die Depletion von zentrosomalem Chk1 induziert einen vorzeitigen Eintritt in die Mitose in MCPH1- und PCNT- defizienten Zellen	74
3.11. MCPH1- und PCNT-defiziente Lymphoblasten weisen keinen Defekt im Intra-S-Phase-Checkpoint auf.....	78
3.12. Vorzeitige Chromosomenkondensation in MCPH1-defizienten Zellen wird verstärkt durch Chk1-Immobilisierung am Zentrosom.....	79
3.13. Identifikation neuer Interaktionspartner von MCPH1	82
3.13.1. <i>Yeast-Two-Hybrid-Screen</i>	82
3.13.2. Vorläufige Charakterisierung eines potentiellen MCPH1-Interaktionspartners	85
4. Diskussion	89
4.1. Zentrosomale Chk1-Lokalisation in Abhängigkeit von MCPH1 und PCNT	91
4.1.1. Chk1 und MCPH1 - Komponenten eines Signalnetzwerks?.....	91

4.1.2. Chk1-MCPH1-Interaktion	93
4.1.3. Pericentrin.....	95
4.1.4. Strukturelle Aspekte der MCPH1-Chk1-PCNT-Interaktion	98
4.2. Funktionelle Aspekte der MCPH1-Chk1-PCNT-Interaktion	101
4.3. Der PCC-Phänotyp der MCPH1-defizienten Zellen.....	103
4.4. Ausblick	104
5. Zusammenfassung	107
6. Summary.....	109
7. Literaturverzeichnis	111
8. Anhang.....	121
8.1. Abkürzungsverzeichnis.....	121
8.2. Abbildungsverzeichnis	124
8.3. Tabellenverzeichnis	126
8.4. Veröffentlichungen.....	127
Lebenslauf.....	Fehler! Textmarke nicht definiert.
Danksagung	129

1. Einleitung

Als Édouard van Beneden 1876 die Anatomie und Entwicklung der parasitären *Dicyemella* aus der Tiergruppe der Rhombozoa beschrieb, waren ihm an den Polen der sich teilenden Zellen Strukturen aufgefallen, die er nicht näher definieren konnte und sie als „*polar corpuscle*“ bezeichnet hat (Van Beneden, 1876). 1887 und 1888 führte Theodor Boveri in seinen Arbeiten zu Fertilisations- und Teilungsprozessen bei Pferdespulwürmern (Ascariden) die Begriffe „Zentrosom“ und „Zentriole“ ein und beschrieb das Zentrosom als eine Zellorganelle, die für die Zellteilung notwendig ist und eine Fähigkeit zur Selbstreplikation besitzt (Boveri, 1887; Boveri, 1888). Boveri gilt als Pionier auf dem Gebiet der Zentrosomenforschung, weil er in seinen Arbeiten nicht nur die Bedeutung der Zentrosomen für die Zellteilungsprozesse sondern auch eine Korrelation zwischen zentrosomalen Aberrationen und der Entstehung von Krebs erkannt hat (Boveri, 1914).

Erst mit der Entwicklung und Anwendung immunologischer und molekularer Methoden erlebte die Zentrosomenforschung einen Aufschwung. Die modernen Techniken wie z.B. RNA-Interferenz, reverse Genetik, konfokale Mikroskopie und Expression von GFP-getaggten Fusionsproteinen machten es möglich, tiefgreifendere Erkenntnisse zur zentrosomalen Struktur, Funktion und Regulation zu gewinnen. Krebserkrankungen, aber auch zahlreiche anderen Erkrankungen konnten direkt oder indirekt mit zentrosomaler Dysfunktion in Verbindung gebracht werden, wodurch die Zentrosomen eine große Beachtung im Bereich der zellbiologischen und medizinischen Forschung fanden.

Der Fokus dieser Arbeit liegt auf zellulären Prozessen, die während eines Zellzyklus partiell am Zentrosom reguliert werden und deren Störung eine der potentiellen Ursachen für die Entstehung der kongenitalen Mikrozephalie und Kleinwüchsigkeit darstellt.

1.1. Zentrosomen: Struktur und Funktion

Zentrosomen sind ca. 1 μm große subzelluläre Organellen, die in tierischen Zellen als primäre Zentren der Mikrotubulus-Organisation (MTOC: *Microtubule Organising Center*) dienen und dadurch eine Vielzahl von zellulären Prozessen kontrollieren. So regulieren die Zentrosomen z.B. die Zellmotilität, Zelladhäsion und Zellpolarität, ermöglichen einen

gerichteten intrazellulären Vesikeltransport und rekrutieren viele regulatorische Proteine. Die zentrale Rolle der Zentrosomen in der Zelle ist aber die Organisation eines bipolaren Spindelapparates während der Zellteilung.

Zentrosomen der Vertebraten bestehen aus zwei senkrecht zueinander liegenden Zentriolen, die von einem elektronendichten amorphen Material, der perizentriolären Matrix (PCM: *Pericentriolar Matrix*), umgeben sind. Die Zentriolen sind ca. 0,5 μm lang und haben einen Durchmesser von 0,2 μm (Abb. 1-1). Sie bestehen aus 9 Mikrotubulitriplets, die zylindrisch angeordnet sind, und enthalten zusätzlich zu den unterschiedlichen Tubulin-Isoformen noch weitere Strukturproteine wie z.B. Centrin, Sas6, Sas4, CEP135 und CP110 (Bettencourt-Dias und Glover, 2009). Zentriolen sind sehr robuste Strukturen und bestimmen dadurch die Stabilität des Zentrosoms (Janke et al., 2005). Sie sind außerdem entscheidend für die Formation der PCM, die Duplikation der Zentrosomen im Laufe des Zellzyklus (Stearns, 2001) und spielen als Basalkörper eine wichtige Rolle in der Ziliogenese (Dawe et al., 2007).

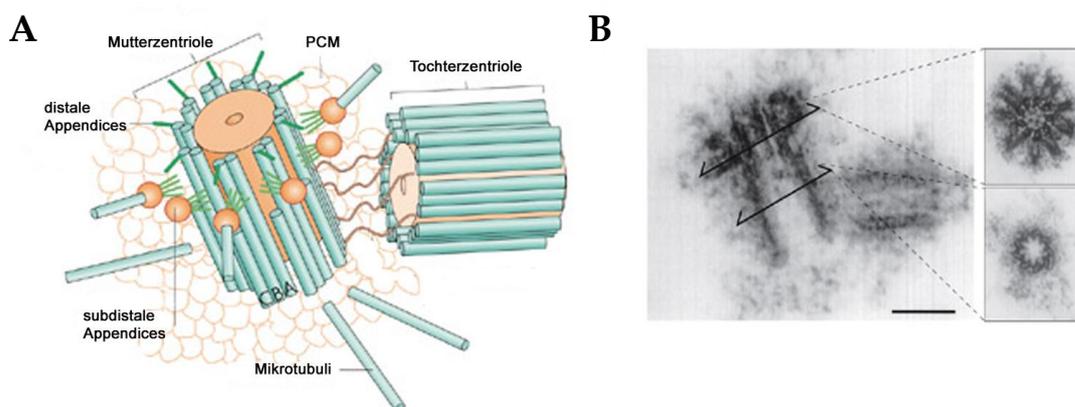


Abbildung 1-1: Zentrosomenstruktur. (A) Schematische Darstellung der zentrosomalen Struktur. Zentriolen weisen eine Polarität entlang der proximo-distalen Achse auf. Nur die reife Zentriole (Mutterzentriole) besitzt distale und subdistale Appendices. (B) Elektronenmikroskopische Aufnahme eines Zentrosoms. Rechts im Bild sind die Querschnitte des subdistalen (oben) und proximalen Endes (unten) der Mutterzentriole dargestellt. (Modifiziert nach Bettencourt-Dias und Glover, 2007, mit Genehmigung).

Die perizentrioläre Matrix ist die zentrale Struktur für die Nukleation und Organisation der Mikrotubuli. Sie besteht zum größten Teil aus *Coiled-Coil*-Proteinen wie Pericentrin und AKAP450, die gleichmäßig in der PCM verteilt sind (Takahashi et al., 1999; Flory et al., 2000), aber auch anderen Strukturproteinen, die nur in definierten Bereichen der PCM entlang der Mutterzentriole vorkommen (Ou et al., 2004). Pericentrin und Proteine der AKAP-Familie interagieren mit dem γ -Tubulin-Ringkomplex (γ -TuRC), der für die Initiierung der

Mikrotubulus-Nukleation essentiell ist. Die Mikrotubuli können nach der Nukleation ins Zytoplasma entlassen werden oder am Zentrosom verankert bleiben, z.B. durch Adapterproteine wie Ninein, CAP350, Centriolin und EB1 (Azimzadeh und Bornens, 2007). Ein anderes zentrosomales Strukturprotein, PCM1, ist nicht direkt mit der PCM assoziiert, sondern bildet sogenannte perizentrosomale Satelliten aus. Hierbei handelt es sich um nichtmembranöse 70–100 nm große Granula im Zytoplasma, die sich entlang der Mikrotubuli bewegen und sich in der Nähe der Zentrosomen ansammeln (Kubo et al., 1999; Dammermann und Merdes, 2002). PCM1 ist wichtig für den Dynein/Dynactin-vermittelten Transport von Pericentrin, Ninein und Centrin zum Zentrosom, wobei Pericentrin im Komplex mit Nudel auch unabhängig von Dynein/Dynactin an das Zentrosom rekrutiert wird (Dammermann und Merdes, 2002; Guo et al., 2006).

Zentrosomen sind dynamische Organellen und ihre Struktur und Zusammensetzung ändern sich im Laufe des Zellzyklus (Blagden und Glover, 2003). Zahlreiche Studien identifizierten die zentralen Komponenten des Zentrosoms, die permanent und zellzyklusunabhängig mit dem Zentrosom assoziiert sind. Dabei handelt es sich nicht nur um Strukturproteine, sondern auch um regulatorische Proteine, die direkt an der Funktion des Zentrosoms beteiligt sind (Ou und Rattner, 2004). Zusätzlich hierzu gibt es weitere Proteine, die das Zentrosom als eine Plattform für ihre Aktivität nutzen und von dort aus verschiedene zellzyklusspezifische Prozesse kontrollieren, wie z.B. Cyclin-abhängige Kinasen 1 und 2, Ubiquitinligase APC, Histondeacetylase HDAC1 u.s.w. (Doxsey et al., 2005). Somit sind die Zentrosomen nicht nur auf ihre Funktion als MTOC beschränkt, sondern nehmen auch eine zentrale Rolle in der Regulation wichtiger zellulärer Prozesse wie Zellzyklusprogression und zelluläre Antwort auf DNA-Schädigung ein.

1.2. Zentrosomen und Zellzyklusregulation

Proliferierende Zellen besitzen zwei charakteristische Eigenschaften – Wachstum und die Fähigkeit, sich zu reproduzieren. Die Zellreproduktion umfasst eine Serie fein aufeinander abgestimmter Ereignisse, die eine akkurate Verteilung der genetischen Information auf die Tochterzellen ermöglichen. Diese Ereignisse werden unter dem Begriff „Zellzyklus“ zusammengefasst. Der Zellzyklus wird konventionell in Interphase und M-Phase unterteilt, wobei die M-Phase die Ereignisse der Kern- und Zellteilung (Mitose und Zytokinese)

einschließt. Die Interphase setzt sich aus drei Phasen zusammen: Der S-Phase, in der die DNA-Replikation stattfindet, der G₁-Phase, die den Zeitabschnitt zwischen der abgeschlossenen M-Phase und S-Phase darstellt, und der G₂-Phase, dem Zeitabschnitt zwischen der S-Phase und dem Beginn der Mitose. In der G₁-Phase wird außerdem entschieden, ob die Zelle erneut in den Zellzyklus eintritt oder in die Ruhephase (G₀) übergeht, wie z.B. bei ungünstigen Bedingungen für eine weitere Zellteilung, Zellarrest oder terminaler Differenzierung.

Ein komplexes Netzwerk aus regulatorischen Proteinen kontrolliert die Progression des Zellzyklus über sogenannte *Checkpoints*. Der Begriff „*Checkpoint*“ beschreibt nicht nur die Übergangspunkte im Zellzyklus, an denen die Zellzyklusprogression vor dem Eintritt in die nächste Phase verzögert oder angehalten werden kann, bis bestimmte Prozesse korrekt abgeschlossen sind, sondern auch Signalmechanismen, die dafür verantwortlich sind. Die wichtigsten *Checkpoints* sind G₁/S-, G₂/M- und Metaphase/Anaphase-*Checkpoint* (*Spindle-Assembly-Checkpoint*).

Die Familie der Cyclin-abhängigen Kinasen (Cdk: *Cyclin-dependent kinase*) stellt die zentrale Komponente der Zellzykluskontrolle dar. Die Aktivität dieser Serin/Threonin-Kinasen ändert sich im Laufe des Zellzyklus und hängt von dem entsprechenden Cyclin-Partner ab, wobei die Cycline selbst zellzyklusabhängig synthetisiert und abgebaut werden (Evans et al., 1983). Der Aktivierungsstatus der Cyclin/Cdk-Komplexe wird außerdem durch zahlreiche Aktivatoren, z.B. die Phosphatasenfamilie Cdc25 wie auch Inhibitoren der Cip/Kip- und der INK4a/ARF-Familie moduliert (Trinkle-Mulcahy und Lamond, 2006; Besson et al., 2008). Unterschiedliche Zellzyklusphasen benötigen die Aktivität bestimmter Cyclin/Cdk-Komplexe: So kontrollieren Cdk4 und Cdk6 im Komplex mit Cyclin D das Fortschreiten der G₁-Phase; Cyclin E/Cdk2 ist für die Initiierung der DNA-Replikation notwendig; Cyclin A/Cdk2 kontrolliert die Progression durch die G₂-Phase, während Cyclin A im Komplex mit Cdk1 die Aktivierung des Cyclin B/Cdk1-Komplexes am Ende der G₂-Phase ermöglicht, der wiederum den Eintritt in die Mitose reguliert (Murray, 2004; Malumbres und Barbacid, 2009).

Die Regulation der Zellzyklusprogression erfolgt nicht nur durch zeitliche Koordinierung der Transkription, Phosphorylierung und Proteindegradation, sondern auch durch

räumliche Restriktion dieser Prozesse auf unterschiedliche subzelluläre Kompartimente (Takizawa und Morgan, 2000). Dabei spielen die Zentrosomen eine wichtige Rolle als eine Art molekulares Gerüst, an welchem unterschiedliche regulatorische Komplexe akkumulieren und zellzyklusspezifische Aktivitäten ausüben können. In diesem Zusammenhang sind die Prozesse zur Mitoseinitiierung am besten charakterisiert. In der Interphase akkumulieren Cdk1 und Cyclin B am Zentrosom, wo auch die initiale Aktivierung des Cyclin B/Cdk1-Komplexes in der Prophase stattfindet (Bailly et al., 1989; Bailly et al., 1992; Jackman et al., 2003). Das aktivierte Cyclin B/Cdk1-Komplex wandert anschließend in den Zellkern, wodurch unumkehrbar die Mitoseprogression auslöst wird. Es gibt unterschiedliche regulatorische Mechanismen, die sicherstellen, dass der Cyclin B/Cdk1-Komplex nicht vor der DNA-Synthese aktiviert wird (Lindqvist et al., 2009). So verhindert z.B. die Checkpoint Kinase 1 (Chk1), die während der Interphase am Zentrosom lokalisiert ist, die Aktivierung des Cyclin B/Cdk1-Komplexes, indem sie die Phosphatase Cdc25B inaktiviert (Krämer et al., 2004; Schmitt et al., 2006). Diese Phosphatase kann die inhibitorische Phosphorylierung von Cdk1 an Tyrosin 15 aufheben und so den Cyclin B/Cdk1-Komplex aktivieren (Lindqvist et al., 2005). Die genauen Mechanismen der Mitoseinitiierung sind noch nicht vollständig verstanden, aber vieles deutet darauf hin, dass die Aktivität von Cdk1 während der S- und G₂-Phase über ein komplexes Netzwerk von Rückkopplungsmechanismen zunehmend verstärkt wird und erst dann rapide ansteigt, wenn sie nicht mehr im Gleichgewicht mit der räumlich und zeitlich regulierten Aktivität bestimmter *Checkpoint*-Proteine (also ihrer Antagonisten) ist. Viele von den an der Regulation der Mitoseinitiierung beteiligten Proteinen sind in der G₂-Phase am Zentrosom lokalisiert und ihre Rekrutierung überlappt sich zeitlich mit den Prozessen der Zentrosomenreifung. Zentrosomal lokalisierte Proteinkinasen Plk1 und AuroraA, direkt bzw. indirekt aktiviert durch Cyclin B/Cdk1, regulieren diese Prozesse und fördern somit die lokale Ansammlung des Mitose-initiiierenden Apparates (Barr und Gergely, 2007).

Die Zentrosomen spielen aber nicht nur für die Regulation des G₂/M-Übergangs eine wichtige Rolle, sondern sind auch wichtig für die Initiierung der DNA-Replikation. Das Entfernen der Zentrosomen in Interphasezellen mittels Laser oder Mikronadel resultiert in der Entstehung azentriolärer MTOC, die zwar eine normale Progression durch die Mitose ermöglichen, in vielen Fällen aber zu fehlerhafter Zytokinese führen. Aus solcher

Zellteilung hervorgegangene Tochterzellen mit azentriolären MTOC werden in der folgenden G₁-Phase arretiert (Hinchcliffe et al., 2001; Khodjakov und Rieder, 2001). Eine weitere Studie zeigte, dass eine Störung der zentrosomalen Integrität durch die RNAi-vermittelte Depletion einzelner zentrosomaler Proteine bereits zum p38-p53-p21-vermittelten G₁/S-Arrest führt (Mikule et al., 2007).

1.3. Zentrosomenzyklus

Zentrosomen spielen eine fundamentale Rolle in der Organisation des bipolaren mitotischen Spindelapparates, der eine korrekte Verteilung der Chromosomen während der Zellteilung gewährleistet. Die Struktur, Funktion und die Anzahl der Zentrosomen werden dabei streng kontrolliert: Die Zentrosomen müssen noch vor der Zellteilung in der S-Phase verdoppelt werden, während der G₂-Phase müssen die Zentrosomen verstärkt Proteine der PCM rekrutieren und sich anschließend beim Übergang in die Mitose teilen und bipolar anordnen.

In einem normalen Zellzyklus sind die Prozesse der Zentrosomenduplikation eng an den DNA-Zyklus gekoppelt (Abb. 1-2). Wie auch die DNA-Replikation ist die Zentrosomenduplikation semikonservativ und erfolgt nur einmal pro Zellzyklus. Die Koordination dieser beiden Prozesse in der S-Phase wird durch ein umfangreiches regulatorisches Netzwerk kontrolliert, vermittelt durch die Aktivität von Cdk2 im Komplex mit Cyclin E bzw. Cyclin A (Meraldi und Nigg, 2002). Am Anfang des Zyklus, in der G₁-Phase, enthalten die Zellen ein Zentrosom bestehend aus zwei Zentriolen, die über einen *Linker* aus den Proteinen C-Nap1, Rootletin and Cep68 locker miteinander verbunden sind (Bahe et al., 2005; Graser et al., 2007). An den proximalen Enden beider Zentriolen entsteht während der S-Phase jeweils eine neue Zentriole (Prozentriole), wobei die Regulation dieses Prozesses durch eine Reihe struktureller und regulatorischer Proteine (Sas4, Sas6 und Plk4) sichergestellt wird (Dammermann et al., 2004; Habedanck et al., 2005). Während der G₂-Phase reifen die Prozentriolen zu vollständigen Zentriolen heran, so dass zwei Zentrosomen entstehen, die jeweils zwei orthogonal angeordnete und fest miteinander verbundene Zentriolen (Mutter- und Tochterzentriole) enthalten (Nigg, 2007). Die Separation der beiden Zentrosomen in der späten G₂-Phase erfolgt durch die Trennung des *Linkers* zwischen den beiden Mutterzentriolen, die durch die Aktivität der Nek2-Kinase und die Phosphorylierung der *Linker*-Proteine reguliert wird (Fry, 2002; Mayor et al., 2002). Parallel dazu vergrößert

sich die perizentrioläre Matrix durch eine verstärkte Rekrutierung zusätzlicher Proteinkomplexe, vor allem des γ -Tubulin-Ringskomplexes, wodurch die Mikrotubuli-Nukleationsaktivität der Zentrosomen verstärkt wird (Palazzo et al., 2000; Meraldi und Nigg, 2002). Diese „Reifung“ der Zentrosomen ist ein phosphorylierungsabhängiger Prozess, der die Aktivität wichtiger mitotischer Kinasen wie Cyclin B/Cdk1, Aurora A und Plk1 benötigt und für die Ausbildung der mitotischen Spindel essentiell ist (Berdnik und Knoblich, 2002; Barr et al., 2004).

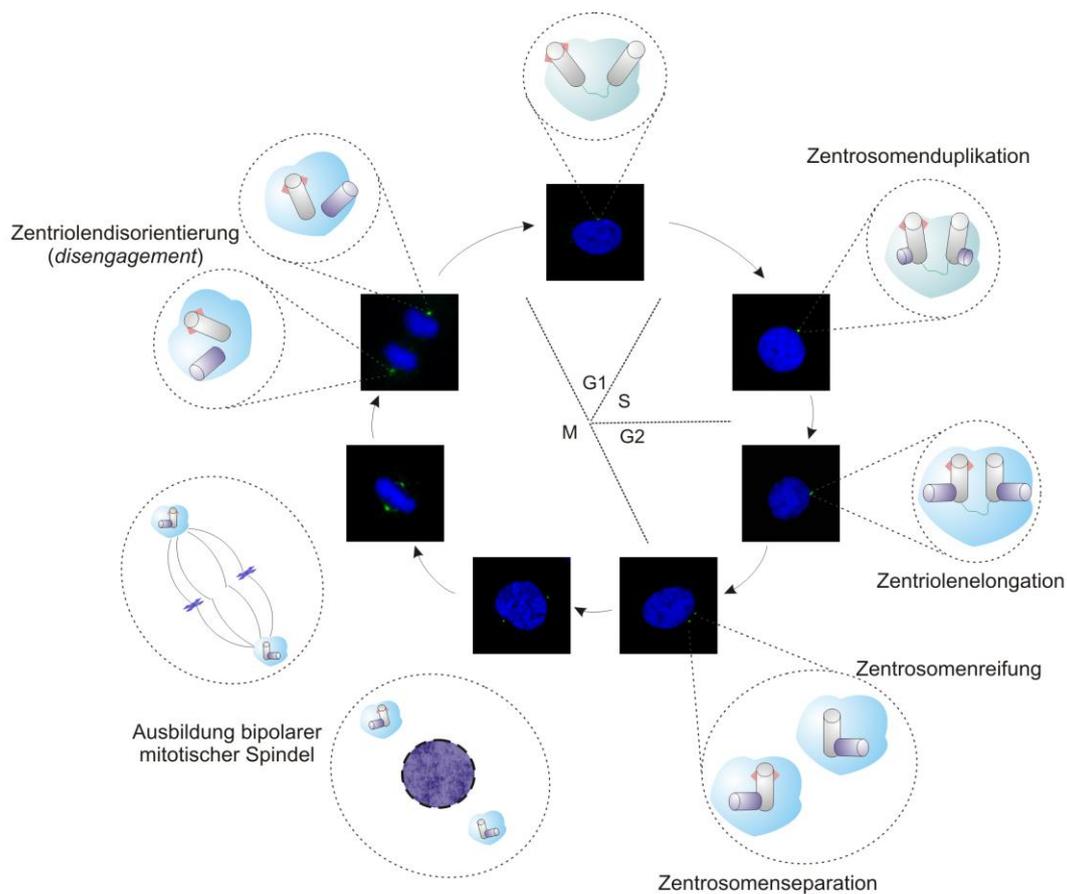


Abbildung 1-2: Zentrosomenzyklus. Der Zentrosomenzyklus (äußerer Kreis) verläuft koordiniert mit dem Zellzyklus (innerer Kreis) und umfasst fünf Phasen: 1. Duplikation der Zentrosomen in der S-Phase (Entstehung der Prozentriolen). 2. Elongation der neu entstandenen Zentriolen während der G₂-Phase. 3. Zentrosomenreifung, die am Ende der G₂-Phase beginnt und bis zur Metaphase andauert. 4. Separation der Zentrosomen, die am Ende der G₂-Phase stattfindet und die Ausbildung eines bipolaren mitotischen Spindelapparates ermöglicht. 5. Zentriolendisorientierung (Trennung der orthogonalen Verbindung zwischen der Mutter- und Tochterzentriole) am Ende der Mitose bzw. zu Beginn der G₁-Phase. In der G₁-Phase sind beide Zentriolen (Mutter- und Tochterzentriole aus dem letzten Zentrosomenzyklus) über einen losen *Linker* miteinander verbunden.

Am Ende der Mitose bzw. in der frühen G₁-Phase wird die orthogonale Verbindung zwischen der Mutterzentriole und der Tochterzentriole durch Separase, einer Protease, die auch an der Trennung von Schwesterchromatiden beteiligt ist, gelöst (Tsou und Stearns,

2006). Dieser als Zentriolendisorientierung (oder *disengagement*) bezeichnete Prozess stellt eine Voraussetzung für einen neuen Zyklus der Zentrosomenduplikation dar (Tsou und Stearns, 2006). Der lose *Linker* zwischen den beiden Zentriolen bleibt erhalten und die Größe der PCM wird reduziert, sodass das Zentrosom schließlich im gleichen Zustand vorliegt wie zu Beginn des letzten Zyklus.

1.4. Zentrosomen und genotoxischer Stress

In eukaryotischen Zellen dienen die Zellzyklus-*Checkpoints* dem Erhalt der genomischen Stabilität, indem sie sicherstellen, dass die kritischen zellulären Ereignisse wie DNA-Replikation und Chromosomensegregation mit höchster Genauigkeit vollzogen werden. Hierzu werden diese *Checkpoints* im Falle einer DNA-Schädigung aktiviert und können die Zellzyklusprogression anhalten, bis die Schäden behoben sind, oder den apoptotischen Zelltod einleiten, wenn die Schäden irreparabel sind. Eine DNA-Schädigung kann entweder durch externe Faktoren, wie UV-Strahlung, ionisierende Strahlung oder chemische Mutagene, ausgelöst werden oder durch interne Faktoren, z.B. durch Störung der Desoxyribonukleotid-Synthese. Die Gesamtheit der Reaktionen auf solche externen oder internen Stressfaktoren wird als zelluläre Antwort auf DNA-Schädigung (*DNA damage response*) bezeichnet und die entsprechenden *Checkpoints* als *DNA damage Checkpoints* (Zhou und Elledge, 2000).

Zur Vereinfachung werden die Prozesse der zellulären Antwort auf DNA-Schädigung in einer linearen Abfolge dargestellt: Die Erkennung der Schädigung durch Sensoren, Weiterleitung der Signale über Transduktoren und Mediatoren an die Effektoren, die das Signal empfangen und umsetzen (Abb. 1-3).

Die Kinasen ATM (*ataxia-telangiectasia mutated*) und ATR (*ATM and Rad3-related*) spielen eine zentrale Rolle in der Erkennung von DNA-Schäden. Dabei erkennt ATM DNA-Doppelstrangbrüche, die z.B. durch ionisierende Strahlung entstehen, ATR wird hingegen durch UV-induzierte Einzelstrangbrüche und Replikationsstress aktiviert. Beide Kinasen koordinieren die Initiierung und Amplifizierung der *Checkpoint*-Mechanismen durch Phosphorylierung zahlreicher Substratproteine, darunter die *Checkpoint* Kinasen Chk1 und Chk2, wobei Chk1 hauptsächlich von ATR und Chk2 von ATM phosphoryliert wird.

Unterschiedliche Arten genotoxischen Stresses können auch die Aktivierung des p38 MAPK/MK2-Signalweges auslösen, möglicherweise vermittelt durch ATR und ATM (Reinhardt et al., 2007). Die Effektor kinase Chk1, Chk2 und MAPKAP Kinase-2 (MK2) regulieren anschließend über ihre Zielsubstrate wie Cdc25 Phosphatasen oder p53 die Aktivität der Cyclin/Cdk-Komplexe, wodurch die Initiierung und das Fortschreiten der DNA-Synthese sowie der Eintritt in die Mitose blockiert werden.

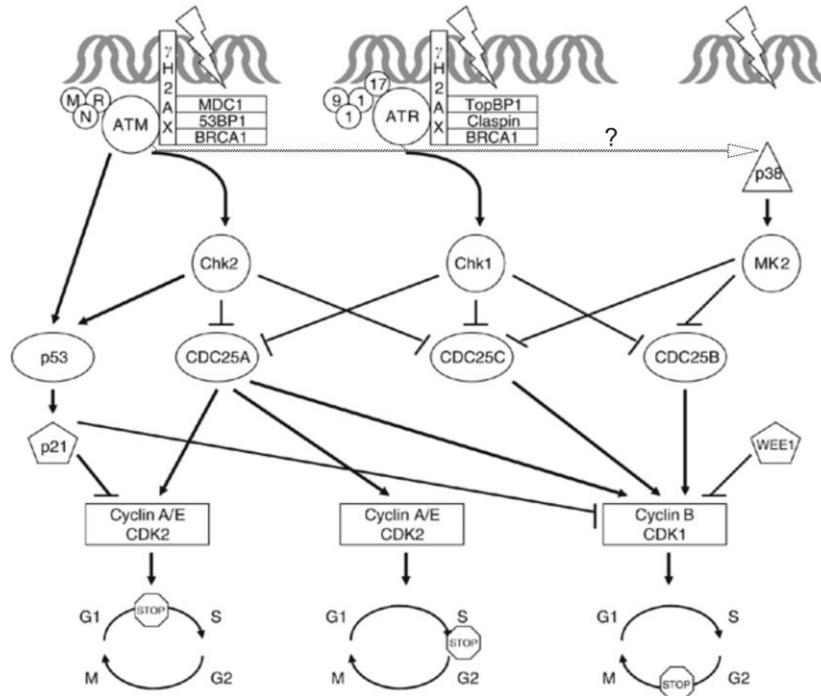


Abbildung 1-3: DNA damage Checkpoints. Die Aktivität der Kinasen ATR und ATM benötigt zusätzliche Sensor-Proteinkomplexe. ATR agiert im Komplex mit Rad17 und 9-1-1 (Rad9, Rad1 und Hus1), ATM im Komplex mit Mre11, Rad50 und Nbs1. Mediatorproteine wie MDC1 und Claspin unterstützen die Aktivierung von Effektor kinasen Chk1 und Chk2, von p53 sowie potentiell auch von p38MAPK. (Modifiziert nach Bucher und Britten, 2008, mit Genehmigung).

Die Mechanismen der zellulären Antwort auf DNA-Schädigung sind sehr komplex und unterliegen einer strengen zeitlichen und räumlichen Kontrolle. Es wird angenommen, dass Zentrosomen zwei Funktionen in der Regulation dieser Mechanismen spielen: Zum einen als spatiotemporäre Organisationszentren der DNA damage Signalwege und zum anderen als Effektoren der DNA damage Checkpoints, das heißt, die Zentrosomen werden als MTOC inaktiviert oder ihr Zyklus wird im Zuge der zellulären Antwort auf DNA-Schädigung modifiziert. So wurde z.B. gezeigt, dass eine DNA-Schädigung zu einer Chk2-vermittelten Fragmentierung der Zentrosomen und daraus resultierenden mitotischen Katastrophe in embryonalen Zellen von *Drosophila* führt (Takada et al., 2003). Die mitotische Katastrophe ist

charakterisiert durch multipolare mitotische Spindelbildung, eine Verzögerung der Metaphase und Zytokinese-Defekte. Diese Zellen werden meistens nach erfolgter fehlerhafter Mitose in der G₁-Phase arretiert bzw. durch apoptotische oder nicht-apoptotische Mechanismen eliminiert (Roninson et al., 2001). Andere Arbeiten zeigten, dass die *DNA damage Checkpoints* eine Amplifikation der Zentrosomen induzieren. Die Autoren vermuten, dass dieser Schritt notwendig ist, um Zellen mit geschädigter DNA, die nicht im G₂ arretiert werden konnten, durch mitotische Katastrophe aufgrund einer multipolaren Spindelbildung zu eliminieren (Dodson et al., 2004). Die Zentrosomenamplifikation als Antwort auf eine DNA-Schädigung erfordert die Aktivität von Chk1, das in diesen Prozessen als Effektor kinase von ATR und ATM agiert (Bourke et al., 2007).

Es wurden mehrere zentrosomale regulatorische Proteine als potentielle Effektoren der *DNA damage Checkpoints* identifiziert, darunter Plk1, Plk3, Aurora A, und Nek2. Ebenso sind die Hauptkomponenten dieser Signalwege, wie z.B. ATR und ATM, Checkpoint Kinasen, BRCA1 und p53, zumindest temporär mit dem Zentrosom assoziiert (Wang et al., 2009). Es ist jedoch noch nicht genau geklärt, ob diese Regulatoren in Signalwege involviert sind, die zu einer Inaktivierung der Zentrosomen führen oder ob sie in erster Linie zentrosomenunabhängige Prozesse des Zellzyklusarrests vom Zentrosom aus steuern.

1.5. Zentrosomen in der Pathogenese humaner Erkrankungen

Die zentrosomalen Funktionen der Nukleation und Organisation von Mikrotubuli sind entscheidend für viele weitere zelluläre Prozesse neben der Zellteilung, wie z.B. die Organisation des Zytoskeletts, den Organellentransport und die Ziliogenese. Analysen des zentrosomalen Proteoms identifizierten zahlreiche Proteine, deren Mutationen die Ursache unterschiedlicher humaner Erkrankungen sind. Einige zentrosomale oder zentrosomen-assoziierte Proteine wie Lis1, Disc1 und Spastin sind in Prozesse der neuronalen Migration sowie des Axonwachstums involviert und ihr Funktionsverlust ist assoziiert mit der Pathogenese von Lissenzephalie, Schizophrenie und Hereditärer Spastischer Paraplegie (Badano et al., 2005). Beim Bardet-Biedl-Syndrom führen unterschiedliche Defekte in der Ziliogenese zu einem breiten Spektrum klinischer Symptome, wie z.B. Übergewicht, Polydaktylie, Augendefekte, renale Fehlbildungen und mentale Retardierung (Ansley et al., 2003). Mittlerweile wurden vierzehn kausale Gene identifiziert (*BBS 1-12, MKS1 und Cep290*),

wobei die meisten davon für Zentrosomen- bzw. Basalkörper-assoziierte Proteine kodieren, die an der strukturellen Organisation der Zentrosomen sowie an der Entwicklung und Funktion der Zilien beteiligt sind (Kim et al., 2004; Zaghoul und Katsanis, 2009).

Angesichts der fundamentalen Bedeutung der Zentrosomen für die Zellzykluskontrolle und den Erhalt der genomischen Integrität ist es nicht überraschend, dass zentrosomale Dysfunktionen auch in die Pathomechanismen von Tumorerkrankungen involviert sind. Strukturelle und numerische zentrosomale Aberrationen wurden sowohl in der Mehrzahl solider Tumoren als auch in vielen hämatologischen Neoplasien beschrieben (Krämer et al., 2005; Nigg, 2006). Eine Zentrosomenamplifikation, die durch Überexpression wichtiger zentrosomaler Regulatorproteine wie Aurora A, Nek2, Survivin oder BRCA1 entstehen, resultiert in der Desorganisation von mitotischen Spindel und Defekten in der Chromosomensegregation (Yang et al., 2008b; Wang et al., 2009). Somit können zentrosomale Dysfunktionen auch zur Entstehung chromosomaler Instabilität beitragen, die charakteristisch für die meisten Tumoren ist (Ganem et al., 2009).

Eine Fehlregulation der Zellteilung aufgrund des Funktionsverlustes zentrosomaler Proteine wurde auch für nicht-neoplastische humane Erkrankungen wie die Primäre Mikrozephalie, MOPD II und das Seckel-Syndrom beschreiben. Diese werden in den folgenden Kapiteln beschrieben.

1.5.1. Primäre Mikrozephalie und MCPH1

Die Primäre autosomal-rezessive Mikrozephalie (MCPH) ist eine seltene neuronale Entwicklungsstörung, die durch eine erhebliche Reduktion des Gehirnvolumens (Abb. 1-4) und eine nicht progressive mentale Retardierung charakterisiert ist. Die Reduktion des Gehirnwachstums beginnt *in utero* und ist bereits in der 32. Schwangerschaftswoche nachweisbar (Woods et al., 2005). Der klinische Phänotyp der Primären Mikrozephalie ist gekennzeichnet durch einen verringerten Kopfumfang (mindestens 3 Standardabweichungen unterhalb des Normalwertes) und die Abwesenheit von anderen schwerwiegenden Fehlbildungen oder signifikanten neurologischen Auffälligkeiten (Woods et al., 2005). Trotz reduzierten Volumens ist die neuronale Architektur des Gehirns normal,

weshalb vermutet wird, dass der Erkrankung ein Defekt in der Produktion von neuronalen Vorläuferzellen zugrunde liegt (Bond et al., 2002; Jackson et al., 2002).

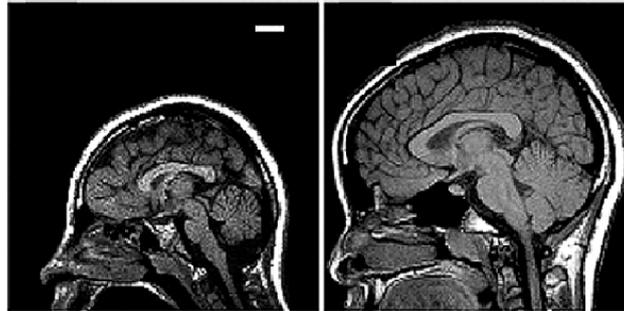


Abbildung 1-4: Phänotyp der Primären autosomal-rezessiven Mikrozephalie. Links: Kernspintogramm vom Kopf eines 13-jährigen Mädchens mit Mikrozephalie (Mutation im *MCPH5*-Gen). Rechts: Zum Vergleich ein Kernspintogramm vom Kopf eines gesundes 11-jährigen Mädchens. Maßstabsbalken entspricht 2 cm. (Modifiziert nach Bond et al., 2002, mit Genehmigung).

Die Primäre autosomal-rezessive Mikrozephalie ist eine genetisch heterogene Erkrankung. Es wurden bis dato sieben Genloci kartiert (*MCPH1-MCPH7*) und fünf Gene identifiziert (Bond et al., 2002; Jackson et al., 2002; Bond et al., 2005; Kumar et al., 2009). *ASPM* (*MCPH5*), *CDK5RAP2* (*MCPH3*), *CENPJ* (*MCPH6*) und *STIL* (*MCPH7*) sind zentrosomale Proteine und haben wichtige Funktionen in der Nukleation und Organisation von Mikrotubuli, der Ausrichtung des mitotischen Spindelapparates und in der Regulation der Zentrosomenduplikation (Cox et al., 2006). Somit spielen diese Proteine eine wichtige Rolle bei mitotischen Prozessen, möglicherweise speziell in der symmetrischen bzw. asymmetrischen Zellteilung neuronaler Stammzellen, und regulieren so das Wachstum des Gehirns.

Unter den *MCPH*-Genen nimmt *MCPH1* eine Sonderstellung ein. Mutationen in diesem Gen sind nicht nur mit Mikrozephalie assoziiert, sondern auch mit Minderwuchs (Neitzel et al., 2002). Das *MCPH1*-Gen liegt auf Chromosom 8p23.1 und kodiert für 14 Exons mit einem offenen Leserahmen von 2508 bp (Abb. 1-5). Bei den bisher identifizierten Mutationen handelt es sich um *nonsense* und *missense* Mutationen: So führt die Insertion eines Adenins in Exon 5 (427insA) zu einer Leserasterverschiebung, wodurch ein vorzeitiges Stopcodon entsteht (Neitzel et al., 2002). Auch der Basenaustausch 74C>G generiert ein Stopcodon, wohingegen der Basenaustausch C>G an Position 80 zu einer Aminosäuresubstitution von Threonin zu Arginin führt (Jackson et al., 2002; Trimborn et al., 2005). Durch die Mutationen

427insA und 74C>G können nur kurze N-terminale Fragmente von 146 bzw. 20 Aminosäuren synthetisiert werden, die möglicherweise noch eine Teilfunktion besitzen. Dies scheint bei der 427insA Mutation jedoch verhindert zu werden, da das verkürzte *MCPH1*-Transkript dem *nonsense mediated mRNA decay* unterliegt (Alderton et al., 2006). Während die Patienten mit *nonsense* Mutationen eine ausgeprägte Mikrozephalie aufweisen, zeigen die Patienten mit einer *missense* Mutation einen milden klinischen Phänotyp (Trimborn et al., 2005). Bei allen drei Patientengruppen konnte in proliferierenden Zellen ein erhöhter Anteil von Prophase-ähnlichen Zellen nachgewiesen werden, die eine vorzeitige Chromatinkondensation während der frühen G₂-Phase aufweisen (Trimborn et al., 2005).

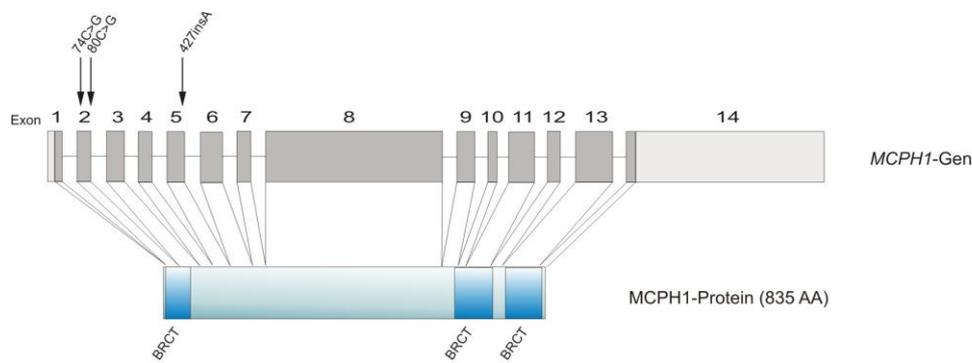


Abbildung 1-5: Humanes MCPH1. Schematische Darstellung des *MCPH1*-Gens (oben) und seines Genproduktes (unten). Pfeile deuten auf Mutationen, die im *MCPH1*-Gen bei MCPH-Patienten identifiziert wurden. *BRCT*: BRCA1 C-terminale Domäne.

Das Protein, Microcephalin (MCPH1), ist 835 Aminosäuren lang und enthält 3 BRCT (BRCA1 C-Terminus) Domänen, wobei eine davon N-terminal und die anderen beiden C-terminal lokalisiert sind. BRCT Domänen sind Peptid- und Phosphopeptid-bindende Module und kommen häufig in Proteinen vor, die an der DNA-Reparatur, der zellulären Antwort auf DNA-Schädigung und der Zellzyklusregulation beteiligt sind (Rodriguez und Songyang, 2008).

MCPH1 ist ein multifunktionelles Protein (Abb. 1-6). Es spielt eine wichtige Rolle in der Regulation von Zellzyklusprogression, DNA-Reparatur sowie *DNA damage Checkpoints* und wurde als potentieller Expressionsrepressor von humaner Telomerase identifiziert, wodurch es auch den Namen BRIT1 (BRCT-rep~~e~~at inhibitor of hTERT expression) erhielt (O'Driscoll et al., 2006). MCPH1 ist beteiligt an frühen Prozessen der Erkennung und Behebung von DNA-Schäden. In ATR- und ATM-vermittelten schadeninduzierten Signalwegen fungiert es als ein

Mediator-Protein und bildet bereits wenige Minuten nach der Bestrahlung der Zellen die sogenannten strahleninduzierte Foci an geschädigten DNA-Abschnitten (Rai et al., 2006). Dort bindet MCPH1 an γ -H2AX, eine phosphorylierte Histonvariante, die DNA-Läsionen markiert, und unterstützt die Rekrutierung und Ansammlung wichtiger *DNA damage response* Proteine wie 53BP1, MDC1, NBS1, phospho-ATM, RPA, Rad17 und ATR (Rai et al., 2006; Wood et al., 2007). Außerdem induziert MCPH1 über eine Interaktion mit dem Chromatin-Remodelierungs-Komplex SWI-SNF die Chromatin-Relaxation, wodurch *DNA damage response* Proteine die geschädigten DNA-Abschnitte leichter erreichen können (Peng et al., 2009). Zusammen mit dem Condensin II-Komplex scheint MCPH1 auch an den Prozessen der homologen Rekombination im Zuge der DNA-Reparatur beteiligt zu sein, wobei die genauen Mechanismen noch nicht geklärt sind (Wood et al., 2008).

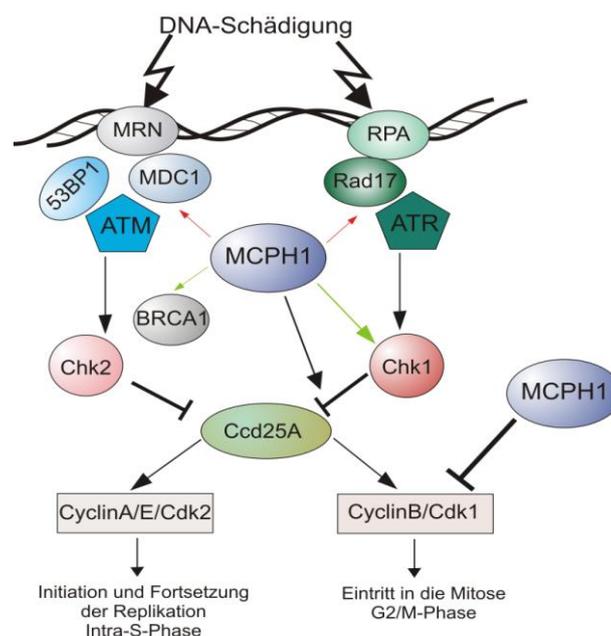


Abbildung 1-6: MCPH1-Funktionen in der zellulären Antwort auf DNA-Schädigung und Zellzykluskontrolle. Im Zuge der zellulären Antwort auf DNA-Schädigung reguliert MCPH1 die Rekrutierung von *DNA damage response* Proteinen an geschädigte DNA-Abschnitte (rote Pfeile) sowie die Transkription von Chk1 und BRCA1 (grüne Pfeile). Innerhalb einer ATR-vermittelten Signalkaskade agiert MCPH1 auch *downstream* von Chk1 in der Regulation der Cdc25A-Stabilisierung. Außerdem ist MCPH1 an DNA-Schädigungs-unabhängigen Prozessen der Mitoseinitiierung beteiligt, indem es die Aktivierung von Cdk1 reguliert (Adaptiert an Chaplet et al. 2006).

Zusätzlich zu seiner Mediator-Funktion ist MCPH1 auch in die späteren Prozesse der *DNA damage Checkpoints*-Regulation involviert. In ATR-vermittelter Signalkaskade agiert MCPH1 *downstream* von der Effektor kinase Chk1 und reguliert die Stabilisierung von Phosphatase

Cdc25A (Alderton et al., 2006). Nach einer DNA-Schädigung wird Cdc25A Ubiquitin-abhängig abgebaut, wodurch die Aktivierung von Cyclin A/Cdk2, Cyclin E/Cdk2 und Cyclin B/Cdk1 verhindert und ein Intra-S-Phase- bzw. G₂/M-Arrest eingeleitet wird (Trinkle-Mulcahy und Lamond, 2006). MCPH1-defiziente Zellen weisen eine verminderte Degradation von Cdc25A auf und arretieren nicht am G₂/M-*Checkpoint* nach UV-Bestrahlung (Alderton et al., 2006). Auch eine RNAi-vermittelte Depletion von MCPH1 resultiert in defekten Intra-S-Phase- und G₂/M-*Checkpoints* nach ionisierender Bestrahlung, wobei angenommen wird, dass MCPH1 diese Prozesse u.a. über die Transkriptionsregulation von zwei wichtigen Komponenten der *DNA damage* Signalkaskade, Chk1 und BRCA1, kontrolliert (Xu et al., 2004; Lin et al., 2005).

Defekte in der Regulation der zellulären Antwort auf eine DNA-Schädigung können zu einer schwerwiegenden Störung der genomischen Integrität führen und somit zur Krebsentstehung beitragen (Halazonetis et al., 2008). In der Tat konnte eine Studie zeigen, dass eine RNAi-vermittelte Depletion von MCPH1 in einer erhöhten Frequenz von chromosomalen Aberrationen resultiert (Rai et al., 2006). Die Untersuchung mehrerer Brustkrebszelllinien und Ovarial- sowie Prostatakarzinomen zeigte eine signifikante Reduktion sowohl der Anzahl der Genkopien als auch der Expression von MCPH1 im Vergleich zu gesundem Gewebe (Rai et al., 2006). Außerdem wurde in einer von zehn untersuchten Brustkrebs-Biopsien eine Deletionsmutation im *MCPH1*-Gen gefunden, die zur Entstehung eines C-terminal-trunkierten Proteins und dadurch zum Verlust der MCPH1-Funktion in der zellulären Antwort auf DNA-Schädigung führt (Rai et al., 2006). Diese Ergebnisse liefern Hinweise auf die potentielle Funktion von MCPH1 als Tumorsuppressor.

Wie bereits erwähnt, ist MCPH1 an den Prozessen der Transkriptionsregulation beteiligt. MCPH1 interagiert mit dem Transkriptionsfaktor E2F1, der die Transkription unterschiedlichen Gene reguliert, die in DNA-Reparatur, *DNA damage Checkpoints* und Apoptose involviert sind (Yang et al., 2008a). Interessanterweise ergaben die Untersuchungen von lymphoblastoiden Zelllinien von MCPH-Patienten (z.B. MCPH1^{427insA} mit Mutation 427insA im *MCPH1*-Gen) keinen Hinweis auf die transkriptionsregulatorischen Funktion von MCPH1, da Chk1 und BRCA1 in diesen Zellen normal exprimiert werden (Alderton et al., 2006). MCPH1^{427insA}-Zellen weisen Defekte in ATR-vermittelten schadeninduzierten Signalwegen auf und zeigen somit ähnliche

Eigenschaften wie ATR-Seckelzellen von Patienten mit ATR-Seckel-Syndrom (Alderton et al., 2006). Der klinische Phänotyp dieser autosomal-rezessiven Erkrankung, die auf eine homozygote *Splicing*-Mutation im *ATR*-Gen zurückzuführen ist, ähnelt dem der Primären autosomal-rezessiven Mikrozephalie mit *MCPH1*-Mutation (O'Driscoll et al., 2003). Die Analyse von *MCPH1*^{427insA}-Zellen legt eine weitere potentielle Funktion von *MCPH1* offen: Die DNA-Schädigungs-unabhängige Regulation des Zellzyklus unter normalen physiologischen Bedingungen. Es wurde gezeigt, dass *MCPH1*-defiziente Zellen bereits in der S-Phase stark reduzierte Level an inaktivem phospho-Tyrosin 15-Cdk1 und vorzeitige Chromosomenkondensation aufweisen (Alderton et al., 2006). Die Autoren vermuten, dass *MCPH1* an der zeitlichen Regulation des Eintritts in die Mitose beteiligt ist und das Phänomen der vorzeitigen Chromosomenkondensation mit der vorzeitigen Aktivierung des Cyclin B/Cdk1-Komplexes in *MCPH1*-defizienten Zellen einhergeht. Des Weiteren wurde in dieser Arbeit eine direkte Interaktion zwischen *MCPH1* und Chk1 nachgewiesen, was auf eine alternative, von der Transkriptionsregulation unabhängige Funktion von *MCPH1* in Chk1-abhängigen Prozessen hindeutet, wenngleich die genaue Bedeutung dieser Interaktion ungeklärt blieb. Bemerkenswert ist jedoch, dass auch Chk1 an den Prozessen der Mitoseinitiierung wesentlich beteiligt ist. Diese Funktion von Chk1 wird räumlich und zeitlich genau reguliert: Während der Interphase wird ein Teil des nukleären Chk1 an die Zentrosomen rekrutiert, wo es die zentrosomen-assoziierte Phosphatase Cdc25B am Serin 230 inhibitorisch phosphoryliert (Krämer et al., 2004; Schmitt et al., 2006). In diesem inaktiven Zustand kann die Phosphatase die inhibitorische Phosphorylierung von zentrosomen-assoziiertem Cdk1 am Tyrosin 15 nicht aufheben und somit bleibt auch Cdk1 vorerst im inaktiven Zustand. Am Übergang von der G₂-Phase in die Mitose dissoziiert Chk1 vom Zentrosom, gleichzeitig wird Cdc25B durch andere Kinase aktivierend phosphoryliert. Aktiviertes Cdc25B dephosphoryliert Cdk1, wodurch der Cyclin B/Cdk1-Komplex aktiviert und die Mitose eingeleitet wird.

1.5.2. MOPD II, Seckel-Syndrom und Pericentrin

Der Mikrozephale Osteodysplastische Primordiale Zwergwuchs Typ Majewski II (MOPD II) und das Seckel-Syndrom sind autosomal-rezessive Entwicklungsstörungen, die durch ausgeprägte Mikrozephalie und Kleinwuchs gekennzeichnet sind. Der Kopfumfang und die

Körpergröße bei Seckel-Syndrom liegen mindestens 12 bzw. 5 Standardabweichungen unterhalb des Normwerts, die Patienten sind mental retardiert (Goodship et al., 2000). MOPD II ist ein Seckel-ähnliches Syndrom, die Patienten sind jedoch maximal 110 cm groß, haben relativ normale Körperproportionen und weisen zahlreiche typische Zahn- und Skelettanomalien auf (Hall et al., 2004).

Das Seckel-Syndrom kann unterschiedliche genetische Ursachen haben. Bislang wurden zwei Gene identifiziert, deren Mutationen mit der Erkrankung assoziiert sind. Bei einer Patientengruppe wurde eine Mutation im *ATR*-Gen nachgewiesen (siehe oben), bei einer anderen drei *nonsense* Mutationen im *Pericentrin*-Gen (O'Driscoll et al., 2003; Griffith et al., 2008). Interessanterweise wurden auch bei MOPD II-Patienten insgesamt 29 unterschiedliche Mutationen im *Pericentrin*-Gen identifiziert (Rauch et al., 2008).

Das humane *Pericentrin*-Gen (*PCNT*) lokalisiert auf Chromosom 21q22.3 und besteht aus 47 Exons, die eine genomische Sequenz von 122 kb umspannen (Abb. 1-7). Die beschriebenen Mutationen im *PCNT*-Gen der MOPD II- und Seckel-Syndrom-Patienten generieren ein Stopkodon (z.B. 3109G>T, 658G>T, 8752C>T) oder führen zu einer Leserasterverschiebung, wodurch u.a. auch ein vorzeitiges Stopcodon entsteht (z.B. 1887delA und 3568_3569insT). Die Mutationen betreffen alle beschriebenen Isoformen von *PCNT* (Flory und Davis, 2003; Miyoshi et al., 2006) und führen somit zum Funktionsverlust des Proteins.

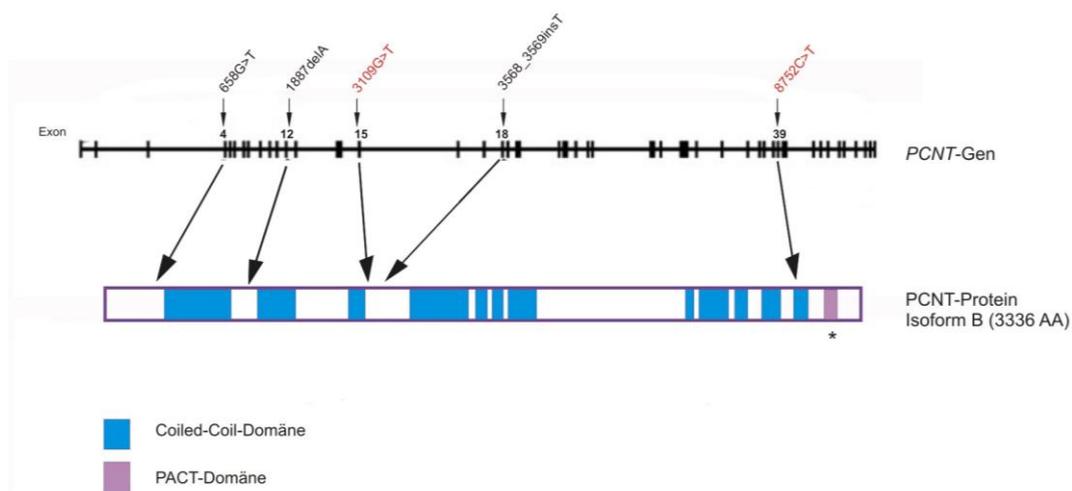


Abbildung 1-7: Humanes Pericentrin (PCNT). Schematische Darstellung des *PCNT*-Gens (oben) und eines seiner Genprodukte, Pericentrin B (unten). Pfeile deuten auf Mutationen, die im *PCNT*-Gen bei MOPD II-Patienten (rot, dargestellt sind nur 2 von insgesamt 29 beschriebenen Mutation) und Seckel-Patienten (schwarz) identifiziert wurden. Der Stern deutet auf die Calmodulin-bindende Region innerhalb der PACT-Domäne (*Pericentrin-AKAP450 Centrosomal Targeting*) des *PCNT*.

Pericentrin (PCNT) zählt zu den wesentlichen Komponenten der perizentriolären Matrix. Mehrere Isoformen dieses Proteins wurden in Maus und Mensch identifiziert, wobei noch nicht genau entschlüsselt wurde, wie diese Isoformen entstehen (Miyoshi et al., 2006). Die am besten charakterisierten Isoformen sind Pericentrin B (ca. 360 kDa), das auch als Kendrin bezeichnet wird, und Pericentrin A (ca. 250 kDa). Beide Isoformen weisen Homologien in der N-terminalen Region auf, aber nur Pericentrin B besitzt am C-Terminus eine Calmodulin-bindende Region (Aminosäuren 3195-3208), die innerhalb der PACT-Domäne (*Pericentrin-AKAP450 Centrosomal Targeting*) liegt. Die PACT-Domäne ist hochkonserviert und kommt auch in den orthologen Proteinen von *Drosophila* (CP309) und Hefe (Spc100p und Pcp1p) vor (Flory et al., 2002; Kawaguchi und Zheng, 2004). Sie ist für die Rekrutierung von PCNT und AKAP450 an das Zentrosom verantwortlich, wobei die Bindung an Calmodulin für die zentrosomale Lokalisation nicht erforderlich ist, da beide Proteine auch in Abwesenheit der Calmodulin-bindenden Region an das Zentrosom lokalisieren (Gillingham und Munro, 2000).

PCNT spielt eine wichtige Rolle in der Organisation des Zentrosoms und der mitotischen Spindel. Es interagiert mit vielen zentrosomalen Strukturproteinen wie PCM1 und Dynein, aber auch mit regulatorischen Proteinen, wie der Proteinkinase A und den Proteinkinasen C β II und C δ (Ou und Rattner, 2004; Ma et al., 2008). PCNT bildet außerdem einen Komplex mit IFT-Proteinen (*Intraflagellar Transport*) und Polycystin-2 und ist somit an der Entstehung der primären Zilien in Säugetierzellen beteiligt (Jurczyk et al., 2004).

PCNT interagiert über die N-terminale Region mit den GCP2/3-Untereinheiten des γ -Tubulin-Ringkomplexes (γ -TuRC). RNAi-vermittelte Depletion von PCNT führt zu einer statistisch signifikanten, jedoch nicht vollständigen Delokalisation des γ -TuRC vom Zentrosom und somit zu einer Desorganisation des mitotischen Spindelapparates (Zimmerman et al., 2004). In Hefezellen und einigen Säugetierzelllinien, aber nicht in *Drosophila*, resultiert eine PCNT-Depletion weiterhin in der Aktivierung mitotischer *Checkpoints* und der Einleitung der Apoptose (Flory et al., 2002; Martinez-Campos et al., 2004; Zimmerman et al., 2004).

Untersuchungen von PCNT-defizienten MOPD II-Zelllinien zeigten eine abnormale Morphologie des mitotischen Spindelapparates, eine vorzeitige Separation der

Schwesterchromatiden und variable Mosaik-Aneuploidie, wobei diese Defekte möglicherweise Apoptose und somit die Eliminierung der betroffenen Zellen induzieren (Rauch et al., 2008). PCNT-defiziente Zellen von Seckel-Syndrom-Patienten weisen hingegen Defekte des UV-induzierten G₂/M-Arrestes auf, der von der ATR-Signalkaskade ausgelöst wird (Griffith et al., 2008). Diese Daten weisen somit auf eine neue Funktion von PCNT in der Regulation des *DNA damage Checkpoints* hin. Die Autoren spekulieren dabei über eine Rolle von PCNT für die zentrosomale Lokalisation von Chk1, die mit der Funktion von Chk1 in der Regulation des G₂/M-Checkpoints einhergehen könnte (Abb. 1-8) (Krämer et al., 2004; Löffler et al., 2007).

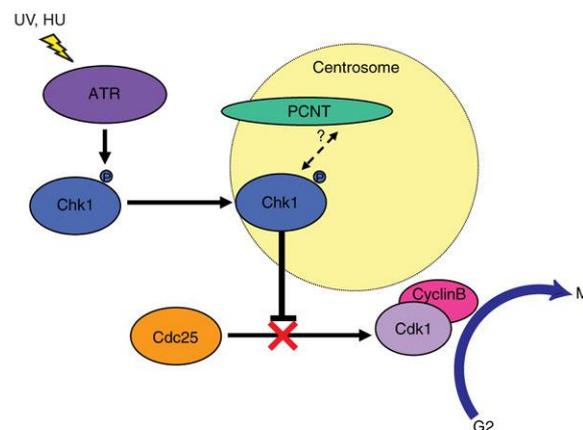


Abbildung 1-8: Potentielle Funktion von PCNT in ATR-vermittelter Regulation des G₂/M-Checkpoints. Durch UV-Bestrahlung oder Behandlung der Zellen mit Hydroxyurea (HU) aktivierte ATR-Kinase phosphoryliert die Effektor-Kinase Chk1. Diese aktivierende Phosphorylierung von Chk1 ist erforderlich für die zentrosomale Chk1-Akkumulation nach einer DNA-Schädigung (Niida et al., 2007). PCNT vermittelt möglicherweise die zentrosomale Lokalisation von Chk1 über eine direkte oder indirekte Interaktion. Das zentrosomen-assoziierte Chk1 inhibiert Cdc25B und verhindert dadurch die Aktivierung von Cyclin B/Cdk1 und somit die Initiierung der Mitose. (Aus Griffith et al., 2008, mit Genehmigung).

1.6. Zielsetzung der Arbeit

Die Ähnlichkeit des klinischen Phänotyps der autosomal-rezessiven Entwicklungsstörungen, die mit dem Funktionsverlust von PCNT bzw. MCPH1 einhergehen, deutet darauf hin, dass diese Proteine in ähnliche, wenn nicht die gleichen zellulären Mechanismen involviert sind, die Körper- und Gehirngröße determinieren. Tatsächlich wurde für beide Proteine eine zentrosomale Lokalisation sowie eine Beteiligung an der zellulären Antwort auf DNA-Schädigung und an der Regulation mitotischer Prozesse beschrieben. Darüber hinaus führt der Verlust von MCPH1 bzw. PCNT zu einer Deregulation des *G₂/M-Checkpoint*. Eine Interaktion zwischen MCPH1 und Chk1, einer Kinase, die bei diesen Prozessen eine wesentliche Rolle spielt, wurde bereits experimentell belegt. Während bekannt ist, dass zentrosomen-assoziiertes Chk1 die Initiierung der Mitose reguliert, sind die Mechanismen der Rekrutierung dieses in erster Linie nukleären Proteins an das Zentrosom weitgehend ungeklärt.

Auf Grundlage dieser Informationen war es Gegenstand der vorliegenden Arbeit zu untersuchen, ob MCPH1 und/oder PCNT an der zentrosomalen Rekrutierung von Chk1 beteiligt sind. Hierzu sollte zunächst mit Hilfe von fluoreszenzmikroskopischen und proteinbiochemischen Methoden die subzelluläre Lokalisation dieser Proteine untersucht bzw. bestätigt werden. Des Weiteren sollte geklärt werden, ob MCPH1, Chk1 und PCNT miteinander interagieren bzw. ob sie in einem Proteinkomplex in der Zelle vorliegen. Auch im Hefe-Zwei-Hybrid-System sollten die Interaktionen untersucht sowie neue potentielle Interaktionspartner identifiziert werden.

Der zweite Schwerpunkt dieser Arbeit lag in der Aufklärung funktioneller Zusammenhänge zwischen MCPH1, PCNT und Chk1. Dabei sollte im Speziellen untersucht werden, inwiefern der Funktionsverlust von MCPH1 bzw. PCNT die Zellzyklusprogression kompromittiert. Diese Aspekte sollten unter Verwendung fluoreszenzmikroskopischer und proteinbiochemischer Methoden, sowie mittels durchflusszytometrischer Zellzyklusanalysen und mikroskopischer Zeitraffer-Aufnahmen von sich teilenden Zellen analysiert werden. Dabei sollten die Untersuchungen an MCPH1- und PCNT-defizienten Zellen von Patienten mit Primärer Mikrozephalie bzw. MOPD II durchgeführt und in einer Modell-Zelllinie durch RNAi-vermittelte Depletion der beiden Proteine reproduziert werden.

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Bakterienstämme

Tabelle 2-1: Verwendete Stämme von *Escherichia coli*

Stamm	Genotyp	Referenz
<i>Escherichia coli</i> XL1-Blue	<i>endA1 supE44 thi-1 recA1 hsdR17 gyrA96 relA1 lac</i> [F' <i>proAB lacIqZ_M15</i> Tn10 (Tet ^r)]	Stratagene, La Jolla, USA
<i>Escherichia coli</i> BL21-CodonPlus (DE 3)-RIPL	F ⁻ <i>ompT hsdS</i> (_{RB⁻ MB⁻}) <i>dcm</i> ⁺ Tet ^r <i>gal</i> λ(DE3) <i>endA Hte</i> [<i>argU proL Cam</i> ^r] [<i>argU ileY leuW</i> Strep/Spec ^r]	Stratagene, La Jolla, USA
<i>Escherichia coli</i> M15 [pREP4]	<i>nal</i> ^S , <i>str</i> ^S , <i>rif</i> ^S , <i>lac</i> ⁻ , <i>ara</i> ⁻ , <i>gal</i> ⁻ , <i>mtl</i> ⁻ , F ⁻ , <i>recA</i> ⁺ , <i>uvr</i> ⁺ , <i>lon</i> ⁺	Qiagen, Hilden

2.1.2. Zelllinien

Tabelle 2-2: Verwendete Zelllinien

Zelllinie	Beschreibung	Referenz
U2OS	humane Osteosarkomzellen (ATCC HTB-96)	(Ponten und Saksela, 1967)
LBC	humane EBV-immortalisierte B-Lymphozyten eines gesunden Spenders (Kontrolle)	(Rauch et al., 2008)
MCPH1 ^{427insA}	humane EBV-immortalisierte B-Lymphozyten eines Patienten mit Primärer Mikrocephalie (homozygote Mutation im MCPH1-Gen)	(Trimborn et al., 2004)
PCNT ^{3109G>T}	humane EBV-immortalisierte B-Lymphozyten eines Patienten mit MOPDII (homozygote Mutation 3109G>T im PCNT-Gen)	(Rauch et al., 2008)
WT7	Mit Tetracyclin-induzierbarem GFP-Chk1-PACT-Konstrukt stabil transfizierte U2OS	(Krämer et al., 2004)

Zelllinie	Beschreibung	Referenz
KD9	Mit Tetracyclin-induzierbarem GFP-Chk1 (ohne Kinaseaktivität)-PACT- Konstrukt stabil transfizierte U2OS	(Krämer et al., 2004)
DT 40	B-Lymphozyten des Huhns	(Zachos et al., 2003)
DT 40 ^{Chk1-/-}	B-Lymphozyten des Huhns, Chk1-Nullmutante	(Zachos et al., 2003)

2.1.3. Hefestämme

Tabelle 2-3: Im *Yeast-Two-Hybrid-Screen* eingesetzte Hefestämme

Stamm	Genotyp	Referenz
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> AH109	MATa, trp1-901, leu2-3, 112, ura3-52, his3-200, gal4 Δ , gal80 Δ , LYS2::GAL1 ^{UAS} -GAL1 ^{TATA} -HIS3, GAL2 ^{UAS} -GAL2 ^{TATA} -ADE2, URA3::MEL1 ^{UAS} -MEL1 ^{TATA} -lacZ, MEL1	Clontech, Heidelberg
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> Y187	MAT α , ura3-52, his3-200, ade2-101, trp1-901, leu2-3, 112, gal4 Δ , met ⁻ , gal80 Δ , MEL1, URA3::GAL1 ^{UAS} - GAL1 ^{TATA} -lacZ	Clontech, Heidelberg

2.1.4. Expressionskonstrukte

Tabelle 2-4: Kommerziell erhältliche Expressionsvektoren und im Rahmen der Arbeit hergestellte Expressionskonstrukte

Name	Beschreibung	Bezugsquelle
pEGFP-C1	Expressionsvektor für Säugetierzellen, N-terminales GFP-Tag	Clontech, Heidelberg
pEGFP-N1	Expressionsvektor für Säugetierzellen, C-terminales GFP-Tag	Clontech, Heidelberg
pCMV-Tag4A	Expressionsvektor für Säugetierzellen, C-terminales Flag-Tag	Stratagene, La Jolla, USA
pQc-His6	<i>E.coli</i> Expressionsvektor, C-terminales 6xHistidin-Tag	AG Prof. Dr. H. Zentgraf, DKFZ Heidelberg
pGADT7	Hefeexpressionsvektor, GAL4 DNA-Aktivierungsdomäne	Clontech, Heidelberg

Name	Beschreibung	Bezugsquelle
pGBKT7	Hefeexpressionsvektor, GAL4 DNA-Bindungsdomäne	Clontech, Heidelberg
GFP-MCPH1	MCPH1 cDNA (NM_024596) im pEGFP-C1-Vektor	im Rahmen dieser Arbeit hergestellt
CCDC13-GFP	CCDC13 cDNA (NM_144719.3) im pEGFP-N1-Vektor	im Rahmen dieser Arbeit hergestellt
CCDC13-FLAG	CCDC13 cDNA (NM_144719.3) im pCMV-Tag4A-Vektor	im Rahmen dieser Arbeit hergestellt
pGADT7-MCPH1	MCPH1 cDNA (NM_024596) im pGADT7-Vektor	im Rahmen dieser Arbeit hergestellt
pGBKT7-MCPH1	MCPH1 cDNA (NM_024596) im pGBKT7-Vektor	im Rahmen dieser Arbeit hergestellt
pGADT7-Chk1	Chk1 cDNA (BC004202.2) im pGADT7-Vektor	im Rahmen dieser Arbeit hergestellt
MCPH1-FLAG	MCPH1 cDNA (NM_024596) im pCMV-Tag4A-Vektor	im Rahmen dieser Arbeit hergestellt
MCPH1-1_254aa.HIS	MCPH1 cDNA-Fragment (1-762bp) im pQc-His6-Vektor	im Rahmen dieser Arbeit hergestellt
GFP-Chk1	Chk1 cDNA (BC004202.2) im pEGFP-C1-Vektor	AG Prof. Dr. A. Krämer, DKFZ Heidelberg
pAcGFP_MCPH1	MCPH1 cDNA im pAcGFP1-C1 Vektor (Clontech)	J. Bartek, Institute of Cancer Biology and Centre for Genotoxic Stress Research, Kopenhagen, Dänemark

2.1.5. Oligonukleotide

Tabelle 2-5: Oligonukleotide, die für die PCR-Amplifikationen verwendet wurden

Name	Sequenz
Chk1_EcoR1	5'-ACAGAATTCATGCAGTGCCCTTTGTGGAA-3'
Chk1_Sal1	5'- ACAGTCGACTCATGTGGCAGGAAGCCAAAT-3'
Chk1_Xho1	5'-ACACTCGAGTCATGTGGCAGGAAGCCAAAT-3'
BamH1_MCPH1(1)	5'-ACAGGATCCATGGCGGCCCCCATCCTGAAAGAT-3'
HindIII_MCPH1(1)	5'-ACAAAGCTTTTCCAACCTTCCTTCCTGATTTC-3'
CCDC13_GFPf	5'-ACAGAATTCTGATGGCAGCAGATGAAAGCTCA-3'

Name	Sequenz
CCDC13_GFPr2	5'-ACAGTCGACTGTTGCTTGCCTGTCTTCTGCT-3'
CCDC13_BDF	5'-ACAGAATTCATGGCAGCAGATGAAAGCTCA-3'
CCDC13_BDR	5'-ACAGTCGACGCTATTGCTTGCCTGTCTTCT -3'
CCDC13_CMVr	5'-ACAGTCGACTTGTGCTTGCCTGTCTTCTGCT-3'
MCPH1_EcoR1	5'-ACAGAATTCATGGCGGCCCCCATCCTGAAA-3'
MCPH1_Xho1	5'-ACACTCGAGTCATTGTGACAATAGGTAGTT-3'
MCPH1r2	5'-ACAGTCGACTCATTGTGACAATAGGTAGTT-3'
MCPH1_pCMVr	5'-ACAGTCGACTTGTGACAATAGGTAGTTTTCA-3'
MCPH1_EGFPC1f	5'-ACACTCGAGCTATGGCGGCCCCCATCCTGAA-3'
MCPH1_EcoR1niF	5'-ACAGAATTCTGATGGCGGCCCCCATCCT-3'

Tabelle 2-6: Für die Transfektion von Säugetierzellen verwendete doppelsträngige siRNA-Oligonukleotide

Name	Sequenz (<i>sense</i>)
MCPH1 siRNA	5'-AGGAAGUUGGAAGGAUCCAdTdT-3'
PCNT siRNA	5'-GCAGCUGAGCUGAAGGAGAdTdT-3'
Chk1 siRNA	5'-GGACUUCUCUCCAGUAAACdTdT-3'
Luciferase siRNA	5'-UAAGGCUAUGAAGAGAUACdTdT-3'
CCDC13 siRNA	5'-GCUGCUGUCAAGUGAGAUGdTdT-3'

Mit Ausnahme von CCDC13 siRNA (Ambion, Darmstadt) und Chk1 siRNA (Dharmacon, Chicago, USA) wurden die eingesetzten synthetischen Oligonukleotide von Eurofins MWG Operon, Ebersberg bezogen.

2.1.6. Antikörper

Primärantikörper

Tabelle 2-7: Zusammenfassung der verwendete Primärantikörper

Antigen	Immunisierte Spezie	Klon	Typ	Referenz
Actin	Kaninchen	I-19	polyklonal	Santa Cruz, Heidelberg
BrdU	Ratte	BU1/75	monoklonal	Abcam, Cambridge, USA
BrdU	Maus	B44	monoklonal	BD Biosciences, Heidelberg
Cdc25B	Kaninchen	C-20	polyklonal	Santa Cruz, Heidelberg
Cdk1	Maus		monoklonal	Santa Cruz, Heidelberg
Centrin	Maus	20H5	monoklonal	J, Salisbury, Mayo Klinik, Rochester, USA
CEP170	Maus	71372	monoklonal	E.A. Nigg, University von Basel, Basel, Schweiz
Chk1	Maus	DCS310	monoklonal	Sigma-Aldrich, München
c-Myc	Maus		monoklonal	H. Herrmann-Lerdon, DKFZ, Heidelberg
Cyclin B1	Maus	GNS1	monoklonal	Santa Cruz, Heidelberg
GFP	Maus	B-2	monoklonal	Santa Cruz, Heidelberg
HA	Kaninchen	Y-11	polyklonal	Santa Cruz, Heidelberg
Lamin A	Maus		monoklonal	H. Herrmann-Lerdon, DKFZ, Heidelberg
MCM7	Maus	141.2	monoklonal	Santa Cruz, Heidelberg
MCPH1	Ziege		polyklonal	R&D Systems, Wiesbaden- Nordenstadt
Nek2	Maus	20	monoklonal	BD Biosciences, Heidelberg

Antigen	Immunisierte Spezies	Klon	Typ	Referenz
Pericentrin	Kaninchen		polyklonal	Abcam, Cambridge, USA
P-S10-Histon H3	Kaninchen		polyklonal	Millipore, Schwalbach am Taunus
pS230-Cdc25B	Kaninchen	SE4394	polyklonal	(Schmitt et al., 2006)
P-Y15-Cdk1	Kaninchen		polyklonal	Calbiochem/Merck Chemicals, Nottingham, England
γ -Tubulin	Maus	TU-30	monoklonal	Exbio/AXXORA, Lörrach
γ -Tubulin	Kaninchen		polyklonal	Sigma-Aldrich, München
α -Tubulin	Maus	DM1A	monoklonal	Sigma-Aldrich, München

Sekundärantikörper

Tabelle 2-8: Eingesetzte Sekundärantikörper

Antigen	Immunisierte Spezies	Konjugat	Referenz
Maus IgG (H+L)	Ziege	Meerrettich-Peroxidase (HRP)	Santa Cruz, Heidelberg
Kaninchen IgG (H+L)	Ziege	Meerrettich-Peroxidase (HRP)	Santa Cruz, Heidelberg
Ziegen IgG (H+L)	Esel	Meerrettich-Peroxidase (HRP)	Santa Cruz, Heidelberg
Maus IgG (H+L)	Ziege	Alexa568	Invitrogen, Karlsruhe
Maus IgG (H+L)	Ziege	Alexa488	Invitrogen, Karlsruhe
Kaninchen IgG (H+L)	Ziege	Alexa568	Invitrogen, Karlsruhe
Kaninchen IgG (H+L)	Ziege	Alexa488	Invitrogen, Karlsruhe
Maus IgM (μ -Kette)	Ziege	Meerrettich-Peroxidase (HRP)	Sigma-Aldrich, München

Antigen	Immunisierte Spezie	Konjugat	Referenz
Maus IgM (μ -Kette)	Ziege	Cy3	Dianova, Hamburg
Ratte IgG (H+L)	Ziege	Cy3	Dianova, Hamburg

2.1.7. Enzyme und Reaktionskits

Restriktionsendonukleasen	New England Biolabs, Bad Schwalbach
T4 DNA Ligase	New England Biolabs, Bad Schwalbach
RNase A, DNase-frei	Qiagen, Hilden
DNase I recombinant, RNase-frei	Roche Diagnostics, Mannheim
Phusion High-Fidelity DNA Polymerase	New England Biolabs, Bad Schwalbach
SuperSignalWest Pico Chemiluminescent Substrate	Thermo Fisher Scientific, Bonn
Fugene 6 Transfektionsreagenz	Roche Diagnostics, Mannheim
Oligofectamine Transfektionsreagenz	Invitrogen, Karlsruhe
96 MP Solution Kit 10 μ l	PEQLAB Biotechnologie, Erlangen
QIAprep Spin Miniprep Kit	Qiagen, Hilden
QIAQuick PCR Purification/Gel Extraction/Nucleotide Removal Kit	Qiagen, Hilden
Midi/Maxi Plasmid Purification Kit	Qiagen, Hilden
Quick Start™ Bradford Protein Assay	Bio-Rad Laboratories, München

2.1.8. Molekulargewichtsstandards

Precision Plus Protein dual color Molekulargewichtsstandard, gefärbt (Bio-Rad Laboratories, München)

Molekulare Massen (kDa): 10, 15, 20, 25, 37, 50, 75, 100, 150, 250

O`Gene ruler 1kb DNA Leiter (Fermentas, StLeon Rot)

Fragmentgrößen (bp): 250, 500, 750, 1000, 1500, 2000, 2500, 3000, 3500, 4000, 5000, 6000, 8000, 10000

2.1.9. Medien und Lösungen

2.1.9.1. Medien zur Kultivierung von Bakterien

LB-Medium	1% (w/v) Trypton 0,5% (w/v) Hefeextrakt 171 mM NaCl, pH 7,2
LB-Agar	LB-Medium 1,5% (w/v) Agar
SOC-Medium	2% (w/v) Bactopepton 0,5% (w/v) Hefeextrakt 10 mM NaCl 2,5 mM KCl 10 mM MgCl ₂ 10 mM MgSO ₄ 20 mM Glukose

2.1.9.2. Medien und Lösungen für die Zellkultur

DMEM	GIBCO/Invitrogen, Karlsruhe
RPMI 1640	GIBCO/Invitrogen, Karlsruhe
OptiMEM	GIBCO/Invitrogen, Karlsruhe
Fötales Kälberserum (FKS)	GIBCO/Invitrogen, Karlsruhe

Hühner Serum	Sigma-Aldrich, München
PBS	137 mM NaCl 2,7 mM KCl 10 mM Na ₂ HPO ₄ 1,7 mM KH ₂ PO ₄ pH 7,4
PBS/EDTA	0,5 mM EDTA in PBS
Trypsin/EDTA-Lösung	0,25% (w/v) Schweinetrypsin (Invitrogen, Karlsruhe) in PBS/EDTA
Penicillin/Streptomycin	50 Units/ml bzw. 50 µg/ml, GIBCO/Invitrogen, Karlsruhe

2.1.9.3. *Medien zur Kultivierung von Hefezellen*

YPD-Medium	Sigma-Aldrich, München 50 mg in 1 l H ₂ O lösen und bei 121°C 15 min autoklavieren. Für die Herstellung von YPD Platten das Medium mit 2% (w/v) Agar versetzen.
YPDA-Medium	YPD-Medium mit 0,003% Adenin- hemisulfat. Die Zugabe von sterilem Adeninhemisulfat erfolgt nach dem Autoklavieren, wenn das Medium auf 55°C abgekühlt ist.
Minimal synthetic defined (SD) bases	BD Biosciences Clontech, USA 26,7 mg in 1 l H ₂ O lösen, mit DO Supplement versetzen und bei 121°C 15 min autoklavieren. Für die Herstellung von SD-Platten das Medium mit 2% (w/v) Agar versetzen.

Dropout (DO) Supplement	BD Biosciences Clontech, USA
	-Trp DO Supplement: 0,74 g/Liter Minimal SD Base
	-Leu DO Supplement: 0,69 g/Liter Minimal SD Base
	-Leu/-Trp DO Supplement: 0,64 g/Liter Minimal SD Base
	-Leu/-His DO Supplement: 0,67 g/Liter Minimal SD Base
	-Leu/-Trp/-His DO Supplement: 0,62 g/Liter Minimal SD Base
	-Leu/-Trp/-His/-Ade DO Supplement: 0,60 g/Liter Minimal SD Base
	-Trp/-His DO Supplement: Leu/-Trp/-His DO Supplement + 0,1 g/Liter L-Leucin (Sigma-Aldrich)

2.1.9.4. *Lösungen für Herstellung und Transformation kompetenter Hefezellen*

LiAc/TE- Lösung	100 mM Lithiumacetat 10 mM Tris/HCl, pH 8,0 1 mM EDTA
PEG/LiAc/TE- Lösung	40% (v/v) PEG 100 mM Lithiumacetat 10 mM Tris/HCl, pH 8,0 1 mM EDTA
DMSO	Serva, Heidelberg

2.1.9.5. *Puffer und Lösungen für die Gelelektrophorese*

TAE	40 mM Tris/HCl, pH 8,0 0,12% Essigsäure konz. 1 mM EDTA
------------	---

6 x DNA-Ladepuffer	200 mM EDTA 100 mM Tris/HCl, pH 7,5 0,01% (w/v) Bromphenolblau 0,01% Xylencyanol 30% Ficoll
SDS-Laufpuffer	380 mM Glycin 50 mM Tris 0,1% (w/v) SDS
2xSDS-Ladepuffer	80 mM Tris/HCl, pH 6,8 10% β -Mercaptoethanol 2% (w/v) SDS 10% Glycerin 0,002% Bromphenolblau
SDS-Transferpuffer	48 mM Tris 39 mM Glycin 0,037% (w/v) SDS 20% (v/v) Methanol

2.1.9.6. *Sonstige Puffer und Lösungen*

TBS	25 mM Tris/HCl, pH 7,4 137 mM NaCl 2,7 mM KCl
TBST	0,1% (v/v) Tween 20 in TBS
PBST	0,1% (v/v) Tween 20 in PBS
Coomassie-Färbelösung	50% (v/v) Methanol 10% (v/v) Essigsäure
Coomassie-Entfärbelösung	10% (v/v) Methanol 10% (v/v) Essigsäure

RIPA-Puffer	50 mM Tris/HCl, pH 8,0 150 mM NaCl 1% Nonidet P40 1 mM EDTA 5 mM NaF 1 mM Na ₃ VO ₄ 2 Tabletten /100ml Proteaseinhibitor-Cocktail <i>Complete</i> , Roche Diagnostics
Cracking Puffer	8 M Harnstoff 5% (v/v) SDS 40 mM Tris/HCl, pH6,8 0,1 mM EDTA 0,4 mg/ml Bromphenolblau 0,9% β-Mercaptoethanol 9 μM Pepstatin A (Sigma) 2 μM Leupeptin (Sigma) 9 mM Benzamidin (Sigma)
Coomassie-Färbelösung	50% (v/v) Methanol 10% (v/v) Essigsäure
Coomassie-Entfärbelösung	10% (v/v) Methanol 10% (v/v) Essigsäure

2.1.10. Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

Die Standardchemikalien in analytischer Reinheit wurden von den Firmen Sigma-Aldrich (München), Merck (Darmstadt), GERBU Biochemicals GmbH (Gaiberg), Carl Roth GmbH (Karlsruhe) und VWR International GmbH (Darmstadt) bezogen.

Allgemeine gebräuchliche Verbrauchsmaterialien wurden von Starlab (Ahrensburg), Greiner (Nürtingen), Becton Dickinson GmbH (Heidelberg), Sarstedt (Nümbrecht-Rommelsdorf) und Eppendorf (Hamburg) erworben.

2.1.11. Detergenzien

Nonidet P-40 (10%) peroxidfrei	Genaxxon Bioscience, Ulm
Triton X-100	Sigma-Aldrich, München
Tween 20	Sigma-Aldrich, München

2.1.12. Geräte

Tabelle 2-9: Auflistung der verwendeten Laborgeräte

Laborgeräte

Analysenwaage CP2202S	Sartorius, Goettingen
Agarosegelkammern	Biorad, München
Bakterienschüttler	Edmund Bühler, Tübingen
BioStation IM Live Cell Recorder ausgestattet mit DS-2MBWc Kamera	Nikon Instruments Inc., Melville, USA
Brutschrank	Memmert, Schwabach
FACScan	Becton Dickinson, Heidelberg
Feinwaage LA120S	Sartorius, Goettingen
Film Entwicklermaschine	AGFA, St. Catharines, Canada
Fluoreszenzmikroskop Axiovert 200M ausgestattet mit Axio Cam MRm	Zeiss, Oberkochen
FPLC System	GE Healthcare, München
Gefrierschränke -20°C	Liebherr, Ochsenhausen
Gefrierschränke -80°C	Sanyo, München
Gel-Dokumentationsanlage	Intas, Göttingen
Heizplatte mit Magnetrührer MR3000	Heidolph, Schwabach
Konfokales Laser-Scanning Mikroskop LSM 710	Zeiss, Oberkochen
Konfokales Laser-Scanning Mikroskop SP2	Leica, Wetzlar
Kühlinkubator	Incutec, Mössingen
Kühlschränke	Liebherr, Ochsenhausen; Bosch, Stuttgart
Microwellengerät	Sharp, Hamburg

Laborgeräte

Mini Protean III Cell	Biorad, München
Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell	Biorad, München
pH-Meter SevenMulti	Mettler-Toledo, Giessen
Bio Photometer	Eppendorf, Hamburg
Pipetboy	Integra Biosciences, Fernwald
Pipetten	Abimed, Langenfeld
Rotator	Dunn Labortechnik, Asbach
Schüttelinkubator Thermomixer compact	Eppendorf, Hamburg
Spannungsquelle EV215	Consort, Turnhout, Belgien
Spectrophotometer nanoDrop	PeqLab Biotechnologie GmbH, Erlangen
Sterilbank	Heraeus, Hanau
Thermocycler „Mastercycler personal“	Eppendorf, Hamburg
Ultrazentrifuge L8-M mit SW28 Rotor	Beckman Coulter GmbH, Krefeld
UV-Tisch	Konrad Benda, Wiesloch
Vortex	Neolab, Heidelberg
Wasserbad	Memmert, Schwabach
Wippschüttler	Neolab, Heidelberg
Zellkulturbrutschränke	Heraeus, Hanau
Zentrifuge 5417R	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge Megafuge 1.0R	Heraeus, Hanau
Zentrifuge Sorvall RC6+ mit SA300 bzw. SH3000 Rotor	Thermo Fisher Scientific, Waltham, U.S.A.
Zytozentrifuge Shandon Cytospin3	Thermo Fisher Scientific, Waltham, U.S.A.

2.1.13. Software

Bildaufnahme und -bearbeitung

Axiovision 4.7.2	Carl Zeiss, Oberkochen
Leica Confocal Software LCS	Leica, Wetzlar
ImageJ 1.40g	W. Rasband, National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA
Adobe Photoshop CS3	Adobe Systems Inc.
CellQuest	BD Biosciences, Heidelberg

Sequenzanalyse

Vector NTI Advance 10	Invitrogen, Karlsruhe
BLAST	http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi
Ensemble	http://www.ensembl.org/index.html
ExPASy Proteomics	http://expasy.org/

Sonstige

Microsoft Office 2007	www.microsoft.com
-----------------------	--

2.2. Methoden

2.2.1. Molekularbiologische Methoden

2.2.1.1. DNA-Analyse

2.2.1.1.1. Agarose-Gelelektrophorese

Mittels der Gelelektrophorese wurde ein Gemisch von DNA-Molekülen im elektrischen Feld über ein mit 1µl/ml Ethidiumbromid versetztes 1% Agarosegel aufgetrennt. Als Laufpuffer wurde der TAE-Puffer verwendet.

Vor der Elektrophorese wurden die DNA-Proben mit 6 x DNA-Ladepuffer versetzt. Der negativ geladene Farbstoff Bromphenolblau wandert in einem Spannungsfeld schneller als

alle DNA-Fragmente, die kleiner als 300 bp sind, und zeigt somit die Front der wandernden DNA-Proben an. Zur Größenbestimmung der DNA-Fragmente wurde in mindestens eine Auftragstasche ein Größenstandard geladen.

Die Auftrennung erfolgte bei einem analytischen Agarosegel für 45 min bei konstant 100 Volt bzw. für 2 h bei konstant 50 Volt, um hohe Trennleistungen bei präparativen Gelen zu erreichen. Die Gele wurden auf einem UV-Leuchttisch ausgewertet, wobei die orange Fluoreszenz des mit der doppelsträngigen DNA interkalierenden Ethidiumbromids detektiert und dokumentiert wurde.

2.2.1.1.2. DNA-Konzentrationsbestimmung

Die Bestimmung der DNA-Konzentration in einer Lösung erfolgte mittels eines Photometers bei einer Wellenlänge von 260 nm in einer 100 µl Quarzküvette. Die Qualität der DNA-Probe wurde durch eine zusätzliche Messung der optischen Dichte bei 280 nm überprüft. Der Quotient OD_{260}/OD_{280} gibt Aufschluss über den Reinheitsgrad der DNA-Lösung.

Der gemessene Wert für die Absorption bei 260 nm wurde in die Formel für die Berechnung der Konzentration c einbezogen:

$$c[\mu\text{g/ml}] = OD_{260} \times V \times F,$$

wobei V der Verdünnungsfaktor ist und für den Multiplikationsfaktor F folgende Beziehung gilt: $OD_{260} = 1,0$ entspricht einer Konzentration von 50 µg/ml doppelsträngiger DNA.

2.2.1.1.3. DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierung doppelsträngiger DNA basiert auf dem Prinzip der Didesoxy-Kettenterminations-Methode von Sanger (Sanger et al., 1977). Die Sequenzierungen der aufgereinigten Plasmid-DNA wurden von der Firma GATC Biotec AG (Konstanz, Deutschland) durchgeführt. Die erhaltenen Nukleotidsequenzen wurden mit Hilfe der Software Vector NTI Advance 10 ausgewertet. Ein Vergleich der Sequenzen mit bereits bekannten Sequenzdaten erfolgte mit Hilfe von der BLAST-Datenbank.

2.2.1.2. DNA-Aufreinigung

2.2.1.2.1. Isolierung von DNA aus Agarosegelen

Die Isolierung von DNA aus Agarosegelen erfolgte unter Verwendung des „QIAQuick PCR Purification/Gel Extraction/Nucleotide Removal Kits“. Dafür wurden die DNA-Banden mit einem sauberen Skalpell unter UV-Licht geringer Intensität aus dem Gel ausgeschnitten und die DNA nach den Anweisungen des Herstellers extrahiert: Die DNA wurde nach dem Auflösen der Agarose bei 50°C in einem chaotropen Puffer reversibel an eine Silikamatrix gebunden und die eventuell vorhandenen Verunreinigungen wurden durch Waschen mit ethanolhaltigem Puffer entfernt. Anschließend wurde die gereinigte DNA in 10 mM Tris/HCl pH 8,0 oder H₂O eluiert. Die DNA-Lösung wurde bei -20°C gelagert.

2.2.1.2.2. Ethanolfällung von DNA

Durch die Fällung der DNA mit Ethanol wurde die Nukleinsäure von Verunreinigungen wie z.B. Salzen und Proteinen getrennt. Die Präzipitation der Nukleinsäure erfolgte durch Versetzen der DNA-haltigen Lösung mit 0,1 Volumenteilen 3 M Natriumacetat (pH 5,2) sowie mit 2,5 Volumenteilen eiskalten 100%igen Ethanol. Nach 30 min Inkubation bei -20°C wurde die präzipitierte DNA durch Zentrifugation bei 20000 x g für 30 min bei 4°C pelletiert. Nach dem Entfernen des Überstandes wurde das DNA-Pellet mit 70%igem Ethanol gewaschen, um überschüssige Salze zu entfernen. Nach einer zweiten Zentrifugation bei 20000 x g für 5 min wurde der Überstand quantitativ entfernt. Das Pellet wurde dann für 5 min bis 10 min luftgetrocknet und anschließend in 10 mM Tris/HCl pH 8,0 oder H₂O resuspendiert.

2.2.1.3. Transformation chemisch kompetenter *E. coli*-Bakterien

Zur Standardtransformation wurden chemisch kompetente Bakterien langsam auf Eis aufgetaut und mit der DNA-haltigen Lösung (5 - 50 ng DNA) für 30 min auf Eis inkubiert. Es folgte ein Hitzeschock für 3 min bei 37°C, sofort danach wurden die Zellen für 2 min auf Eis abgekühlt und in 1 ml 37°C warmen SOC-Medium aufgenommen. Anschließend wurden die Bakterien für 1 h unter Schütteln bei 37°C inkubiert. Danach wurden die transformierten *E.coli* für 2 min bei 1000 x g zentrifugiert, in 100 µl LB-Medium aufgenommen und auf den

selektiven LB-Agarplatten mit dem entsprechenden Selektions-Antibiotikum ausplattiert. Die Kultivierung der Platten erfolgte über Nacht bei 37°C bis zur Ausbildung einzelner Bakterienkolonien.

2.2.1.4. Plasmid-DNA Präparation aus *E. coli*-Bakterien

2.2.1.4.1. Mini-Präparation

Zur Extraktion von geringen Mengen an Plasmid-DNA aus *E. coli*- Zellen wurde das „QIAprep Spin Miniprep Kit“ verwendet. Dafür wurden 3 ml LB-Medium mit Antibiotikum (100 µg/ml Ampicillin oder 50 µg/ml Kanamycin) zur Selektion auf das Plasmid mit einer plasmidtragenden *E. coli*-Einzelkolonie angeimpft und über Nacht bei 37°C und 215 UpM inkubiert. Die Isolierung der Plasmid-DNA erfolgte entsprechend den Herstellerangaben. Dabei wurden die Bakterien aus der Übernachtskultur sedimentiert und durch alkalische Lyse aufgeschlossen. Die chromosomale DNA wurde denaturiert und im Komplex mit Proteinen und Zelltrümmern präzipitiert. Die in Lösung verbliebene Plasmid-DNA wurde reversibel an eine Silikamatrix gebunden und mit ethanolhaltigem Puffer gewaschen. Anschließend wurde die Plasmid-DNA mit 10 mM Tris/HCl pH 8,0 oder TE-Puffer von der Matrix eluiert. Die Lagerung erfolgte bei -20°C.

2.2.1.4.2. Maxi-Präparation

Die Präparation größerer Mengen hochreiner Plasmid-DNA wurde mit dem „Qiagen Midi/Maxi Plasmid Purification Kit“ nach dem Herstellerprotokoll durchgeführt. Das Grundprinzip der Aufreinigung beruht auf der alkalischen Lyse der Bakterien. Unter alkalischen Bedingungen wurden die chromosomale und die Plasmid-DNA denaturiert, bei Zugabe eines neutralisierenden Kaliumacetat-Puffers wurde jedoch nur die chromosomale DNA mit anderen Zellkomponenten ausgefällt. Die Plasmid-DNA wurde renaturiert und blieb in Lösung. Anschließend wurde sie über eine Anionenaustauschersäule gereinigt und mit 0,7 Volumenteilen Isopropanol präzipitiert. Das resultierende DNA-Pellet wurde in H₂O resuspendiert und die DNA-Konzentration auf 1 µg/µl eingestellt. Die Lagerung erfolgte bei -20°C.

2.2.1.5. Enzymatische Modifikation von DNA

2.2.1.5.1. Restriktionsendonuklease-Verdau

Die DNA wurde mit Typ II-Restriktionsendonukleasen in den vom Hersteller mitgelieferten Puffern verdaut. Für einen analytischen Verdau von DNA wurden in einem 15 µl Ansatz 50 - 250 ng DNA mit 2 U Restriktionsenzym versetzt und für 1 h bei 37°C inkubiert. Bei einem präparativen Verdau wurde eine DNA-Menge von 0,5 - 2 µg in einem 30 µl Ansatz mit 5 U - 10 U Restriktionsenzym über Nacht bei 37°C inkubiert. Die Analyse der Restriktionsfragmente erfolgte mittels Auftrennung durch horizontale Agarose-Gelelektrophorese (vgl. 2.2.1.1.1).

2.2.1.5.2. Ligation

Die Ligation von DNA-Fragmenten wurde unter Verwendung der T4-Ligase von NEB gemäß den Herstellerangaben durchgeführt. Dabei wurde die restriktionsverdaute Vektor-DNA mit einem vierfachen molaren Überschuss an zu inserierender DNA eingesetzt. Die DNA-Fragmente wurden mit 0,1 Volumenteilen des zehnfach konzentrierten T4 DNA-Ligasepuffers und mit 400 U T4 DNA-Ligase in einem Reaktionsvolumen von 20 µl gemischt. Der Ligationsansatz wurde für 2 h bei 24°C und anschließend über Nacht bei 4°C inkubiert.

Die Reaktion wurde durch die Hitzeinaktivierung der Ligase bei 65°C (10 min) gestoppt.

2.2.1.6. Polymerasekettenreaktion

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) ist eine Methode zur enzymatischen Amplifizierung definierten DNA-Abschnitte *in vitro* (Mullis et al., 1986; Saiki et al., 1988). Die Reaktion besteht aus drei Reaktionsschritten: DNA-Denaturierung, Anlagerung der Oligonukleotide und DNA-Synthese, die durch eine thermostabile DNA-Polymerase katalysiert wird. Die exponentielle Vervielfältigung der DNA-Abschnitte wird durch die automatisierte zyklische Wiederholung der Reaktion erzielt.

Mittels PCR wurden für die Herstellung der Expressionskonstrukte die DNA-Fragmente, komplette cDNA von MCPH1, Chk1, CCDC13 bzw. cDNA-Fragment (1-756bp) von MCPH1, mit den gewünschten Restriktionsschnittstellen generiert. Zur Amplifizierung von cDNAs

mittels einer präparativen PCR wurde die Phusion High-Fidelity DNA Polymerase verwendet, die über eine Korrekturlesefunktion (*proof reading*) verfügt. Die PCR-Ansätze wurden wie folgt zusammengesetzt:

Gesamtansatz 50 μ l

Matrizen (template)- DNA	100 ng
Vorwärts- Primer (10 μ M)	1 μ l
Rückwärts- Primer (10 μ M)	1 μ l
dNTP- Mix (10 mM)	1 μ l
5 X Phusion HF Puffer	10 μ l
Phusion DNA-Polymerase	1 U
auf 50 μ l mit PCR-H ₂ O auffüllen	

Die eingesetzten Oligonuklotide (Primer) sind in der Tabelle 2-5 aufgelistet.

Das PCR-Programm bestand aus dem initialen Denaturierungsschritt für 30 sec bei 98°C und 35 Zyklen von 10 sec bei 98°C, 30 sec bei 54°C - 60°C (in Abhängigkeit von dem zu amplifizierenden DNA-Fragment) und 1 min bei 72°C. Darauf folgte die finale Elongation bei 72°C für 5 min und die Abkühlung auf 4°C.

Die PCR-Produkte wurden in einem präparativen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt und anschließend aus dem Gel aufgereinigt (vgl. 2.2.1.1.1 und 2.2.1.2.1.).

2.2.2. Zellbiologische Methoden

2.2.2.1. Zellkulturbedingungen

Die Kultivierung der Zelllinien erfolgte generell in Zellkulturschalen bzw. Zellkulturflaschen bei 37°C in einer 5%igen CO₂-Atmosphäre. Die Zellkulturmedien wurden je nach Zelllinie wie folgt zusammengesetzt:

U2OS	DMEM + 10% (v/v) FKS
LBC	RPMI1640 + 15% (v/v) FKS
MCPH1 ^{427insA}	RPMI1640 + 15% (v/v) FKS
PCNT ^{3109G>T}	RPMI1640 + 15% (v/v) FKS

WT7	DMEM + 10% (v/v) FKS
KD9	DMEM + 10% (v/v) FKS
DT 40	RPMI1640 + 10% (v/v) Hühnerserum
DT 40^{Chk1-/-}	RPMI1640 + 10% (v/v) Hühnerserum

Alle Medien enthielten zusätzlich 0,2 µg/ml Penicillin/Streptomycin (Pen/Strep).

Die adhärent wachsenden Zelllinien U2OS, WT7 und KD9 wurden kurz vor dem Erreichen der 100%igen Konfluenz passagiert. Dabei wurden sie mit PBS pH 7,4 gewaschen und durch maximal fünfminütige Inkubation mit der Trypsin/EDTA-Lösung abgelöst. Anschließend wurden die Zellen in einer geeigneten Verdünnung mit frischem Medium wieder ausgesät. Die Suspensionszelllinien LBC, MCPH1^{427insA}, PCNT^{3109G>T}, DT 40 und DT 40^{Chk1-/-} wurden je nach erreichter Zelldichte alle 3 - 4 Tage passagiert.

2.2.2.2. *Transfektion von Säugetierzellen*

Die Transfektion von adhärent wachsenden Zelllinien mit Plasmid-DNA erfolgte mit Hilfe von FuGENE6 (Roche) gemäß dem Herstellerprotokoll. Die Zellen wurden einen Tag vor der Transfektion so gesplittet, dass sie am Tag der Transfektion eine 70% - 80%ige Konfluenz erreicht haben. In einem Transfektionsansatz wurden 3 µl FuGENE6 Reagenz pro 2 µg Plasmid-DNA eingesetzt.

Die Transfektion von Suspensionszelllinien mit Plasmid-DNA wurde mittels Elektroporation mit dem MicroPorator MP-100 (Peqlab) laut Herstellerangaben durchgeführt. Dabei wurden 1×10^5 Zellen, die einen Tag vor der Transfektion passagiert wurden, für die Transfektion eingesetzt. Die Elektroporation erfolgte bei folgenden Parametereinstellungen: Spannung 1500 V, Pulszahl 3, Pulsweite 10 ms. Pro Transfektionsansatz wurden 1,5 µg Plasmid-DNA eingesetzt.

Die Transfektion von adhärent wachsenden Zelllinien mit siRNA-Oligonukleotiden wurde mit Hilfe von Oligofectamine (Invitrogen) erzielt. Die Transfektion erfolgte in 2 ml Zellkulturschalen mit zu 70% konfluent gewachsenen Zellen. Vor der Transfektion wurden die Zellen mit serum- und antibiotikafreiem DMEM gewaschen und mit 700 µl vom gleichen Medium überdeckt. Pro Transfektion wurden 7 µl Oligofectamine mit 86 µl serumreduziertem Medium (OptiMEM) 7 min bei Raumtemperatur inkubiert und

anschließend mit 140 μM siRNA in 200 μl OptiMEM gemischt. Nach einer Inkubation von 25 min wurde der Transfektionsansatz auf die Zellen pipettiert. Nach 4 bis 5 Stunden Inkubation im Brutschrank wurde den Zellen 500 μl DMEM mit 30% FKS zugegeben und es folgte eine über Nacht Inkubation im Brutschrank. 24 Stunden nach der ersten Transfektion wurden die Zellen erneut mit den gleichen siRNA-Oligonukleotiden transfiziert und für weitere 48 Stunden im Brutschrank kultiviert.

2.2.2.3. Synchronisation von Zellen

Die Synchronisation der humanen B-Lymphoblasten-Zelllinien erfolgte mittels eines Mimosin-Blocks in der G_1 -/frühen S-Phase. Dabei wurden die sich in der logarithmischen Wachstumsphase befindliche Zellen 14 Stunden lang im Mimosin-haltigen Kulturmedium (0,2 mM Mimosin in RPMI 1640 + 15% FKS + 0,2 $\mu\text{g/ml}$ Pen/Strep) kultiviert. Anschließend wurden die Zellen mit RPMI 1640 gewaschen und im frischen Kulturmedium ohne Mimosin für 6 h bis 12 h im Brutschrank inkubiert.

2.2.2.4. Indirekte Immunfluoreszenz

Mittels indirekter Immunfluoreszenz kann die zelluläre Lokalisation bestimmter Proteine untersucht werden. Das Antigen wird dabei durch einen spezifischen primären Antikörper erkannt, der wiederum durch einen mit Fluoreszenzfarbstoff gekoppelten Sekundärantikörper detektiert und sichtbar gemacht wird.

Die adhärent wachsenden Zelllinien wurden auf Deckgläschen ausgesät und kultiviert. Die Zellen wurden mit PBS pH 7,4 gewaschen, in -20°C Methanol:Aceton (1:1 Gemisch) für 7 min fixiert und luftgetrocknet. Von den Suspensionzelllinien wurden mittels der Shandon Cytospin 3 Zentrifuge Zytospin-Präparate hergestellt (800 rpm, 4 min), die unmittelbar nach der Zentrifugation wie oben beschrieben fixiert wurden. Die darauf folgenden Schritte wurden bei RT durchgeführt. Nach der Fixierung wurden die Zellen 10 min mit Permeabilisierungspuffer (1% Triton X-100, 0,5% Nonidet P40, PBS) behandelt und anschließend 30 min im Blockpuffer (0,1% Triton X-100, PBS, 5% BSA) inkubiert. Die Inkubation mit dem Primärantikörper, verdünnt im Blockpuffer, dauerte mindestens 1 Stunde. Anschließend wurden die Zellen dreimal mit PBST gewaschen und für 30 min mit dem Sekundärantikörper im 10% Ziegen Serum in PBST inkubiert. Nach dreimaligem

Waschen mit PBST und einmaligem Waschen mit ddH₂O wurden die Zellen in 100%igem Ethanol dehydriert und mit Vectashield mit DAPI (Linaris Biologische Produkte GmbH, Wertheim) oder To-PRO3 (Invitrogen, Karlsruhe) zur Visualisierung von DNA eingedeckt. Bis zur Auswertung wurden die Präparate bei 4°C gelagert werden.

2.2.2.5. Mikroskopie

2.2.2.5.1. Konfokale Lasermikroskopie

Die Immunfärbungen wurden am Fluoreszenzmikroskop Axiovert 200M (Zeiss) oder am konfokalen Laser-Scanning Mikroskop SP2 (Leica) unter Verwendung von EC Plan-Neofluar 40 x 1.3 Ölimmersionsobjektiv bzw. Plan Apo 63 x 1,32 NA Ölimmersionsobjektiv und der AxioVisionRel.4.7 (Zeiss) bzw. Leica Confocal LCS (Leica) Software ausgewertet. Für die Bildbearbeitung wurde Adobe Photoshop CS3 Software (Adobe Systems Inc.) verwendet.

Der Vorteil von einem konfokalen Lasermikroskop gegenüber einem konventionellen Lichtmikroskop besteht darin, dass die Signale einer Brennebene nicht von den Signalen der Bereiche außerhalb der Brennebene überlagert werden, wodurch eine bessere räumliche Auflösung gewährt wird. Dies ermöglicht eine genaue Aussage bei Kollokalisationsuntersuchungen, da die Signale, die zwar auf einer optischen Achse, aber in unterschiedlichen Fokusebenen liegen, klar voneinander getrennt werden können. Darüber hinaus können mehrere Schichten des Objekts („z-Ebenen“) gescannt werden und die entstandenen optischen Schnitte zu dreidimensionalen Bildern des Objekts bzw. des Signals zusammengefügt werden.

Die Quantifizierung der zentrosomalen Signale von Chk1, PCNT und γ -Tubulin erfolgte am konfokalen Laser-Scanning Mikroskop LSM 710 mit dem Plan Apo 63 x 1,4 NA Ölimmersionsobjektiv. Dabei wurde jedes Zentrosom in 13 z-Ebenen erfasst und mittels des 3D-Berechnungstools der Axiovision 4.7.2 Software (Zeiss) das jeweilige Pixelvolumen bestimmt. Die dreidimensionale Darstellung der Pixelintensität eines repräsentativen zentrosomalen Signals von Chk1 wurde mit Hilfe der ImageJ 1.40g Software (W. Rasband, National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA) erstellt.

2.2.2.5.2. *Live cell imaging*

Um die Teilung der Zellen in Echtzeit zu analysieren, wurden die lebenden Zellen über einen bestimmten Zeitabschnitt lichtmikroskopisch beobachtet (*live cell imaging*). Das *live cell imaging* wurde mittels BioStation IM (Nikon) durchgeführt. Die BioStation IM besteht aus einer begasten und temperierten Inkubationskammer, einem inversen Lichtmikroskop sowie einer DS-2MBWc Kamera. Die adhärent wachsenden Zellen wurden in ein 35 mm Schälchen mit einem Glasboden (μ -dish, Ibidi, Martinsried) ausgesät. Vor Beginn der Aufnahmen wurde das Kulturmedium durch das serumhaltige DMEM-Medium ohne Phenolrot ausgetauscht. Die Zellen wurden 22 h bei 37°C und 5% CO₂ beobachtet, wobei die Bildaufnahmen alle 10 min erfolgten. Die Bildserie wurde unter Verwendung der ImageJ 1.40g Software (W. Rasband, National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA) ausgewertet.

2.2.2.6. *BrdU-Markierung*

Die Markierung der aktiven DNA-Replikationsstellen wurde mit den halogenierten Desoxyuridin (dU)-Derivaten durchgeführt, die als Nukleotidanaloga in die neu synthetisierte DNA einbaut werden. Mit einem dU-spezifischen Antikörper kann man mittels indirekter Immunfluoreszenz diese Stellen in der DNA nachweisen.

Dafür wurden die exponentiell wachsenden Zellen 20 min mit 50 μ M Chlordeoxyuridin (CldU, Sigma-Aldrich) im Kulturmedium inkubiert, um die Zellen zu markieren, die sich in der DNA-Replikationsphase befinden. Anschließend wurde das CldU-haltige Medium durch Waschen mit PBS entfernt und die Zellen in Anwesenheit von 10 μ M Aphidicolin im Medium für 2 Stunden kultiviert. Aphidicolin ist ein reversibler Inhibitor der DNA-Polymerase und bewirkt so einen reversiblen Block der Zellen am G₁/S-Übergang. Die replizierenden Zellen werden dadurch in der S-Phase arretiert. Nach der Inkubation wurden die Zellen mit PBS gewaschen und in 75 mM KCl-Lösung mit 50 μ M Ioddeoxyuridin (IdU) aufgenommen und 10 min inkubiert, um den Einbau dieses Nukleotidanalogs bei einer fortgeführten bzw. neu angefangenen DNA-Synthese zu ermöglichen. Von den Zellen wurden Zytospin-Präparate (vgl. 2.2.2.4) hergestellt, die mindestens 30 min in -20°C Methanol : Eisessig (Verhältnis 3 : 1) fixiert wurden. Die fixierten Zellen wurden mit 2 M HCl 30 min bei RT behandelt, um die DNA zu denaturieren. Anschließend wurden die Zellen mit PBS gewaschen und mit 0,05% Triton X-100 in PBS permeabilisiert. Es folgte eine Inkubation

in der Blocklösung (5% FKS, 0,2% Triton X-100, 0,1% BSA in PBS pH 7,4) für 1 h bei RT und anschließend eine über Nacht Inkubation bei 4°C mit den primären Antikörpern Ratte-anti-BrdU (Klon BU1/75, Abcam, bindet an CldU) und Maus-anti-BrdU (Klon B44, BD Biosciences, bindet sowohl an IdU als auch an CldU) in der Blocklösung. Das Waschen der Zellen in einem hochmolaren Salzpuffer (100 mM Tris pH 8,0; 0,5 M NaCl; 0,5% Tween 20) für 30 min bewirkt eine Dissoziation des Maus-anti-BrdU Antikörpers vom CldU. Die Zellen wurden mit den Sekundärantikörpern Cy3-Ziege-anti-Ratte IgG und Alexa488-Ziege-anti-Maus IgG in Blocklösung für 30 min bei RT inkubiert, dreimal mit PBS gewaschen und mit Vectashield mit DAPI eingedeckt. Die Auswertung der indirekten Immunfluoreszenz erfolgte am Fluoreszenzmikroskop Axiovert 200M (Zeiss).

2.2.2.7. *Durchflusszytometrie*

Mittels Durchflusszytometrie (FACS, *fluorescence activated cell sorting*) können Parameter wie Zellgröße bzw. Granularität der einzelnen Zellen aufgrund ihrer Streulichteigenschaften erfasst werden. Außerdem kann man basierend auf dem Prinzip der indirekten Immunfluoreszenz die Expression bestimmter Antigene innerhalb einer Zellpopulation nachweisen und quantifizieren.

Die FACS-Analysen wurden mit Hilfe von FACScan (BD Biosciences), der mit einem Argon-Laser ausgestattet ist, durchgeführt. Für die Messung der mitotischen Fraktion innerhalb einer Zellpopulation wurde ein Antikörper gegen einen mitotischen Marker - das phospho-Ser10-Histon H3 - eingesetzt. Die exponentiell wachsenden Zellen wurden bei 250 x g abzentrifugiert und das Zellpellet in eiskaltem (-20°C) 70% Ethanol resuspendiert. Die Fixierung im Ethanol dauerte mindestens 1 h bei 4°C im Dunkeln. Anschließend wurden die Zellen mit der Blocklösung (1% FKS in PBS) gewaschen und mit 0,25% Triton X-100 in PBS permeabilisiert. Es folgten eine Inkubation mit dem primären Antikörper Kaninchen-anti-phospho-Ser10-HistonH3 in der Blocklösung für 2 h bei RT, das Waschen mit der Blocklösung und anschließend eine Inkubation mit dem sekundären Alexa488-Ziege-anti-Kaninchen IgG Antikörper in der Blocklösung für 30 min bei RT. Zur Bestimmung der Zellzyklusverteilung innerhalb der Zellpopulation wurden die Zellen mit DNA-interkalierenden Propidiumiodid (PI) gefärbt, sodass man anhand des DNA-Gehalts einer Zelle auf ihr Zellzyklusstadium schließen konnte. Dafür wurden die Zellen in einer PI-

Lösung (10 µg/ml Propidiumiodid, 0,25 mg/ml RNaseA in PBS) 1 h bei RT im Dunkeln inkubiert und schließlich mit FACScan unter Verwendung des Filters 530/30 für Alexa 488 und des Filters > 670 für PI sowie CellQuest Software (BD Biosciences) analysiert.

2.2.3. Proteinchemische Methoden

2.2.3.1. Proteinisolierung aus Säugetierzellen

Für eine stringente Lyse der Zellen wurde der RIPA-Puffer verwendet. Die Zellen wurden vor der Lyse mit PBS gewaschen und anschließend 30 min auf Eis mit dem RIPA-Puffer inkubiert. Zusätzlich wurde die DNA durch eine 23G-Kanüle geschert. Anschließend wurde das Lysat 10 min bei 21000 x g bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und entweder mittels SDS-PAGE analysiert oder bei -80°C gelagert.

2.2.3.2. Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Ermittlung der Konzentration von Proteinen in einer Lösung erfolgte nach der Bradford-Methode mit dem Quick Start™ Bradford Protein Assay (Biorad) entsprechend den Herstellerangaben.

2.2.3.3. TCA-Präzipitation

Zur Fällung von Protein wurde die Proteinlösung mit 100%iger Trichloressigsäure (TCA, Endkonzentration 20%) versetzt und 10 min bei 4°C inkubiert. Die präzipitierten Proteine wurden durch Zentrifugation bei 20000 x g für 10 min bei 4°C pelletiert. Nach dem Entfernen des Überstandes wurde das Protein-Pellet mit 500 µl Aceton zweimal gewaschen und anschließend 5 min bei 20000 x g, 4°C zentrifugiert. Das Pellet wurde in 1 x SDS-Ladepuffer aufgenommen und mit 1/40 Volumen 1 M Tris pH 8,0 versetzt.

2.2.3.4. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die elektrophoretische Auftrennung der Proteingemische erfolgte unter denaturierenden Bedingungen mittels Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) im Tris-Glycin-Puffersystem nach Thomas und Kornberg (Thomas und Kornberg, 1975).

Für die Auftrennung von Proteinextrakten aus den Säugetierzellen wurden 3,8%ige Sammelgele und 8-10%ige Trenngele verwendet. Die Proteinlösungen wurden mit dem zweifach konzentrierten SDS-Ladepuffer versetzt und für 5 min bei 95°C erhitzt. Pro Gelspur wurden 100 - 150 µg Protein aufgetragen. Die elektrophoretische Trennung der Proteine erfolgte bei konstant 80 V für ca. 20 min im Sammelgel und bei konstant 110 V für 1,5 h im Trenngel. Die Bestimmung des molekularen Gewichtes aufgetrennter Proteine erfolgte im Vergleich mit einem Molekulargewichtstandard.

2.2.3.5. Detektion von Proteinen durch Coomassie-Färbung

Die Detektion der Proteine in Polyacrylamidgelen erfolgte durch eine Färbung mit Coomassie brilliant blue R250. Das Polyacrylamidgel wurde 20 min in der Färbelösung inkubiert und anschließend solange in der Entfärbelösung inkubiert, bis die Hintergrundfärbung maximal reduziert war.

2.2.3.6. Western Blot Analyse

Der Transfer von Proteinen auf Protran-Nitrocellulosemembran (Whatman, Dassel) erfolgte im Tank-Blot-Verfahren mittels *Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell* (Biorad) im SDS-Transferpuffer. Der Blotaufbau erfolgte nach der Vorschrift des Herstellers. Der Proteintransfer wurde bei 4°C und 300 mA für 3 h oder über Nacht bei 80 mA durchgeführt.

Nach dem Proteintransfer wurde die Membran mit dem Blockpuffer (5% (w/v) Magermilchpulver in TBST) geblockt und anschließend mit dem spezifischen Primärantikörper im Blockpuffer für 1-2 h bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C inkubiert. Nach dreimaligem Waschen in TBST für je 5 min wurde die Membran mit dem Meerrettich-Peroxidase (HRP)-konjugierten Sekundärantikörper im Blockpuffer für 40 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Membran erneut dreimal je 5 min in TBST gewaschen. Die Detektion der Peroxidase-Aktivität erfolgte durch SuperSignalWest Pico Chemiluminescent-Reagenzien (Pierce) gemäß Herstellerangaben. Die bei der Reaktion entstehende Chemilumineszenz wurde durch die Exposition eines Röntgenfilms (Kodak X-OMAT AR5) detektiert.

2.2.3.7. *Co-Immunpräzipitation*

Der *in vivo* Nachweis von Protein-Protein-Wechselwirkungen erfolgte mittels Co-Immunpräzipitation (Co-IP).

Für die Co-IP wurden die präzipitierenden Antikörper an das Protein A/Protein G-Sepharosegemisch (50 : 50) gebunden, indem 2 µg Antikörper mit 50 µl *Sepharose slurry* (50%iges Sepharosegemisch in PBS) 1 h bei 4°C drehend inkubiert wurde. Nach dreimaligem Waschen je 5 min mit RIPA-Puffer wurde die Antikörper-gekoppelte Sepharose mit 1000 µg frisch hergestellten Zelllysats (vgl. 2.2.3.1) über Nacht bei 4°C drehend inkubiert. Die Sepharose wurde erneut dreimal je 5 min mit RIPA-Puffer gewaschen, mit zweifach konzentriertem SDS-Ladepuffer versetzt und für 10 min bei 95°C erhitzt. Die Proteine wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und im Western Blot detektiert (vgl. 2.2.3.3 bzw. 2.2.3.5).

2.2.3.8. *Gelfiltration*

Die Gelfiltration ermöglicht eine Auftrennung von Proteinkomplexen gemäß ihrer Größe, wobei die größeren Proteinkomplexe schneller durch die Säule migrieren als kleinere. Mit Hilfe definierter Markerproteine kann die Größe der zu untersuchenden Proteinkomplexe abgeschätzt werden.

Für die Gelfiltration wurden 8 mg eines filtrierte Zelllysats auf die Superose 6 Gelfiltrationssäule HR 10/30 geladen und über das Fast Protein Liquid Chromatography (FPLC)-System aufgetrennt. Die Säule wurde zunächst mit dem Laufpuffer (25 mM Tris/HCl pH 8,0, 150 mM NaCl) äquilibriert und mit externen Standards (Blue Dextran M_r 2000000, Thyroglobulin M_r 670000, Ferritin M_r 440000, Aldolase M_r 158000, Albumin M_r 67000; alle von Sigma-Aldrich) im Laufpuffer kalibriert. Es wurden mit einer Flussrate von 0,3 ml/min 0,5 ml Fraktionen gesammelt. Die Fraktionen wurden TCA-präzipitiert, in 2 x SDS-Ladepuffer aufgenommen und für 10 min bei 95°C erhitzt. Anschließend wurden die Fraktionen mittels SDS-PAGE aufgetrennt und im Western Blot analysiert.

2.2.3.9. *Isolierung von Zentrosomen aus humanen Zelllinien*

Die Isolierung von Zentrosomen aus humanen B-Lymphoblasten-Zelllinien wurde nach der Methode von Bornens und Moudjou durchgeführt (Bornens und Moudjou, 1999).

Exponentiell wachsende Zellen wurden expandiert, bis eine Gesamtzellzahl von 1×10^9 bis 2×10^9 erreicht wurde (entspricht ca. 20 Zellkulturflaschen mit je 100 ml Kulturmedium bei einer Zelldichte von $0,5 \times 10^6$ bis 1×10^6 Zellen/ml). Je 100 ml Zellsuspension wurden mit $0,06 \mu\text{g/ml}$ Nocodazol (Sigma) und $1 \mu\text{g/ml}$ Cytochalasin D (Sigma) versetzt. Nach 1 h Inkubation im Brutschrank wurden die Zellen 10 min bei $280 \times g$ für 10 min im SH3000 Rotor bei 4°C zentrifugiert. Alle darauf folgenden Arbeiten wurden bei 4°C durchgeführt. Das Zellelett wurde in 1000 ml TBS aufgenommen, was der Hälfte des gesamten initialen Zellsuspensionsvolumens von 2000 ml entsprach. Die Zellen wurden 2 min bei $1500 \times g$ im SH3000 Rotor zentrifugiert und mit 500 ml 8% Sucrose (w/v) in 0,1% (v/v) TBS gewaschen, was einem Viertel des initialen Zellsuspensionsvolumens entsprach. Nach erneuter Zentrifugation bei $1500 \times g$ für 2 min im SH3000 Rotor wurden die Zellen in 20 ml 8% Sucrose (w/v) in 0,1% (v/v) TBS resuspendiert und mit Lysispuffer (1 mM Tris/HCl pH 8, 0,1% β -Mercaptoethanol, 0,5% Nonidet P40, 0,5 mM MgCl_2) auf eine Zellkonzentration von $1 - 1,5 \times 10^7$ Zellen/ml eingestellt. Nach 5 - 10 min Inkubation auf Eis wurden angeschwollene Kerne, Chromatinaggregate und Membranen durch Zentrifugation bei $2500 \times g$ für 10 min im SH3000 Rotor entfernt. Der Überstand wurde durch eine Gazebinde gefiltert und mit 10 mM Pipes pH 7,2 und 2 U/ml DNase (Roche) 30 min auf Eis inkubiert. Das Lysat wurde in Polyallomer-Röhrchen (38,5 ml Volumen, Herolab) überführt, die 5 ml 50% (w/w) Sucrose im Gradientpuffer (10 mM Pipes pH 7,2, 0,1% Triton X-100, 0,1% β -Mercaptoethanol) enthielten. Dabei wurde die Sucrose vorsichtig mit dem Lysat überschichtet. Die Sedimentation der Zentrosomen durch das Sucrosekissen erfolgte 25 min bei $11000 \times g$ im SW28 Rotor (Beckman Ultrazentrifuge). Der Überstand wurde bis auf ca. 5 ml über dem Sucrosekissen verworfen und das Sucrosekissen mit dem restlichen Überstand vermischt, so dass eine ca. 25% Sucroslösung mit darin enthaltenden Zentrosomen entstand. Das Gemisch wurde auf einen diskontinuierlichen Sucrosegradienten aufgetragen, bestehend aus 5 ml 70% (w/w) Sucrose, 3 ml 50% (w/w) Sucrose und 3 ml 40% (w/w) Sucrose im Gradientenpuffer. Die Anreicherung der Zentrosomen wurde durch eine Zentrifugation bei $40000 \times g$ für 1 h 15 min im SW28 Rotor erzielt. Der Boden des Polyallomerröhrchens wurde mit einer 20G-

Kanüle angestochen und 0,5 ml Fraktionen (insgesamt 15 - 20 Fraktionen) gesammelt. Die Fraktionen wurden in 1 ml 10 mM Pipes pH 7,2 resuspendiert und bei 14000 UpM 15 min in der Tischzentrifuge zentrifugiert. Der Überstand wurde bis auf ca. 30 µl verworfen, die anschließend mit zweifach konzentriertem SDS-Ladepuffer versetzt und 5 min bei 95°C erhitzt wurden. Nach der SDS-PAGE wurden die Fraktionen mit der höchsten Zentrosomenkonzentration mittels Western Blot Analyse unter Verwendung eines Antikörpers gegen ein zentrosomales Protein (Nek2) ermittelt.

2.2.4. Arbeiten mit *Saccharomyces cerevisiae*

2.2.4.1. Kultivierung von *Saccharomyces cerevisiae*

Die Kultivierung des verwendeten Hefestammes AH109 erfolgte im YPDA-Vollmedium bzw. auf YPDA-Agarplatten. Zur Selektion auf Auxotrophie-Marker bei den transformierten Hefen wurde SD-Medium mit den erforderlichen Supplementen, die den Selektionsbedingungen entsprechen, verwendet. Die Kultivierung von *S. cerevisiae* erfolgte bei 30°C. Auf Agarplatten ausplattierte Hefen bildeten nach ca. 3 - 5 Tagen Inkubation deutlich sichtbare Kolonien.

Die Bestimmung der Zelldichte in den Flüssigkulturen erfolgte photometrisch über die Messung der optischen Dichte bei 600 nm (OD_{600}). Dabei entsprach eine gemessene optische Dichte von $OD_{600} = 1$ ca. $2,5 \times 10^6$ Zellen pro ml.

2.2.4.2. Herstellung kompetenter Hefezellen

Die kompetenten Hefezellen wurden mit Hilfe der Lithium-Acetat-Methode hergestellt (Gietz et al., 1992).

Eine einzelne Hefekolonie wurde von der YPDA-Agarplatte in 25 ml YPDA-Flüssigmedium überführt und über Nacht bei 30°C und 220 UpM im Inkubationsschüttler bis zum Erreichen der stationären Phase ($OD_{600} > 1,5$) kultiviert. Mit dieser Übernachtskultur wurden 300 ml YPDA-Flüssigmedium auf eine OD_{600} von 0,2 - 0,3 angeimpft und unter Schütteln bei 30°C bis zu einer OD_{600} von 0,5 - 0,6 inkubiert. Die Zellen wurden durch Zentrifugation (5 min, 1000 x g) sedimentiert, mit 50 ml sterilem H₂O gewaschen und anschließend in 1,5 ml frisch hergestellter LiAc/TE- Lösung aufgenommen.

2.2.4.3. Transformation kompetenter Hefezellen mit Plasmid-DNA

100 ng Plasmid-DNA wurden mit 100 µg frisch denaturierter Heringsspermien-DNA (carrier DNA, Clontech) vermischt. Die DNA wurde mit 100 µl Zellsuspension kompetenter Hefezellen und 600 µl PEG/LiAc/TE-Lösung versetzt und für 30 min bei 30°C und 220 UpM inkubiert. Nach der Zugabe von 70 µl DMSO und anschließendem Hitzeschock für 15 min bei 42°C (Wasserbad) wurden die Zellen 2 min auf Eis inkubiert und für 5 sec bei Raumtemperatur zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 200 µl frisch hergestelltem TE-Puffer resuspendiert. Jeweils 50 µl transformierter Hefezellen wurden auf den selektiven SD-Agarplatten ausplattiert und bei 30°C für 3 - 5 Tage inkubiert.

2.2.4.4. Präparation von Proteinextrakten aus *S. cerevisiae*

Eine einzelne Kolonie *S. cerevisiae*-Zellen wurde in 5 ml Selektionsmedium überführt und bei 30°C und 250 UpM über Nacht kultiviert. Mit dieser Übernackkultur wurden 50 ml YPDA-Flüssigmedium auf eine OD₆₀₀ von 0,1 - 0,2 angeimpft und unter Schütteln bei 30°C bis zu einer OD₆₀₀ von 0,4 - 0,6 inkubiert. Die gemessene OD₆₀₀ multipliziert mit dem Volumen der Hefekultur ergab die OD₆₀₀-Einheiten. Die Hefezellen wurden in einen mit Eis gefüllten Zentrifugenbecher überführt und 5 min bei 1000 x g, 4°C zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 50 ml eiskaltem ddH₂O gewaschen und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Lysis der Zellen erfolgte in 100 µl vorgewärmtem Lysispuffer (60°C) pro 7,5 OD₆₀₀-Einheiten. Nach Zugabe von 100 µl Glassplitter (Sigma) pro 7,5 OD₆₀₀-Einheiten wurde die Suspension 10 min bei 70°C erhitzt und die Hefezellen mechanisch aufgeschlossen (1 min vortexen). Nach der Zentrifugation bei 14000 UpM wurde der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt und 7 min bei 95 °C erhitzt. Die Proteinextrakte wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und im Western Blot analysiert.

2.2.4.5. Plasmid-DNA Isolierung aus *S. cerevisiae*

Zur Isolierung der Plasmid-DNA aus transformierten Hefezellen wurden einzelne Kolonien in 3 ml Selektionsmedium überführt und über Nacht bei 30°C und 220 UpM im Inkubationsschüttler kultiviert. Die Hefezellen wurden bei 14000 UpM 3 min zentrifugiert und in 300 µL Hefe-Lysepuffer (2% Triton X-100, 1% SDS, 100 mM NaCl, 10 mM Tris/HCl pH 8,0, 1 mM EDTA) resuspendiert. Nach der Zugabe von 300 µl Phenol/Chloroform (1 : 1)

und 300 µl Glassplitter wurde die Suspension zweimal je 2 min gevortext und anschließend 5 min bei 14000 UpM zentrifugiert. Die DNA wurde aus dem Überstand durch Ethanolfällung (vgl. 2.2.1.2.2) isoliert und in die chemisch kompetenten *E.coli*-Bakterien transformiert (vgl. 2.2.1.3).

2.2.4.6. Hefe-Zwei-Hybrid-Interaktionsstudien

Das Hefe-Zwei-Hybrid System (*Yeast-Two-Hybrid* (Fields und Song, 1989)) ist eine Methode zur Untersuchung von Protein-Protein-Interaktionen *in vivo*. Bei diesem Verfahren wird ein Transkriptionsfaktor (z.B. GAL4) in seine DNA-Bindungsdomäne (BD) und seine Transaktivierungsdomäne (AD) aufgespalten, die mit den zu untersuchenden Proteinen fusioniert werden. Die Protein-Protein-Interaktion wird durch die Rekonstitution des Transkriptionsfaktors und die darauf folgende Transkription sowie Expression mehrerer Reportergene nachgewiesen.

Für die Identifikation von neuen Interaktionspartnern von humanem MCPH1 wurden GAL4-basierende Hefe-Zwei-Hybrid-Interaktionsstudien nach den im "Matchmaker™ Pretransformed Libraries User Manual"-Protokollen (Clontech) durchgeführt. Dabei wurde der HIS3- und ADE2-auxotrophe, GAL4BD-MCPH1 exprimierende Hefestamm AH109 mit dem Stamm Y187 verpaart, der mit einer cDNA-Bibliothek aus humanem fötalen Gehirn, fusioniert an die kodierende Sequenz von GAL4AD im pACT2-Vektor, prätransformiert wurde (Human Fetal Brain Matchmaker cDNA Library, Clontech). Die cDNA-Bibliothek enthielt laut Herstellerangaben $3,5 \times 10^6$ unabhängige Klone. Die verpaarten Hefezellen wurden auf -Leu/-Trp/-His/-Ade SD-Agarplatten ausplattiert und zwei Wochen bei 30°C kultiviert. Die auf den selektiven SD-Agarplatten gewachsenen Hefeklone wurden dreimal auf frische -Leu/-Trp/-His/-Ade SD-Agarplatten umgesetzt, um den Selektionsdruck aufrecht zu erhalten. Aus den positiven Klonen wurde Plasmid-DNA isoliert (vgl. 2.2.4.5) und in *E.coli*-Bakterien transformiert, die auf Ampicillin-haltigem LB-Medium (Amp^R kodiert im pACT2-Vektor) selektioniert wurden. Die Plasmid-DNA wurde anschließend aus den Bakterien isoliert und sequenziert (vgl. 2.2.1.4.1 und 2.2.1.1.3). Zur Identifikation der positiven Klone wurden die Sequenzierungsdaten mit den öffentlich verfügbaren Datenbanken (NCBI BLAST) verglichen.

Zur Charakterisierung der Interaktion zwischen humanen MCPH1 und Chk1 *in vivo* wurde der BD-MCPH1 exprimierende Hefestamm AH109 mit 100 ng pGADT7-Chk1 (Chk1 cDNA fusioniert an die kodierende Sequenz von AD) transformiert und auf -Leu/-Trp/-His/-Ade SD-Agarplatten selektioniert.

3. Ergebnisse

3.1. *Chk1-Delokalisation von Zentrosomen in MCPH1- und PCNT-defizienten Zellen*

In vorausgehenden Arbeiten konnte gezeigt werden, dass Chk1, ein vorwiegend nukleäres Protein, während der Interphase am Zentrosom lokalisiert ist und dort eine wichtige Rolle bei der Einleitung der Mitose spielt (Krämer et al., 2004). Chk1 selbst weist keine bekannten zentrosomalen Lokalisationssequenzen auf, sodass dessen Rekrutierung an das Zentrosom möglicherweise von anderen Proteinen abhängig ist.

Um einen möglichen Einfluss von MCPH1 und PCNT auf die zelluläre Distribution von Chk1 während der Interphase zu untersuchen, wurden zunächst Immunfluoreszenzanalysen an humanen MCPH1- und PCNT-defizienten Lymphoblasten von Individuen mit Primärer Mikrozephalie bzw. MOPD II sowie an U2OS-Zellen, die mit MCPH1- bzw. PCNT-spezifischer siRNA transfiziert wurden, durchgeführt. Die Immunfluoreszenzfärbung mit monoklonalem Maus-anti-Chk1 Antikörper zeigte, dass sowohl MCPH1-defiziente (MCPH1^{427insA}) als auch PCNT-defiziente (PCNT^{3109G>T}) Lymphoblasten während Interphase kein bzw. ein stark reduziertes zentrosomales Chk1-Signal aufwiesen. Die Interphasezellen der Kontroll-Lymphoblasten (LBC) zeigten hingegen ein deutliches zentrosomales Chk1-Signal, das mit dem zentrosomalen Markerprotein γ -Tubulin kolokalisierte (Abb. 3-1 A). Zur Quantifizierung dieses Sachverhalts wurden in drei unabhängigen Experimenten jeweils 100 Interphasezellen, doppelgefärbt mit γ -Tubulin- und Chk1-spezifischen Antikörpern, auf Anwesenheit des zentrosomalen Chk1-Signals hin untersucht. Im Vergleich zu Kontroll-Lymphoblasten, die in $83 \pm 2,9\%$ der Interphasezellen eine Kolokalisation von Chk1 und γ -Tubulin aufwiesen, konnte in lediglich $17,7 \pm 2,5\%$ der MCPH1^{427insA} (***, $p=0.000009$) und $21 \pm 1,7\%$ der PCNT^{3109G>T} Lymphoblasten (***, $p=0.00003$) ein zentrosomales Chk1-Signal detektiert werden (Abb. 3-1 B). Im Gegensatz dazu variierte das nukleäre Chk1-Signal zwischen den Zelllinien nicht.

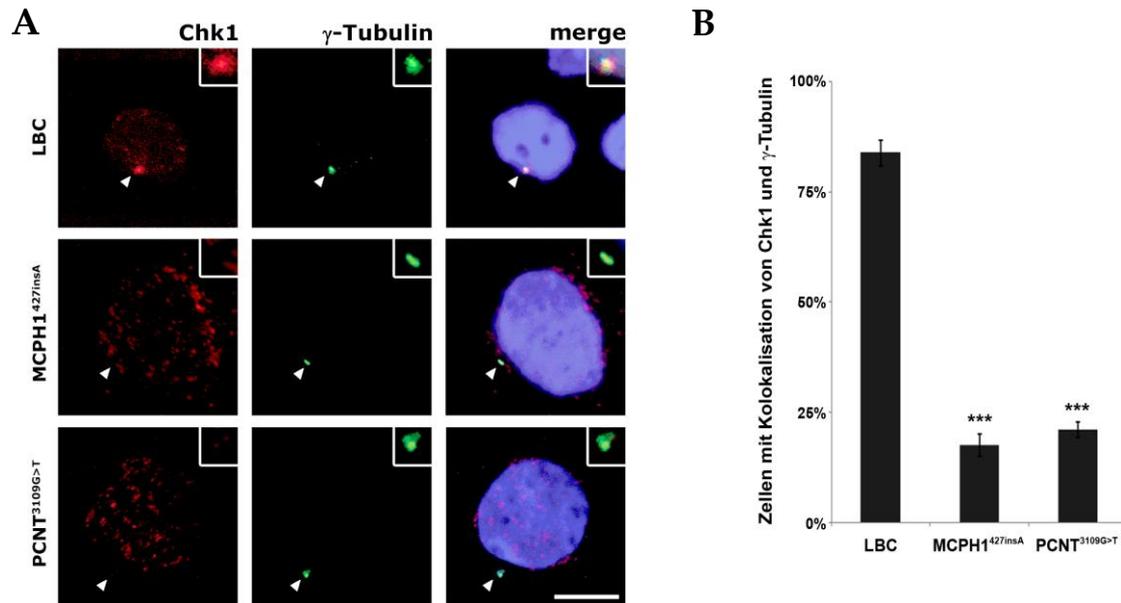


Abbildung 3-1: Reduktion des zentrosomalen Chk1-Signals in MCPH1- und PCNT-defizienten Lymphoblasten. (A) Konfokale Aufnahmen von exponentiell wachsenden MCPH1^{427insA}, PCNT^{3109G>T} und Kontroll-Lymphoblasten (LBC), die mit monoklonalem Maus-anti-Chk1 (roter Kanal) und polyklonalem Kaninchen-anti- γ -Tubulin (grüner Kanal) Antikörper doppelgefärbt wurden. DNA-Färbung mit To-PRO3 (blauer Kanal). Die Pfeilköpfe deuten auf Zentren, die innerhalb einzelner Abbildungen in Ausschnitten vergrößert dargestellt sind. Der Maßstabsbalken entspricht 10 μ m. (B) Prozentualer Anteil der Interphasezellen mit zentrosomalem Chk1-Signal (Kolo-kalisation mit γ -Tubulin). Dargestellt sind Mittelwerte mit entsprechenden Standardabweichungen aus drei unabhängigen Experimenten. Sterne zeigen statistische Signifikanz im Vergleich zu Kontroll-Lymphoblasten (zweiseitiger Student's t-Test).

Anschließend wurden Pixelintensitätsprofile des zentrosomalen Chk1-Signals von jeweils 100 Zellen der MCPH1^{427insA}, PCNT^{3109G>T} sowie Kontroll-Lymphoblasten erstellt. Die Abbildung 3-2 A zeigt eine dreidimensionale Darstellung der Pixelintensität eines für jede Zelllinie repräsentativen zentrosomalen Signals von Chk1. Die Auswertung der einzelnen Pixelintensitäten zeigten eine signifikante Reduktion von zentrosomalem Chk1 in MCPH1- bzw. PCNT-defizienten Zellen, unabhängig davon, ob die Zellen nur ein Zentrosom entsprechend der G₀/G₁-Phase oder zwei Zentrosomen entsprechend der S/G₂-Phase aufwiesen (Abb. 3-2 B, C und Tab. 3-1).

Tabelle 3-1: Intensitäten des zentrosomalen Chk1-Signals in Pixel³. Dargestellt sind Mittelwerte (absolute Werte) aus der Messung von 100 Interphasezellen mit einem (G₀/G₁-Phase) oder zwei (S/G₂-Phase) Zentrosomen. Die Ermittlung der p-Werte in Bezug auf die Kontroll-Lymphoblasten erfolgte mittels zweiseitigen Student's t-Tests.

	LBC	MCPH1 ^{427insA}	PCNT ^{3109G>T}
G ₀ /G ₁ + S/G ₂	1531,48	684,65	359,57
p-Wert	-	1,4 × 10 ⁻⁷	9,8 × 10 ⁻¹²
G ₀ /G ₁	1656,32	671,52	359,57
p-Wert	-	0,007	6,5 × 10 ⁻⁴
S/G ₂	1541,11	699,46	369,19
p-Wert	-	3 × 10 ⁻⁶	2,3 × 10 ⁻¹¹

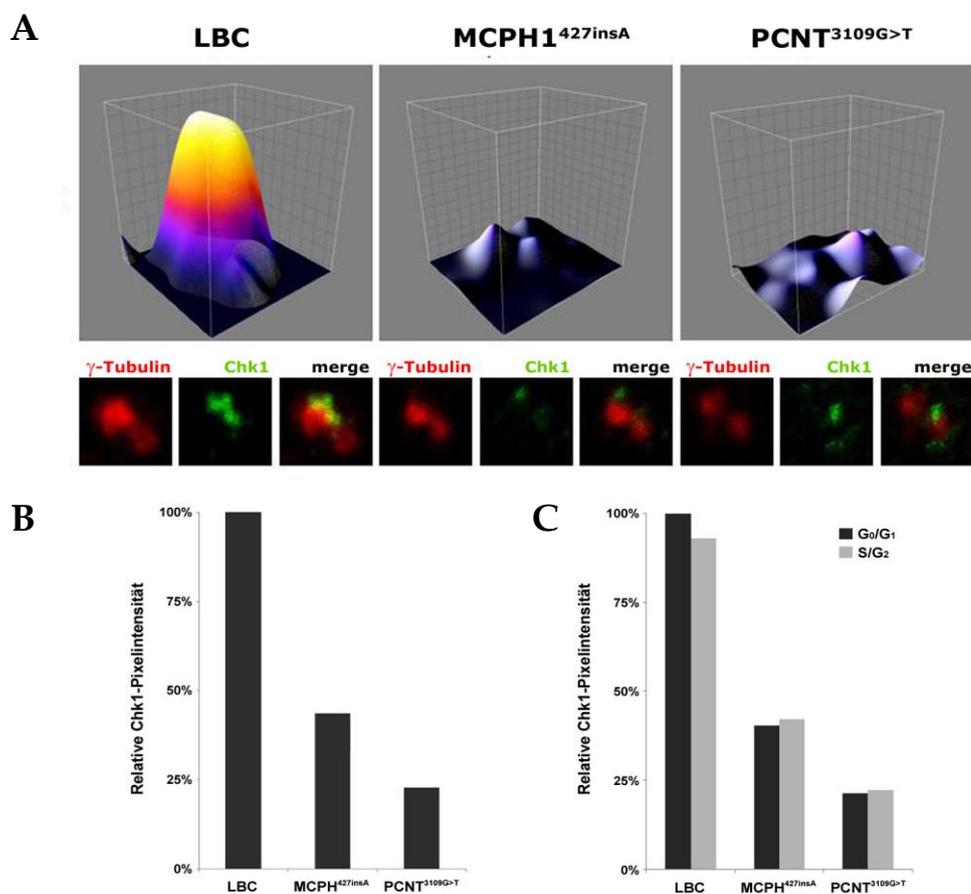


Abbildung 3-2: Quantifizierung des zentrosomalen Chk1-Signals. (A) 3-D Rekonstitution eines für MCPH1^{427insA}, PCNT^{3109G>T} und Kontroll-Lymphoblasten repräsentativen zentrosomalen Chk1-Signals, aufgenommen in 13 z-Ebenen. Die Intensität der Immunfärbung ist durch den Farbverlauf wiedergegeben. Die untere Reihe zeigt die entsprechenden konfokalen 2-D Aufnahmen der Chk1/ γ -Tubulin-Doppelfärbung. (B-C) Aus der Messung von je 100 Zellen ermittelte mittlere Pixelintensitätswerte von zentrosomalem Chk1 in MCPH1^{427insA} und PCNT^{3109G>T}, normalisiert auf den Wert der Kontroll-Lymphoblasten (100%). Die Auswertung erfolgte ohne (B) oder mit (C) Einteilung in G₀/G₁-Phase- (ein Zentrosom) bzw. S/G₂-Phase-Zellen (zwei Zentrosomen).

Um zu überprüfen, ob das beobachtete Phänomen des zentrosomalen Chk1-Verlustes auch durch eine RNAi-vermittelte Depletion von MCPH1 oder PCNT reproduzierbar ist, wurde die humane Osteosarkomzelllinie U2OS mit MCPH1-spezifischer siRNA (siMCPH1), PCNT-spezifischer siRNA (siPCNT) oder Kontroll-siRNA (Luciferase-spezifisch, siLUC) transfiziert und 72 Stunden nach der Transfektion mittels Immunfluoreszenz untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass das zentrosomale Chk1-Signal auch nach der RNAi-vermittelten Depletion von MCPH1 bzw. PCNT reduziert war (Abb. 3-3 A). Die Effizienz der siRNA-Transfektionen wurde im Western Blot mit MCPH1- und PCNT-spezifischen Antikörpern verifiziert und zeigte in beiden Fällen eine erfolgreiche Depletion der Proteine (Abb. 3-3 B).

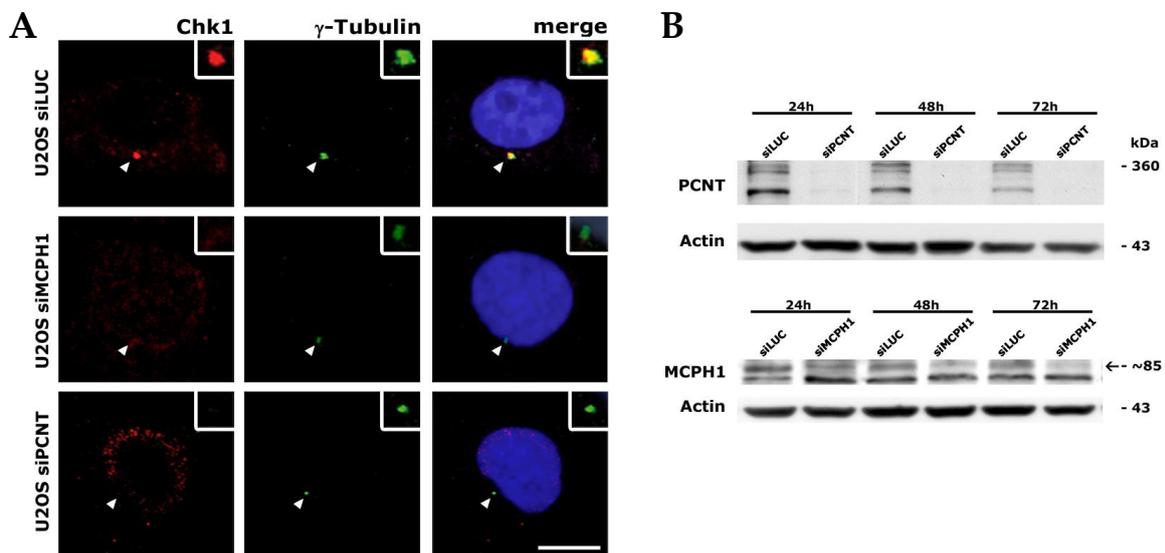


Abbildung 3-3: Reduktion des zentrosomalen Chk1-Signals in U2OS-Zellen, transfiziert mit MCPH1-spezifischer (siMCPH1) und PCNT-spezifischer (siPCNT) siRNA. (A) 72h nach der Transfektion mit siRNA-Oligonukleotiden wurden die Zellen mit monoklonalem Maus-anti-Chk1 (roter Kanal) und polyklonalem Kaninchen-anti- γ -Tubulin Antikörper (grüner Kanal) doppelgefärbt. DNA-Färbung mit To-PRO3 (blauer Kanal). Die Pfeilköpfe deuten auf Zentrosomen, die innerhalb einzelner Abbildungen in Ausschnitten vergrößert dargestellt sind. Der Maßstabsbalken entspricht 10 μ m. (B) RNAi-vermittelte Depletion von MCPH1 und PCNT in Abhängigkeit von der Zeit nach Transfektion. U2OS-Zellen wurden mit MCPH1-, PCNT- sowie Luciferase-spezifischer siRNA zweimal transfiziert und 24h, 48h und 72h nach der zweiten Transfektion im Western Blot mit polyklonalen Kaninchen-anti-PCNT und Ziege-anti-MCPH1 Antikörpern analysiert. Der Nachweis von Actin diente als Ladekontrolle. Das Molekulargewicht der Proteinbanden ist in kDa angegeben. Der Pfeil in der unteren Abbildung deutet auf die MCPH1-Bande, die Bande darunter resultiert aus einer unspezifischen Bindung des verwendeten Antikörpers.

Die Reduktion von Chk1 am Zentrosom in MCPH1- und PCNT-defizienten Lymphoblasten wurde weiterhin mittels Western Blot Analyse von zentrosomalen Extrakten aus MCPH1^{427insA}, PCNT^{3109G>T} und Kontroll-Lymphoblasten bestätigt. Dabei wurden zunächst von gesammelten Sucrosefraktionen diejenigen mit der höchsten Zentrosomenkonzentration

ermittelt, indem die Proteinmenge des zentrosomalen Markerproteins Nek2 in den einzelnen Fraktionen mittels Western Blot bestimmt wurde. Bei allen drei Zelllinien waren die Zentrosomen in den Fraktionen 11-13 angereichert. Die Proteinmenge an Nek2 diente außerdem als Ladekontrolle. Die zentrosomalen Fraktionen waren nicht mit nukleären Proteinen wie Mcm7 kontaminiert. Ein Western Blot mit Chk1-spezifischem Antikörper zeigte, dass in den zentrosomalen Fraktionen von MCPH1^{427insA}- und PCNT^{3109G>T}-Lymphoblasten die Chk1-Proteinmenge im Vergleich zu Kontroll-Lymphoblasten reduziert war (Abb. 3-4 A).

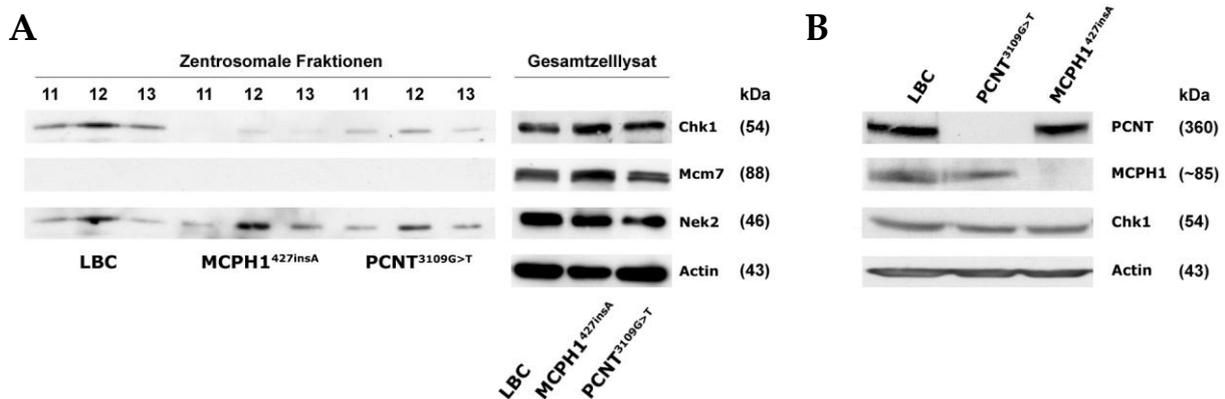


Abbildung 3-4: Chk1 ist reduziert in zentrosomalen Extrakten von MCPH1- und PCNT-defizienten Lymphoblasten. (A) Detektion von Chk1 in zentrosomalen Fraktionen von MCPH1^{427insA}, PCNT^{3109G>T} und Kontroll-Lymphoblasten (LBC) mit monoklonalem Maus-anti-Chk1 Antikörper im Western Blot. Der Nachweis von Nek2 (zentrosomales Protein) diente als Ladekontrolle. Der Immunoblot mit einem Antikörper gegen Mcm7 (nukleäres Protein) diente dem Ausschluss einer nukleären Kontamination. Zur Input-Kontrolle wurden Chk1, Nek2 und Mcm7 in Gesamtzelllysaten mittels Western Blot nachgewiesen, mit Actin als Ladekontrolle. (B) Western Blot von Gesamtzelllysaten der MCPH1^{427insA}, PCNT^{3109G>T} und Kontroll-Lymphoblasten (LBC) mit PCNT-, MCPH1- und Chk1-spezifischen Antikörpern. Der Nachweis von Actin diente als Ladekontrolle. Das Molekulargewicht der Proteinbanden ist in kDa angegeben.

Um auszuschließen, dass die Reduktion des zentrosomalen Chk1 in MCPH1- und PCNT-defizienten Lymphoblasten durch eine generell verminderte Proteinexpression von Chk1 bedingt ist, wurden Gesamtzelllysate von MCPH1^{427insA}, PCNT^{3109G>T} sowie Kontroll-Lymphoblasten hergestellt und im Western Blot mit monoklonalem Maus-anti-Chk1 Antikörper untersucht. Die Abb. 3-4 B zeigt, dass alle drei Zelllinien gleiche Proteinmengen an Chk1 in Gesamtzelllysaten aufwiesen. Mit dem polyklonalen Ziege-anti-MCPH1 Antikörper konnte bestätigt werden, dass MCPH1 nicht in MCPH1^{427insA}-Zellen exprimiert wird, dafür aber in PCNT^{3109G>T} und Kontroll-Lymphoblasten. Analog dazu konnte unter Verwendung des polyklonalen Kaninchen-anti-PCNT Antikörpers nachgewiesen werden,

dass PCNT in MCPH1^{427insA} und Kontroll-Lymphoblasten exprimiert wird und nicht in PCNT^{3109G>T}-Lymphoblasten.

3.2. MCPH1 lokalisiert an Zentrosomen in humanen Interphasezellen

Es wurde bereits beschrieben, dass MCPH1 in B-Lymphoblasten des Huhns (DT40 Zellen) am Zentrosom lokalisiert ist (Jeffers et al., 2008). Um zu untersuchen, ob das humane MCPH1 auch zentrosomal lokalisiert ist, wurde zunächst ein monoklonaler Maus-Antikörper gegen das N-terminale Fragment des humanen MCPH1 (Aminosäuren 1-254) hergestellt. Dafür wurde das MCPH1-cDNA-Fragment unter Verwendung der Primer BamH1_MCPH1(1) und HindIII_MCPH1(1) sowie des Template-Plasmids pAcGFP-MCPH1 mittels PCR amplifiziert und in die BamHI/HindIII- Schnittstellen des pQc-His6-Vektors kloniert. Die bakterielle Expression und Affinitätsaufreinigung des His-getaggten MCPH1-Fragments sowie Immunisierung der Mäuse wurde im Rahmen einer Kooperation von der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. H. W. Zentgraf, DKFZ, Heidelberg durchgeführt. Die Spezifität des monoklonalen Maus-Antikörpers, der als ein IgM-Klon identifiziert wurde, konnte sowohl mittels Immunfluoreszenz als auch im Western Blot verifiziert werden. Die Immunfluoreszenzfärbung der PCNT^{3109G>T} und Kontroll-Lymphoblasten sowie U2OS-Zellen, transfiziert mit siLUC und siPCNT, zeigte, dass in diesen Zellen MCPH1 am Zentrosom mit γ -Tubulin kolokalisiert. In MCPH1^{427insA} Lymphoblasten und U2OS-Zellen, transfiziert mit MCPH1-spezifischer siRNA, wurde hingegen kein MCPH1-Signal detektiert (Abb. 3-5 A). Weiterhin konnte mit dem generierten Maus-anti-MCPH1 Antikörper im Western Blot eine Proteinbande bei ca. 85 kDa in zentrosomalen Fraktionen (Abb. 3-5 B) und Gesamtzelllysaten (Abb. 3-5 C) von PCNT^{3109G>T} und Kontroll-Lymphoblasten nachgewiesen werden.

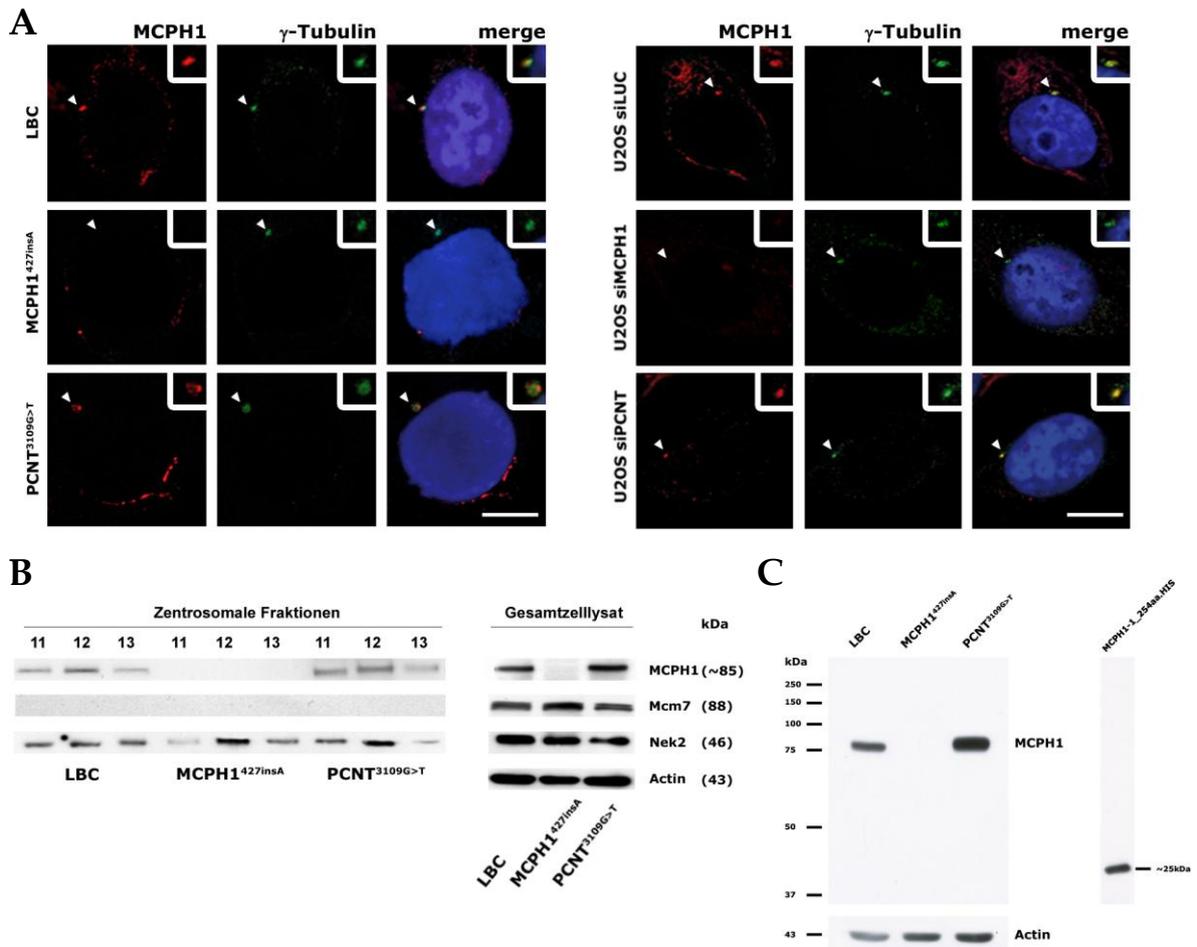


Abbildung 3-5: Humanes MCPH1 lokalisiert am Zentrosom von Interphasezellen. (A) Konfokale Aufnahmen von exponentiell wachsenden MCPH1^{427insA}, PCNT^{3109G>T} und Kontroll-Lymphoblasten (LBC) sowie U2OS-Zellen, 72h nach der Transfektion mit MCPH1-spezifischer (siMCPH1), PCNT-spezifischer (siPCNT) und Luciferase-spezifischer (siLUC) siRNA. Immunfluoreszenzfärbung mit monoklonalem Maus-anti MCPH1-Antikörper (roter Kanal) und polyklonalem Kaninchen-anti- γ -Tubulin (grüner Kanal). DNA-Färbung mit To-PRO3 (blauer Kanal). Die Pfeilköpfe deuten auf Zentrosomen, die innerhalb einzelner Abbildungen in Ausschnitten vergrößert dargestellt sind. Der Maßstabsbalken entspricht 10 μ m. (B) Western Blot Analyse von zentrosomalen Extrakten aus MCPH1^{427insA}, PCNT^{3109G>T} und Kontroll-Lymphoblasten mit monoklonalem Maus-anti-MCPH1 Antikörper. Der Nachweis von Nek2 (zentrosomales Protein) diente als Ladekontrolle. Der Immunoblot mit dem Antikörper gegen Mcm7 (nukleäres Protein) diente dem Ausschluss einer nukleären Kontamination. Zur Input-Kontrolle wurden MCPH1, Nek2 und Mcm7 in den Gesamtzelllysaten mittels Western Blot nachgewiesen, mit Actin als Ladekontrolle. (C) Western Blot von Gesamtzelllysaten der MCPH1^{427insA}, PCNT^{3109G>T} und Kontroll-Lymphoblasten mit monoklonalem Maus-anti-MCPH1 Antikörper. Der Nachweis von Actin diente als Ladekontrolle. Der generierte Antikörper detektiert im Western Blot auch das für die Immunisierung der Mäuse verwendete MCPH1-Fragment (MCPH1-1_254aa.HIS). Das Molekulargewicht der Proteinbanden ist in kDa angegeben.

3.3. MCPH1 interagiert mit Chk1 *in vivo*

Eine direkte *in vitro* Interaktion zwischen MCPH1 und Chk1 wurde bereits von Alderton und Kollegen mittels GST-Pulldown gezeigt (Alderton et al., 2006). Zum Nachweis einer *in vivo* Interaktion zwischen den beiden Proteinen wurden Co-Immunpräzipitationsversuche

(Co-IP) durchgeführt. Da weder der polyklonale Ziege-anti-MCPH1 noch der monoklonale Maus-anti-MCPH1 Antikörper für die Co-IP-Versuche geeignet waren, wurde MCPH1 als GFP-MCPH1-Fusionsprotein in U2OS-Zellen transient exprimiert. Für die Herstellung des GFP-MCPH1-Expressionskonstruktes wurde die MCPH1-cDNA unter Verwendung der Primer MCPH1_EGFPc1f und MCPH1r2 sowie des Template-Plasmids pAcGFP-MCPH1 PCR-amplifiziert und in die XhoI/Sall- Schnittstellen des pEGFP-C1-Vektors kloniert. Die U2OS-Zellen wurden mit dem Expressionskonstrukt transfiziert und 24 Stunden danach lysiert. Die Zellysate wurden in der Co-Immünpräzipitation mit monoklonalem Maus-anti-GFP Antikörper sowie in der reziproken Co-Immünpräzipitation mit monoklonalem Maus-anti-Chk1 Antikörper eingesetzt. Beide Co-IPs zeigten, dass endogenes Chk1 und GFP-MCPH1 co-präzipitiert werden und somit miteinander *in vivo* interagieren (Abb. 3-6 A, B). Bei der Immünpräzipitation von GFP-MCPH1 wurde im Western Blot mit Chk1-spezifischem Antikörper eine zusätzliche, schneller migrierende Proteinbande (ca. 50 kDa) detektiert, die wahrscheinlich auf eine unspezifische Bindung des Antikörpers zurückzuführen ist.



Abbildung 3-6: Transient exprimiertes GFP-MCPH1 interagiert mit endogenem Chk1 *in vivo*. (A) Chk1 wurde aus Zellysate von U2OS-Zellen, transient transfiziert mit einem GFP-MCPH1-Expressionskonstrukt, mit Chk1-spezifischem Antikörper immünpräzipitiert. Das GFP-MCPH1-Fusionsprotein wurde mittels Western Blot mit GFP-spezifischem Antikörper im Co-Präzipitat nachgewiesen. Input entspricht 10% der für die Co-IP eingesetzten Proteingesamtmenge. Eine Immünpräzipitation mit HA-spezifischem Antikörper diente als Negativ-Kontrolle. (B) Reziproke Immünpräzipitation von GFP-MCPH1 mit einem GFP-spezifischen Antikörper aus dem gleichen Zellysate wie bei (A). Chk1 wurde mittels Western Blot mit Chk1-spezifischem Antikörper im Co-Präzipitat nachgewiesen. Das Molekulargewicht der Proteinbanden ist in kDa angegeben.

3.4. Chk1-Depletion hat keinen Einfluss auf die zelluläre Lokalisation von MCPH1

Die beschriebenen Ergebnisse zeigen, dass die Depletion von MCPH1 zu einer Reduktion von zentrosomalem Chk1 führt. Um zu überprüfen, ob eine RNAi-vermittelte Depletion von Chk1 ihrerseits die zentrosomale Lokalisation von MCPH1 beeinflusst, wurden U2OS-Zellen mit einer Chk1-spezifischen siRNA (siChk1) sowie Kontroll-siRNA (Luciferase-spezifisch,

siLUC) transfiziert und 72 Stunden nach der Transfektion mit monoklonalem Maus-anti-MCPH1 und polyklonalem Kaninchen-anti- γ -Tubulin Antikörper doppelgefärbt. Die Analyse immungefärbter Zellen am konfokalen Laser-Scanning Mikroskop zeigte, dass eine Chk1-Depletion keine Auswirkung auf die zentrosomale Lokalisation von MCPH1 hatte (Abb. 3-7 A). Die Depletion von Chk1 wurde mittels Immunfluoreszenzfärbung mit monoklonalem Maus-anti-Chk1 Antikörper verifiziert (Abb. 3-7 B).

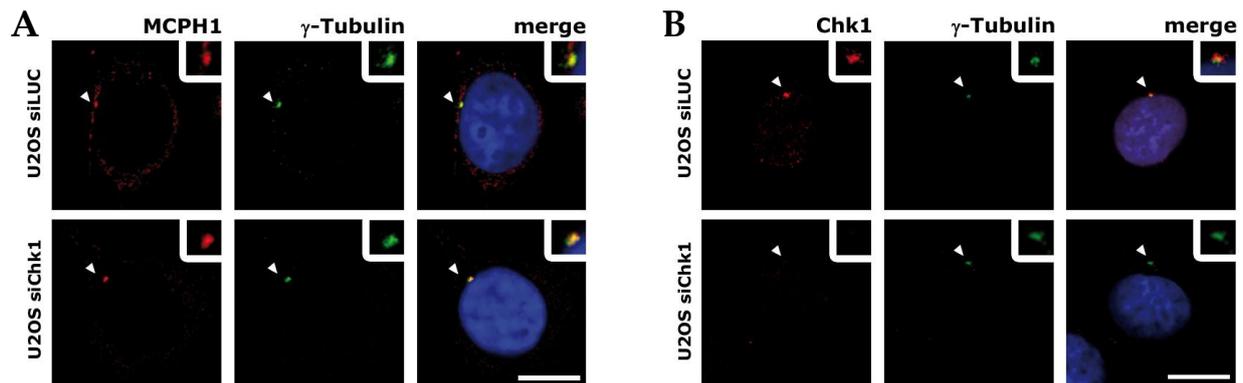


Abbildung 3-7: Zentrosomale Lokalisation von MCPH1 wird nicht beeinträchtigt durch die Depletion von Chk1. Konfokale Aufnahmen von U2OS-Zellen, 72h nach der Transfektion mit Chk1-spezifischer (siChk1) bzw. Kontroll-siRNA (siLUC). **(A)** Immunfluoreszenzfärbung mit monoklonalem Maus-anti-MCPH1 (roter Kanal) und polyklonalem Kaninchen-anti- γ -Tubulin Antikörper (grüner Kanal). **(B)** Immunfluoreszenzfärbung mit monoklonalem Maus-anti-Chk1 (roter Kanal) und polyklonalem Kaninchen-anti- γ -Tubulin Antikörper (grüner Kanal). DNA-Färbung mit To-PRO3 (blauer Kanal). Die Pfeilköpfe deuten auf Zentrosomen, die innerhalb einzelner Abbildungen in Ausschnitten vergrößert dargestellt sind. Der Maßstabsbalken entspricht 10 μ m.

3.5. Reduktion von zentrosomalem PCNT in MCPH1-defizienten Zellen

Eine Reduktion des zentrosomalen Chk1-Levels konnte sowohl in MCPH1-defizienten als auch PCNT-defizienten Zellen beobachtet werden. PCNT ist ein Protein der perizentriolären Matrix und hat eine etablierte Funktion in der Rekrutierung von vielen regulatorischen Proteinen an das Zentrosom (Diviani et al., 2000; Chen et al., 2004). Auf dieser Grundlage sollte geklärt werden, ob PCNT und MCPH1 unabhängig voneinander an der zentrosomalen Rekrutierung von Chk1 beteiligt sind oder ob es einen funktionellen Zusammenhang zwischen diesen Proteinen gibt.

Immunfluoreszenzfärbung und Western Blot Analysen von Gesamtzelllysaten und zentrosomalen Fraktionen von PCNT-defizienten Zellen unter Verwendung des MCPH1-spezifischen Antikörpers zeigten, dass der Verlust von PCNT keinen Einfluss auf die

Expression bzw. subzelluläre Lokalisation von MCPH1 hat (vgl. Abb. 3-5 A-C). Um zu überprüfen, ob eine MCPH1-Defizienz wiederum die zelluläre Distribution von PCNT beeinflusst, wurden Kontroll-Lymphoblasten und MCPH1-defiziente Lymphoblasten mit PCNT- und γ -Tubulin-spezifischen Antikörpern immungefärbt. Die Analyse der Immun-Doppelfärbungen am konfokalen Laserscanmikroskop zeigte eine deutliche Reduktion des zentrosomalen PCNT-Signals in MCPH1^{427insA} Lymphoblasten im Vergleich zu Kontroll-Lymphoblasten (Abb. 3-8 A). Das gleiche Phänomen konnte in U2OS-Zellen beobachtet werden, die mit MCPH1-spezifischer siRNA transfiziert wurden (Abb. 3-8 B). In PCNT-defizienten Lymphoblasten wurde kein PCNT detektiert, während in U2OS-Zellen, transfiziert mit PCNT-spezifischer siRNA, noch ein schwaches zentrosomales Signal von PCNT vorhanden war.

Die Quantifizierung von jeweils 100 Zellen (vgl. 3.1) ergab eine signifikante Reduktion der zentrosomalen PCNT-Signale in MCPH1^{427insA} Lymphoblasten um ca. 60% ($p = 7,2 \times 10^{-6}$) im Vergleich zur Kontrolle (Abb. 3-8 C, Tab. 3-2). Die Analyse von Zentrosomen in G₀/G₁- und S/G₂-Phase-Zellen zeigte, dass zentrosomales PCNT in beiden Zellzyklusphasen reduziert war.

Tabelle 3-2: Intensitäten des zentrosomalen PCNT-Signals in Pixel³. Dargestellt sind Mittelwerte (absolute Werte) aus der Messung von 100 Interphasezellen mit einem (G₀/G₁-Phase) oder zwei (S/G₂-Phase) Zentrosomen. Die Ermittlung der p-Werte in Bezug auf die Kontroll-Lymphoblasten erfolgte mittels zweiseitigen Student's t-Tests.

	LBC	MCPH1 ^{427insA}
G ₀ /G ₁ + S/G ₂	393,55	149,58
p-Wert	-	7,2 x 10 ⁻⁶
G ₀ /G ₁	300,01	110,4
p-Wert	-	0,13
S/G ₂	420,27	192,03
p-Wert	-	2,8 x 10 ⁻⁴

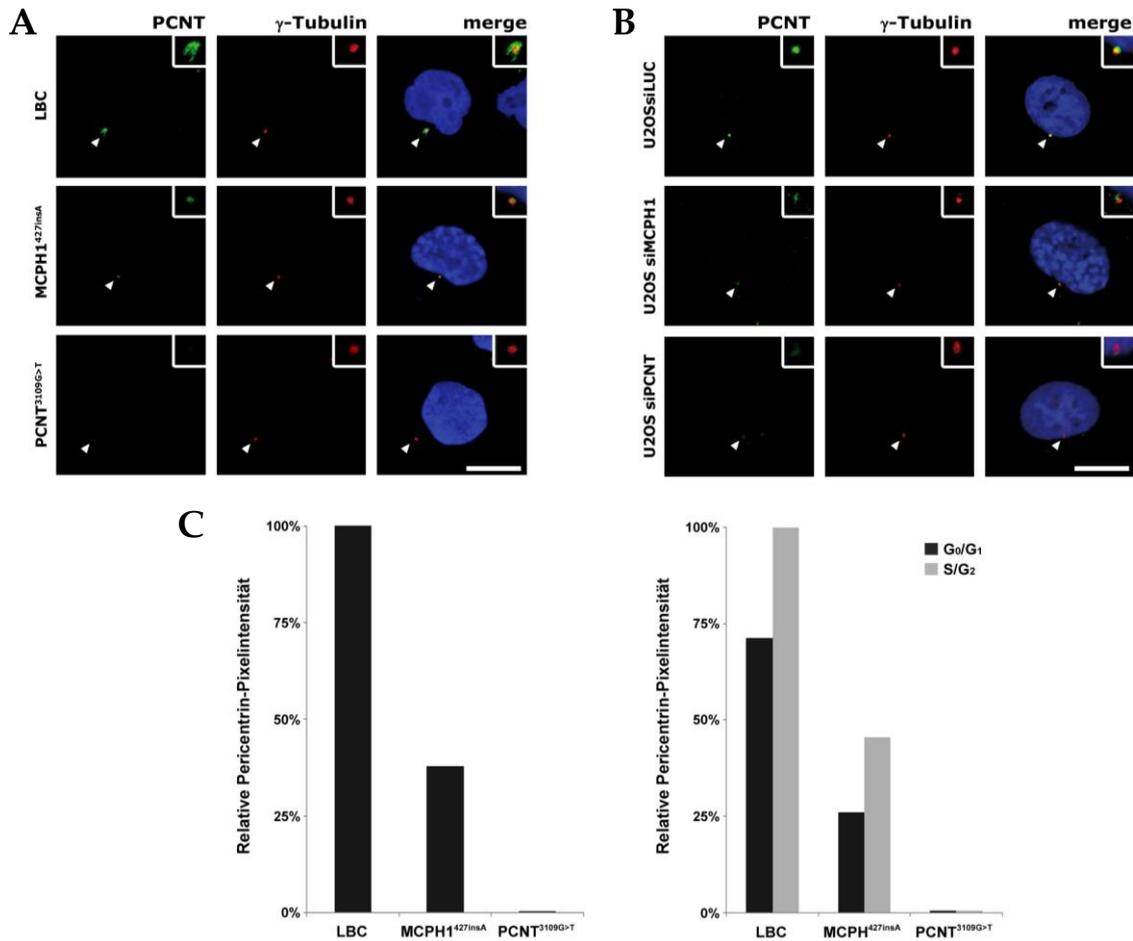


Abbildung 3-8: Reduktion des zentrosomalen PCNT-Signals in MCPH1-defizienten Lymphoblasten und MCPH1-depletierten U2OS-Zellen. Konfokale Aufnahmen von (A) MCPH1^{427insA}, PCNT^{3109G>T} und Kontroll-Lymphoblasten (LBC) sowie (B) U2OS-Zellen, 72h nach der Transfektion mit MCPH1-spezifischer (siMCPH1), PCNT-spezifischer (siPCNT) und Kontroll- siRNA (siLUC). Immunfluoreszenzfärbung mit polyklonalem Kaninchen-anti-PCNT (grüner Kanal) und monoklonalem Maus-anti- γ -Tubulin Antikörper (roter Kanal). DNA-Färbung mit To-PRO3 (blauer Kanal). Die Pfeilköpfe deuten auf Zentrosomen, die innerhalb einzelner Abbildungen in Ausschnitten vergrößert dargestellt sind. Der Maßstabsbalken entspricht 10 μ m. (C) Quantifizierung zentrosomaler PCNT-Signale, aufgenommen am konfokalen Laser-Scanning Mikroskop in 13 z-Ebenen. Aus der Messung von je 100 Zellen ermittelten mittleren Pixelintensitätswerte von zentrosomalem PCNT, normalisiert auf den Wert der Kontroll-Lymphoblasten (100%). Auswertung erfolgte ohne (links) oder mit Einteilung (rechts) in G₀/G₁- (ein Zentrosom) und S/G₂- Phase-Zellen (zwei Zentrosomen).

Die Western Blot Analyse der zentrosomalen Extrakte aus MCPH1^{427insA}, PCNT^{3109G>T} und Kontroll-Lymphoblasten mit PCNT-spezifischem Antikörper bestätigte die Ergebnisse der Immunfluoreszenzanalysen. So konnten in zentrosomalen Fraktionen von MCPH1-defizienten Lymphoblasten im Gegensatz zu Kontroll-Lymphoblasten nur geringe Mengen von PCNT nachgewiesen werden (Abb. 3-9). Eine schwache Reduktion des PCNT-Levels wurde auch im Gesamtzelllysat von MCPH1-defizienten Zellen detektiert (Abb. 3-9 rechts und Abb. 3-4 B).

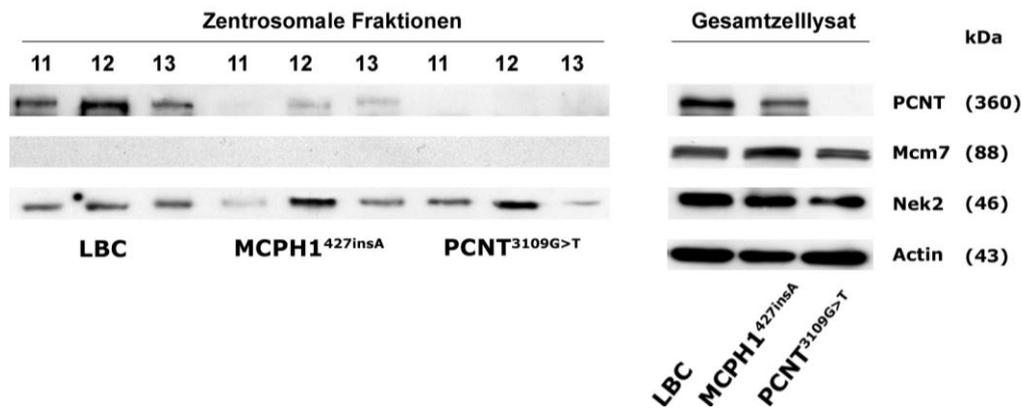


Abbildung 3-9: Reduktion des zentrosomalen PCNT-Niveaus in MCPH1-defizienten Zellen. Nachweis von PCNT (Isoform B) in zentrosomalen Fraktionen von MCPH1^{427insA}, PCNT^{3109G>T} und Kontroll-Lymphoblasten (LBC) mit polyklonalem Kaninchen-anti-PCNT Antikörper mittels Western Blot. Der Nachweis von Nek2 (zentrosomales Protein) diente als Ladekontrolle. Der Immunoblot mit einem Antikörper gegen Mcm7 (nukleäres Protein) diente dem Ausschluss einer nukleären Kontamination. Für die Input-Kontrolle wurden PCNT, Nek2 und Mcm7 in Gesamtzelllysaten mittels Western Blot nachgewiesen, mit Actin als Ladekontrolle. Das Molekulargewicht der Proteinbanden ist in kDa angegeben.

Des Weiteren wurde untersucht, inwiefern der Verlust von MCPH1 bzw. PCNT die Rekrutierung weiterer struktureller oder regulatorischer Komponenten des Zentrosoms beeinträchtigt. Hierzu wurde mittels konfokaler Laser-Scanning Mikroskopie die subzelluläre Distribution von Cep170, Centrin, Nek2 und γ -Tubulin in MCPH1- und PCNT-defizienten Zellen bewertet. Cep170, Centrin (beides zentrioläre Proteine) und Nek2-Kinase sind involviert in die Organisation der zentrosomalen Struktur sowie die Duplikation von Zentrosomen. Da die subzelluläre Distribution dieser Proteine zellzyklusabhängig variiert, wurden die Untersuchungen an synchronisierten Zellen durchgeführt. Dafür wurden MCPH1^{427insA}, PCNT^{3109G>T} und Kontroll-Lymphoblasten mit Mimosin in der G₁-/frühen S-Phase arretiert und 6 Stunden nach dem Auswaschen des Mimosins mit Nek2-, Centrin-, Cep170- und γ -Tubulin-spezifischen Antikörpern immungefärbt. Nek2, Cep170 und Centrin waren in allen drei Zelllinien zentrosomal lokalisiert, ohne einen evidenten Unterschied in der Signalintensität (Abb. 3-10 A, B, C).

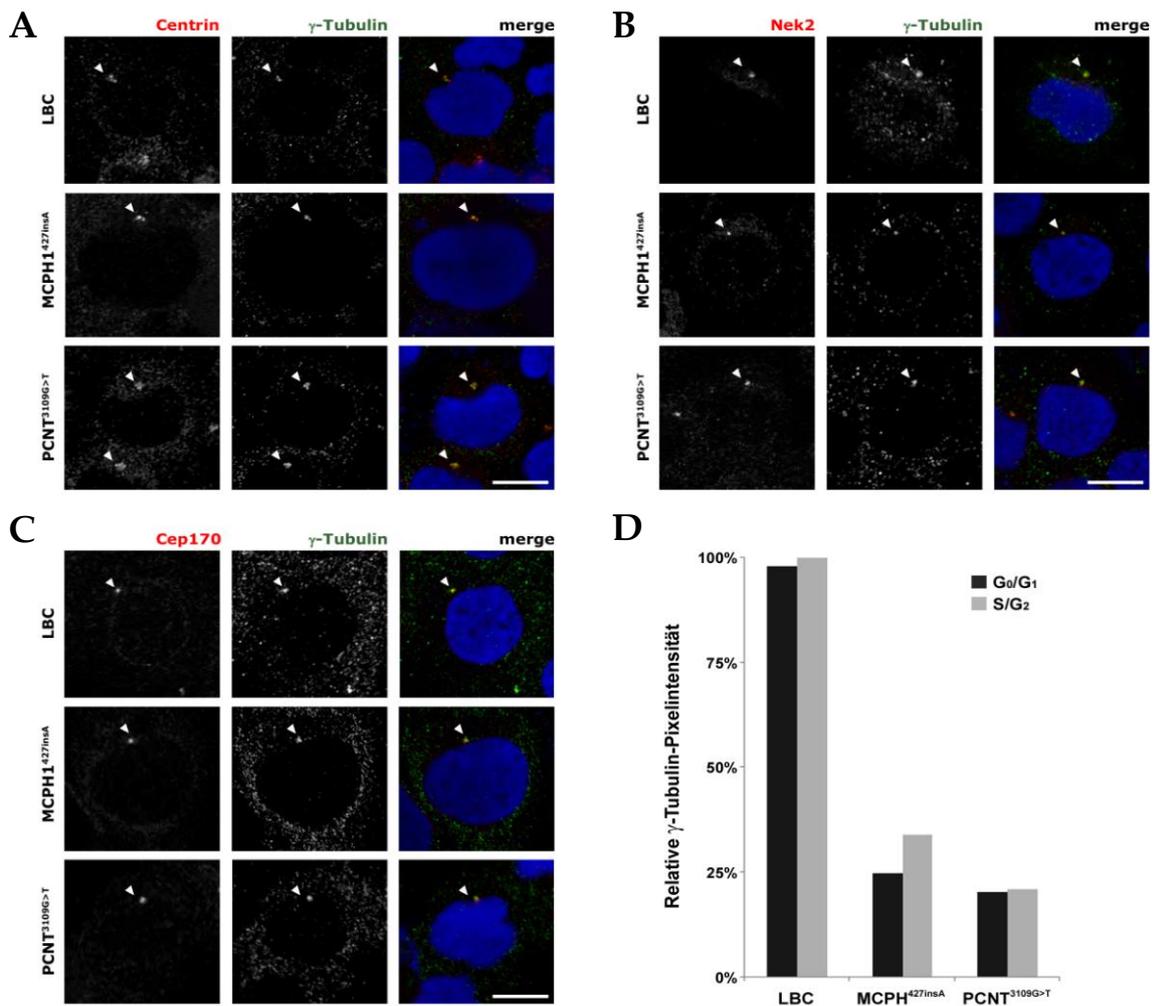


Abbildung 3-10: Zentrosomale Signale von Centrin, Nek2, Cep170 und γ -Tubulin in MCPH1- und PCNT-defizienten Lymphoblasten. (A-C) Konfokale Aufnahmen von synchronisierten MCPH1^{427insA}, PCNT^{3109G>T} und Kontroll-Lymphoblasten (LBC). Immunfluoreszenz-Doppelfärbung mit polyklonalem Kaninchen-anti- γ -Tubulin und monoklonalem Maus-anti-Centrin (A), monoklonalem Maus-anti-Nek2 (B) oder monoklonalem Maus-anti-Cep170 Antikörper (C). DNA-Färbung mit To-PRO3. Die Pfeilköpfe deuten auf Zentrosomen. Der Maßstabsbalken entspricht 10 μ m. (D) Quantifizierung des zentrosomalen γ -Tubulin-Signals in exponentiell wachsenden MCPH^{427insA}, PCNT^{3109G>T} und Kontroll-Lymphoblasten, aufgenommen am konfokalen Laserscannmikroskop in 13 z-Ebenen. Dargestellt sind die aus der Messung von je 100 Zellen ermittelten mittleren Pixelintensitätswerte des zentrosomalen γ -Tubulin-Signals, normalisiert auf den Wert der Kontroll-Lymphoblasten (100%). Die Auswertung erfolgte mit Einteilung in G₀/G₁- (ein Zentrosom) bzw. S/G₂- Phase-Zellen (zwei Zentrosomen).

γ -Tubulin hat eine wichtige Funktion in der Nukleation von Mikrotubuli. Die Immunfluoreszenzfärbung von exponentiell wachsenden Lymphoblasten mit einem γ -Tubulin-spezifischen Antikörper zeigte eine Reduktion des zentrosomalen γ -Tubulin-Signals in MCPH1- und PCNT-defizienten Lymphoblasten (vgl. Abb. 3-2 A, 3-3 A). Die Quantifizierung von jeweils 100 Zellen der MCPH1^{427insA}, PCNT^{3109G>T} und Kontroll-Lymphoblasten ergab, dass im Vergleich zur Kontrolle die zentrosomalen γ -Tubulin-Signale in MCPH1-defizienten Zellen um ca. 70% und in PCNT-defizienten Zellen um ca. 80%

reduziert waren, unabhängig davon, ob sich die Zellen in der G₀/G₁- oder S/G₂-Phase befanden (Abb. 3-10 D, Tab. 3-3).

Tabelle 3-3: Intensitäten des zentrosomalen γ -Tubulin-Signals in Pixel³. Dargestellt sind Mittelwerte (absolute Werte) aus der Messung von 100 Interphasezellen mit einem (G₀/G₁-Phase) oder zwei (S/G₂-Phase) Zentrosomen. Die Ermittlung der p-Werte in Bezug auf die Kontroll-Lymphoblasten erfolgte mittels zweiseitigen Student's t-Tests.

	LBC	MCPH1 ^{427insA}	PCNT ^{3109G>T}
G ₀ /G ₁ + S/G ₂	3023,34	887,53	626,36
p-Wert	-	7,7 x 10 ⁻⁹	9,8 x 10 ⁻¹²
G ₀ /G ₁	2991,10	755,01	626,36
p-Wert	-	7,7 x 10 ⁻⁹	4,6 x 10 ⁻⁸
S/G ₂	3053,58	1036,97	641,33
p-Wert	-	5 x 10 ⁻¹²	8,3 x 10 ⁻¹⁷

3.6. MCPH1 interagiert mit PCNT *in vivo*

Um zu untersuchen, ob PCNT und MCPH1 *in vivo* interagieren, wurden Co-Immunpräzitationen (Co-IP) durchgeführt (vgl. 3.3). Dabei wurde PCNT aus dem Zelllysate von U2OS immunpräzipitiert, die transient das GFP-MCPH1-Fusionsprotein exprimierten. Unter Verwendung eines GFP-spezifischen Antikörpers im Western Blot konnte im Co-Präzipitat GFP-MCPH1 nachgewiesen werden (Abb. 3-11 A). Bei der reziproken Co-IP wurde aus dem gleichen Zelllysate GFP-MCPH1 mit GFP-spezifischem Antikörper immunpräzipitiert. Auch hier konnte im Western Blot mit PCNT-spezifischem Antikörper gezeigt werden, dass PCNT mit GFP-MCPH1 co-präzipitiert (Abb. 3-11 B).



Abbildung 3-11: Transient exprimiertes GFP-MCPH1 interagiert mit endogenem PCNT *in vivo*. (A) PCNT wurde aus dem Zelllysate von U2OS-Zellen, transient transfiziert mit einem GFP-MCPH1-Expressionskonstrukt, mit polyklonalem Kaninchen-anti-PCNT Antikörper immunpräzipitiert. Das GFP-MCPH1-Fusionsprotein wurde mittels Western Blot mit GFP-spezifischem Antikörper im Co-Präzipitat nachgewiesen. Input entspricht 10% der für die Co-IP eingesetzten Proteingesamtmenge. Eine Immunpräzipitation mit HA-spezifischem Antikörper diente als Negativ-Kontrolle. (B) Reziproke Immunpräzipitation von GFP-MCPH1 mit einem monoklonalen Maus-anti-GFP Antikörper aus dem gleichen Zelllysate wie bei (A). PCNT (Isoform B) wurde mittels Western Blot mit PCNT-spezifischem Antikörper im Co-Präzipitat nachgewiesen. Das Molekulargewicht der Proteinbanden ist in kDa angegeben.

3.7. PCNT interagiert mit Chk1 *in vivo*

Die vorausgehenden Experimente zeigten, dass MCPH1 sowohl mit Chk1 als auch mit PCNT *in vivo* interagiert. Mittels einer weiteren Co-Immunpräzipitation sollte untersucht werden, ob PCNT mit Chk1 interagiert und welchen Einfluss MCPH1-Defizienz auf diese Interaktion hat. Dafür wurde das endogene Chk1 aus den Zelllysaten von MCPH1^{427insA} und Kontroll-Lymphoblasten mit Chk1-spezifischem Antikörper immunpräzipitiert und das endogene PCNT im Western Blot mit PCNT-spezifischem Antikörper in den Co-Präzipitaten detektiert. PCNT konnte aus beiden Zelllysaten (Kontroll- und MCPH1^{427insA}-Lymphoblasten) mit Chk1 co-präzipitiert werden, was auf eine MCPH1-unabhängige *in vivo* Interaktion zwischen PCNT und Chk1 hindeutete. Das Ergebnis wurde durch eine reziproke Co-Immunpräzipitation verifiziert, bei der das endogene PCNT mit PCNT-spezifischem Antikörper immunpräzipitiert und das endogene Chk1 in Co-Präzipitaten im Western Blot nachgewiesen wurde (Abb. 3-12).

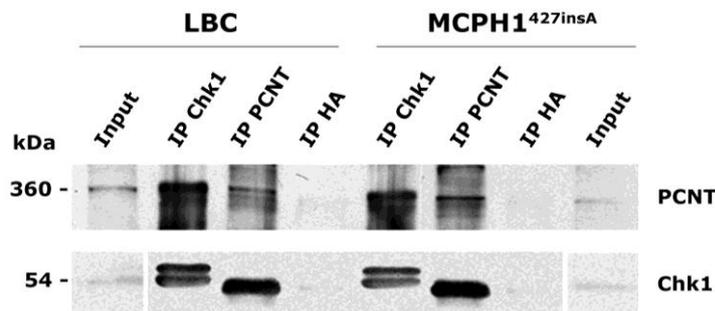


Abbildung 3-12: PCNT interagiert mit Chk1 *in vivo*. Western Blot Nachweis des endogenen PCNT (Isoform B) bzw. Chk1 in Immunpräzipitaten aus Kontroll (LBC)- und MCPH1^{427insA}-Lymphoblasten. Die Immunpräzipitation erfolgte unter Verwendung von polyklonalem Kaninchen-anti-PCNT oder monoklonalem Maus-anti-Chk1 Antikörper. Input entspricht 10% der für die Co-IP eingesetzter Proteingesamtmenge. Eine Immunpräzipitation mit HA-spezifischem Antikörper diente als Negativ-Kontrolle. Das Molekulargewicht detektierter Proteinbanden ist in kDa angegeben.

In den Chk1-Immunpräzipitaten wurde im Western Blot mit einem monoklonalen Maus-anti-Chk1 Antikörper eine langsam migrierende Proteinbande bei > 54 kDa detektiert. Diese Bande entspricht wahrscheinlich der schweren Kette des Immunglobulins, also des monoklonalen anti-Chk1-Antikörpers, der für die Co-IP verwendet wurde. Mit dem polyklonalen Kaninchen-anti-PCNT Antikörper konnten in den Immunpräzipitaten mehrere Proteinbanden detektiert werden, die den unterschiedlichen Isoformen von PCNT (inklusive der dominanteren Isoform B bei ca. 360 kDa) entsprechen.

3.8. Die zentrosomale Lokalisation von PCNT ist unabhängig von Chk1

Die konfokale Laser-Scanning Mikroskopie-Analyse von U2OS-Zellen, die mit Chk1-spezifischer siRNA transfiziert und mit PCNT-spezifischem Antikörper immungefärbt wurden, zeigte, dass die RNAi-vermittelte Depletion von Chk1 keinen Einfluss auf die zentrosomale Lokalisation von PCNT hat (Abb. 3-13 A). Auch Chk1-defiziente Lymphoblasten des Huhns (DT40^{Chk1-/-}) wiesen keine Änderungen in der Lokalisation bzw. Intensität der PCNT-Signale auf, wie der Vergleich zu den Wildtyp-Lymphoblasten (DT40) zeigte (Abb. 3-13 B). Mittels Western Blot wurde die Chk1-Defizienz der DT40^{Chk1-/-}-Zellen sowie die RNAi-vermittelte Depletion von Chk1 in U2OS-Zellen verifiziert (Abb. 3-13 C).

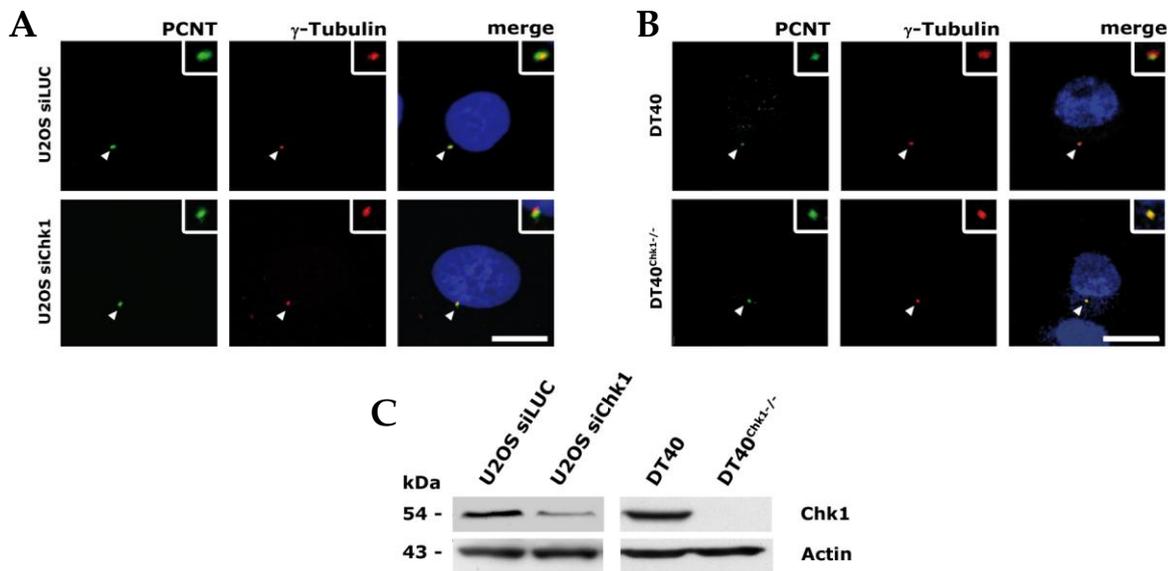


Abbildung 3-13: Die zentrosomale Lokalisation von PCNT ist unabhängig von Chk1. Konfokale Aufnahmen von (A) U2OS-Zellen, 72h nach Transfektion mit Chk1-spezifischer (siChk1) bzw. Kontroll-siRNA (siLUC), und (B) Chk1-defizienten (DT40^{Chk1-/-}) und Wildtyp (DT40) B-Lymphoblasten des Huhns. Immunfluoreszenzfärbung mit monoklonalem Maus-anti- γ -Tubulin (roter Kanal) und polyklonalem Kaninchen-anti-PCNT Antikörper (grüner Kanal). DNA-Färbung mit To-PRO3 (blauer Kanal). Die Pfeilköpfe deuten auf Zentrosomen, die innerhalb einzelner Abbildungen in Ausschnitten vergrößert dargestellt sind. Der Maßstabsbalken entspricht 10 μ m. (C) Western Blot von Gesamtzelllysaten der DT40^{Chk1-/-} und DT40 Lymphoblasten sowie U2OS-Zellen, 48h nach Transfektion mit siChk1 oder siLUC, unter Verwendung eines monoklonalen Maus-anti-Chk1 Antikörpers. Der Nachweis von Actin diente als Ladekontrolle. Das Molekulargewicht der Proteinbanden ist in kDa angegeben.

3.9. Chk1, PCNT und GFP-MCPH1 liegen in einem Proteinkomplex vor

Die Ergebnisse der Co-Immunpräzipitationsversuche zeigten, dass Chk1, PCNT und GFP-MCPH1 *in vivo* miteinander interagieren. Als Nächstes wurde untersucht, ob diese drei Proteine in einem Proteinkomplex in der Zelle vorliegen könnten. Dafür wurde das Zelllysate von U2OS-Zellen, die das GFP-MCPH1-Fusionsprotein exprimieren, über eine Superose 6 Gelfiltrationssäule unter nativen Bedingungen aufgetrennt. Die Western Blot Analyse der gesammelten Fraktionen zeigte unterschiedliche Elutionsprofile für Chk1, PCNT und GFP-MCPH1 (Abb. 3-14). Während Chk1 ungefähr gleichmäßig in den Fraktionen detektierbar war, zeigte GFP-MCPH1 ein distinkteres Elutionsprofil (Fraktionen 15-21 und 30). PCNT (Isoform A und B) konnte nur in zwei Fraktionen (16 und 17, rot hervorgehoben) detektiert werden, in denen gleichzeitig auch Chk1 und GFP-MCPH1 nachgewiesen wurden. Anhand der Elutionsprofile von externen Standards konnte diesem potentiellen Proteinkomplex ein Molekulargewicht von über 2 MDa zugewiesen werden.

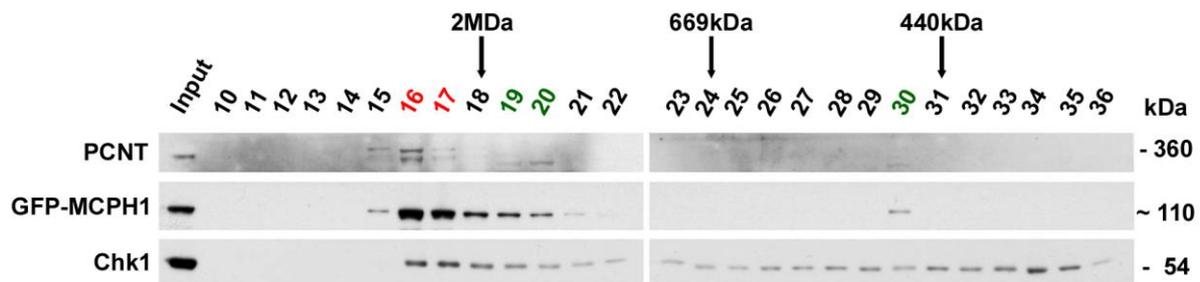


Abbildung 3-14: PCNT, GFP-MCPH1 und Chk1 migrieren in einem großen Proteinkomplex. Western Blot Analyse der Gelfiltrationsfraktionen mit monoklonalen Maus-anti-Chk1, Maus-anti-GFP und polyklonalem Kaninchen-anti-PCNT Antikörper. Die Proteinextrakte aus U2OS-Zellen, 24h nach der Transfektion mit dem GFP-MCPH1-Konstrukt, wurden mittels FPLC-Systeme unter Verwendung einer Superose 6 Gelfiltrationssäule nach Größe (Stoke's Radius) fraktioniert. Die Elutionsprofile von Gelfiltrationsstandards Blue Dextran (>2 MDa), Thyroglobulin (669 kDa) und Ferritin (440 kDa) dienen der Ermittlung von Molekulargrößen der Proteinkomplexe. Die rot hervorgehobenen Fraktionsnummern deuten auf Fraktionen mit koeluiertem PCNT (Isoform A und B), GFP-MCPH1 und Chk1 hin. Grün hervorgehoben sind Fraktionen, in denen GFP-MCPH1, Chk1 zusammen mit einer kleineren potentiellen Isoform von PCNT (ca. 200 kDa) koeluiert wurden. Das Molekulargewicht der detektierten Proteinbanden ist in kDa angegeben.

In Fraktionen 19, 20 und 30 (Abb. 3-14, grün hervorgehoben) wurde mit PCNT-spezifischem Antikörper eine Proteinbande bei ca. 200 kDa detektiert, die möglicherweise einer kleineren PCNT-Isoform entspricht. In diesen Fraktionen wurden Chk1 und GFP-MCPH1 ebenfalls

nachgewiesen. Somit komigrierten Chk1 und GFP-MCPH1 mit einer kleineren Isoform von PCNT in zwei weiteren potentiellen Proteinkomplexen, die ca. 1,7 MDa (Fraktionen 19, 20) und ca. 500 kDa (Fraktion 30) groß waren.

3.10. Vorzeitige Aktivierung des Cyclin B/Cdk1-Komplexes in MCPH1- und PCNT- defizienten Zellen

Der Eintritt in die Mitose erfolgt nach der Aktivierung von Cyclin B/Cdk1, die am Zentrosom initiiert und durch ein komplexes Proteinnetzwerk reguliert wird. Zentrosomen-assoziiertes Chk1 verhindert die vorzeitige Aktivierung des Cyclin B/Cdk1-Komplexes über eine inhibitorische Phosphorylierung der Phosphatase Cdc25B am Serin 230 und die daraus resultierende Inhibition der Dephosphorylierung von phospho-Tyr15-Cdk1 (Krämer et al., 2004; Schmitt et al., 2006).

Im Folgenden wurde untersucht, welchen Einfluss der Verlust von zentrosomalem Chk1 auf die zelluläre Lokalisation sowie den Phosphorylierungsstatus von Cdc25B und Cdk1 und somit auf die Initiierung der Mitose in MCPH1- und PCNT-defizienten Lymphoblasten hat.

3.10.1. Zentrosomale Delokalisation von Chk1 führt zur vorzeitigen Aktivierung von zentrosomen-assoziiertem Cdc25B und Cdk1

Die Bestimmung des Phosphorylierungsstatus von Cdc25B und Cdk1 in Abhängigkeit von MCPH1 bzw. PCNT setzte eine Synchronisierung der untersuchten Zellen voraus. Dafür wurden MCPH1^{427insA}, PCNT^{3109G>T} und Kontroll-Lymphoblasten mit Mimosin in der G₁-/frühen S-Phase synchronisiert und für 8 Stunden bis zum Erreichen der G₂-Phase im Mimosin-freien Medium kultiviert. Die Zellen wurden anschließend mit Antikörpern gegen phospho-Ser230-Cdc25B (P-S230-Cdc25B) und γ -Tubulin doppelgefärbt. Die fluoreszenzmikroskopische Auswertung der Immunfärbungen ergab, dass nur 14,0 \pm 2,6% der MCPH1-defizienten Lymphoblasten (***, p=0,0006) und 36,7 \pm 1,5% der PCNT-defizienten Lymphoblasten (**, p=0,006) ein zentrosomales P-S230-Cdc25B-Signal aufwiesen, wohingegen dieses in 65,7 \pm 5,1% der Kontroll-Lymphoblasten detektierbar war (Abb. 3-15 A, B).

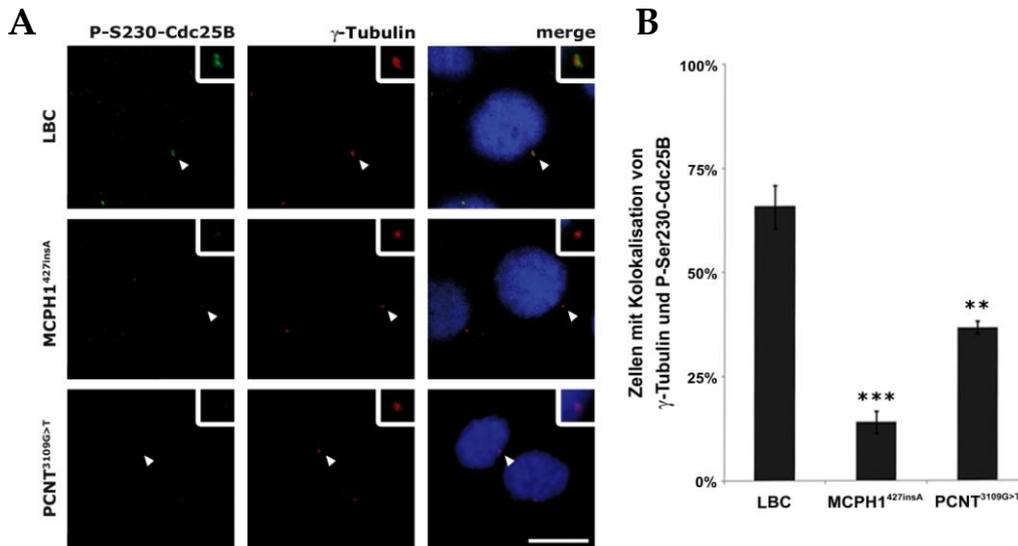


Abbildung 3-15: Vorzeitige Dephosphorylierung von Cdc25B in MCPH1- und PCNT-defizienten Lymphoblasten. (A) Konfokale Aufnahmen von synchronisierten MCPH1^{427insA}, PCNT^{3109G>T} und Kontroll-Lymphoblasten (LBC) in der G₂-Phase, 8h nach Mimosinblock. Immunfluoreszenzfärbung mit monoklonalem Maus-anti- γ -Tubulin (roter Kanal) und polyklonalem Kaninchen-anti-P-S230-Cdc25B (grüner Kanal) Antikörper. DNA-Färbung mit To-PRO3 (blauer Kanal). Die Pfeilköpfe deuten auf Zentrosomen, die innerhalb einzelner Abbildungen in Ausschnitten vergrößert dargestellt sind. Der Maßstabsbalken entspricht 10 μ m. (B) Prozentualer Anteil der Interphasezellen mit zentrosomalem P-S230-Cdc25B-Signal. Dargestellt sind Mittelwerte mit entsprechenden Standardabweichungen aus drei unabhängigen Experimenten. Sterne zeigen statistische Signifikanz im Vergleich zu Kontroll-Lymphoblasten (zweiseitiger Student's t-Test).

Eine ähnliche Verteilung zeigte die Immunfärbung der synchronisierten Lymphoblasten mit phospho-Tyr15-Cdk1-spezifischem (P-Y15-Cdk1) Antikörper: Das zentrosomale Signal von phospho-Cdk1 konnte in $27,3 \pm 5,1\%$ der Kontroll-Lymphoblasten und in $5,7 \pm 1,5\%$ der MCPH1^{427insA} (*, p=0,013) bzw. in $10,0 \pm 1,7\%$ (*, p=0,019) der PCNT^{3109G>T} Lymphoblasten detektiert werden (Abb. 3-16 A, C). Die Immunfluoreszenzfärbung mit Cdk1-spezifischem Antikörper zeigte in nahezu allen untersuchten Interphasezellen eine zentrosomale Lokalisation von Cdk1, unabhängig von der Präsenz von MCPH1 bzw. PCNT (Abb. 3-16 B, C). Demzufolge ist nur der Phosphorylierungsstatus von Cdk1 in MCPH1- und PCNT-defizienten Lymphoblasten verändert, nicht jedoch die Lokalisation.

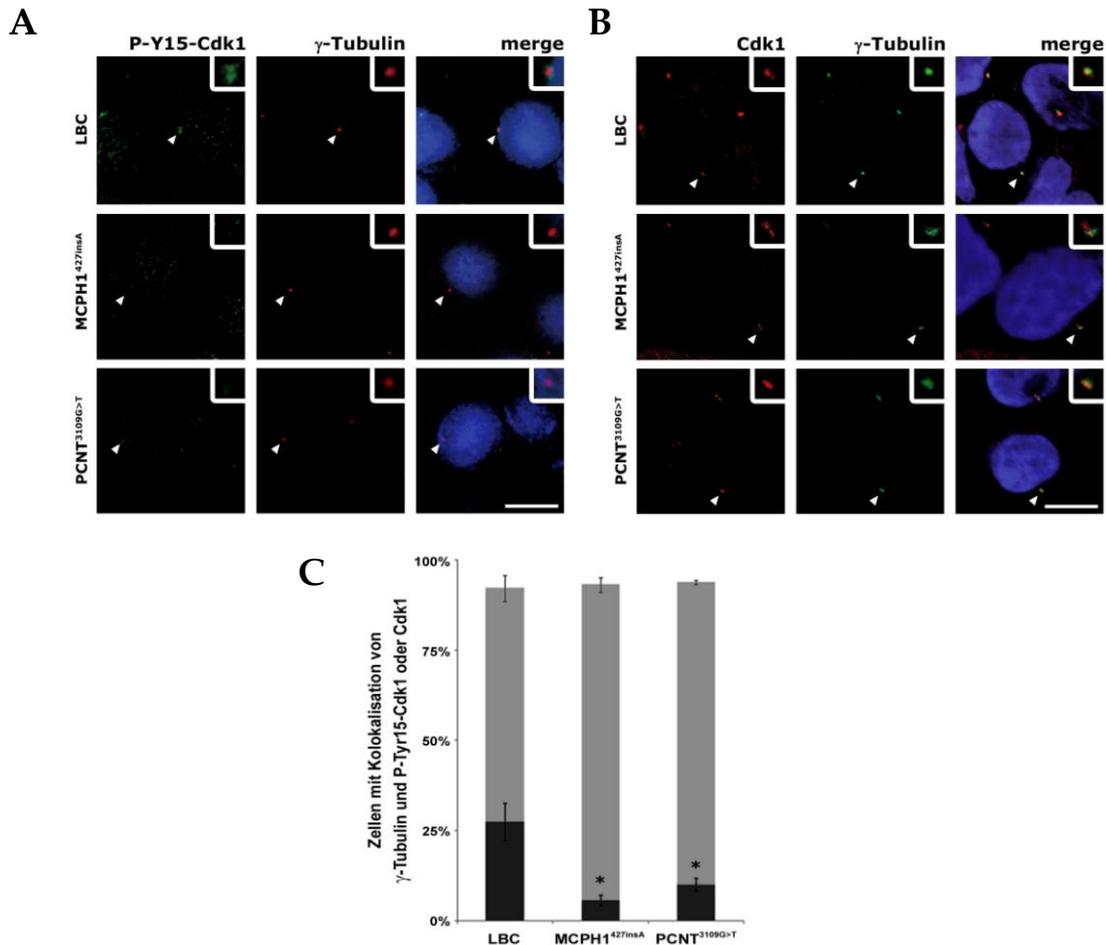


Abbildung 3-16: Vorzeitige Aktivierung von zentrosomen-assoziiertem Cdk1 in MCPH1- und PCNT-defizienten Lymphoblasten. Konfokale Aufnahmen von synchronisierten MCPH1^{427insA}, PCNT^{3109G>T} und Kontroll-Lymphoblasten (LBC) in der G₂-Phase, 8h nach Mimosinblock. Immunfluoreszenzfärbung mit (A) monoklonalem Maus-anti- γ -Tubulin (roter Kanal) und polyklonalem Kaninchen-anti-P-Y15-Cdk1 Antikörper (grüner Kanal) bzw. mit (B) monoklonalem Maus-anti-Cdk1 (roter Kanal) und polyklonalem Kaninchen-anti- γ -Tubulin Antikörper (grüner Kanal). DNA-Färbung mit To-PRO3 (blauer Kanal). Die Pfeilköpfe deuten auf Zentrosomen, die innerhalb einzelner Abbildungen in Ausschnitten vergrößert dargestellt sind. Der Maßstabsbalken entspricht 10 μ m. (C) Prozentualer Anteil der Interphasezellen mit γ -Tubulin/P-Y15-Cdk1-Kolokalisation (schwarze Balken) bzw. γ -Tubulin/Cdk1-Kolokalisation (graue Balken). Dargestellt sind Mittelwerte mit entsprechenden Standardabweichungen aus drei unabhängigen Experimenten. Sterne zeigen statistische Signifikanz im Vergleich zu Kontroll-Lymphoblasten (zweiseitiger Student's t-Test).

Die Western Blot Analyse der zentrosomalen Extrakte aus MCPH1^{427insA}, PCNT^{3109G>T} und Kontroll-Lymphoblasten mit P-S230-Cdc25B-, P-Y15-Cdk1- und Cdk1-spezifischen Antikörpern bestätigte die Ergebnisse der Immunfluoreszenzanalysen. In den zentrosomalen Fraktionen von MCPH1- und PCNT-defizienten Lymphoblasten wurden im Gegensatz zu den Kontroll-Lymphoblasten keine oder nur sehr geringe Mengen von phospho-Cdc25B bzw. phospho-Cdk1 detektiert, wohingegen Gesamt-Cdk1 in allen zentrosomalen Extrakten nachweisbar war (Abb. 3-17). Auch in Gesamtzelllysaten von allen drei Zelllinien konnten

gleiche Proteinmengen an Gesamt-Cdk1 nachgewiesen werden, Gesamt-Cdc25B war hingegen in MCPH1- und PCNT-defizienten Lymphoblasten reduziert.

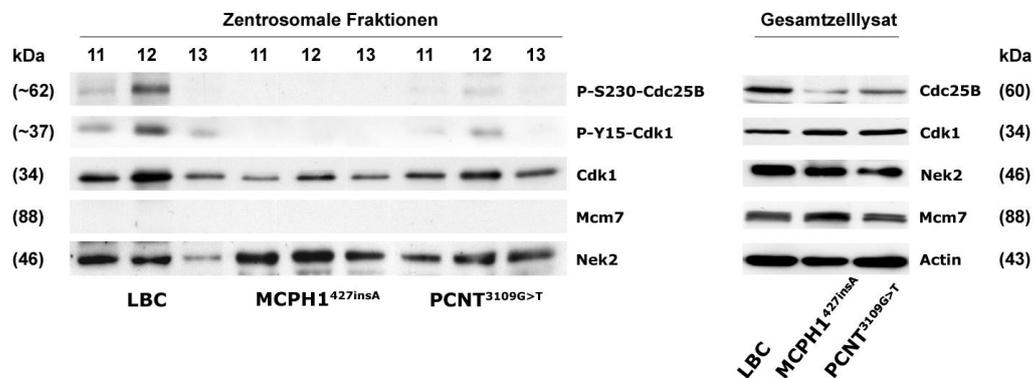


Abbildung 3-17: Zentrosomale Level von P-S230-Cdc25B und P-Y15-Cdk1 sind reduziert in MCPH1- und PCNT-defizienten Lymphoblasten. Western Blot Analyse von zentrosomalen Extrakten aus MCPH1^{427insA}, PCNT^{3109G>T} und Kontroll-Lymphoblasten (LBC) mit monoklonalem Maus-anti-Cdk1, polyklonalen Kaninchen-anti-P-S230-Cdc25B und Kaninchen-anti-P-Cdk1 Antikörper. Der Nachweis von Nek2 (zentrosomales Protein) diene als Ladekontrolle. Der Immunoblot mit dem Antikörper gegen Mcm7 (nukleäres Protein) diene dem Ausschluss einer nukleären Kontamination. Zur Input-Kontrolle wurden Cdc25B, Cdk1, Nek2 und Mcm7 in Gesamtzelllysaten mittels Western Blot nachgewiesen, mit Actin als Ladekontrolle. Das Molekulargewicht der Proteinbanden ist in kDa angegeben.

3.10.2. Die Depletion von zentrosomalem Chk1 induziert einen vorzeitigen Eintritt in die Mitose in MCPH1- und PCNT-defizienten Zellen

Der Verlust des zentrosomalen Chk1, bedingt durch MCPH1- und PCNT-Defizienz, resultierte in einer verfrühten Aktivierung von Cdk1 in G₂-Phase-Zellen. Die Auswirkungen der vorzeitigen Cdk1-Aktivierung auf die Zellzyklusverteilung wurden zunächst in U2OS-Zellen nach RNAi-vermittelter Depletion von MCPH1 und PCNT mittels Durchflusszytometrie (FACS) untersucht. Für die Ermittlung des mitotischen Index wurden U2OS-Zellen 48 Stunden nach der zweiten Transfektion mit einem Antikörper gegen das mitotische Markerprotein phospho-Ser10-Histon H3 (P-S10-Histon H3) immungefärbt. Die Verteilung der Zellpopulation auf verschiedene Zellzyklusphasen wurde über die Fluoreszenzintensität des DNA-interkalierenden Propidiumiodids erfasst, die direkt proportional zum DNA-Gehalt der Zelle ist. Die FACS-Profile von U2OS-Zellen, transfiziert mit MCPH1- und PCNT-spezifischer siRNA, zeigten einen deutlichen Anstieg der G₂-Population im Vergleich zur Kontroll-siRNA (Abb. 3-18 A obere Reihe). Auch der Anteil an

P-S10-Histon H3-positiven Zellen war bei MCPH1- und PCNT-depletierten U2OS-Zellen erhöht (Abb. 3-18 A untere Reihe). Der mitotische Index, ermittelt aus drei unabhängigen Messungen von jeweils 50.000 Zellen, lag bei $1,36 \pm 0,02\%$ in U2OS, transfiziert mit Kontroll-siRNA, und stieg signifikant an auf $2,93 \pm 0,44\%$ (*, $p=0,02$) bzw. $2,04 \pm 0,07\%$ (**, $p= 0,001$) nach RNAi-vermittelter Depletion von MCPH1 bzw. PCNT (Abb. 3-18 B).

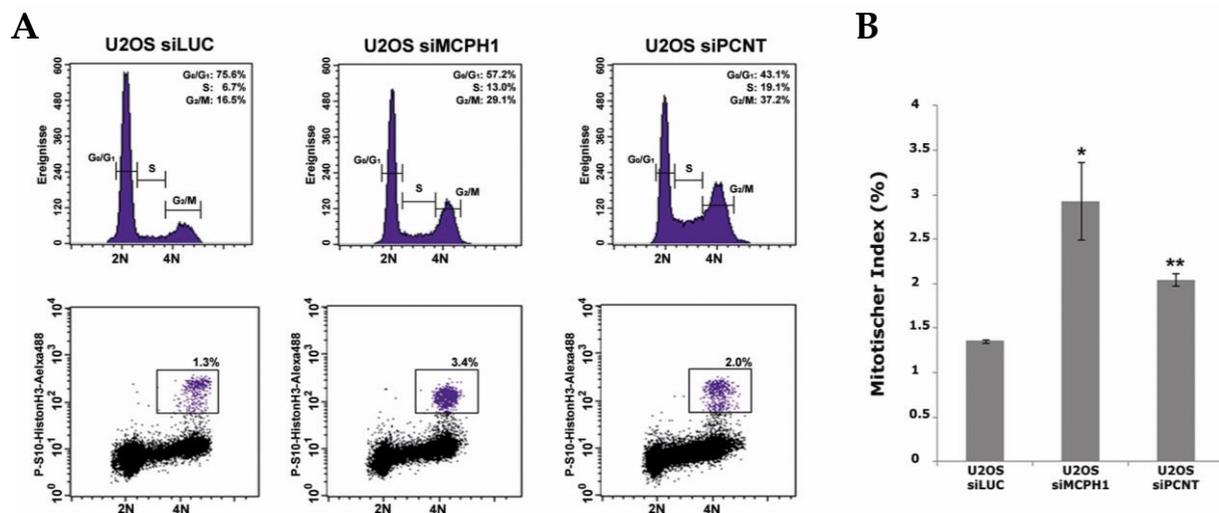


Abbildung 3-18: RNAi-vermittelte Depletion von MCPH1 und PCNT führt zu einem erhöhten mitotischen Index in U2OS-Zellen. (A) FACS-Profil von U2OS-Zellen, 72h nach Transfektion mit MCPH1-spezifischer (siMCPH1), PCNT-spezifischer (siPCNT) sowie Kontroll-siRNA (siLUC). Die Zellen wurden mit Propidiumiodid und anti-P-S10-Histon H3 Antikörper gefärbt. Die Histogramme (obere Reihe) zeigen die Verteilung der Zellen in den benannten Zellzyklusphasen. Die Gegenfärbung von P-S10-Histon H3 (untere Reihe) gestattet innerhalb des G₂/M-Peaks die Differenzierung zwischen mitotischen Zellen (P-S10-Histon H3-positiv, violett hervorgehoben) und Zellen, die sich noch in der Interphase (G₂) befinden. Angegeben ist der Anteil der Zellen in G₀/G₁-, S- und G₂/M-Phase sowie mitotischer Zellen aus einer Messung von 50.000 Zellen. **(B)** Prozentualer Anteil der mitotischen Zellen (P-S10-Histon H3-positiv) aus drei unabhängigen FACS-Analysen von jeweils 50.000 Zellen. Dargestellt sind Mittelwerte mit entsprechenden Standardabweichungen sowie statistische Signifikanz (Sterne) im Vergleich zur siLUC-Transfektion (zweiseitiger Student's t-Test).

Die Teilung von U2OS-Zellen nach der Transfektion mit MCPH1-, PCNT- oder Luciferase-spezifischer siRNA wurde im Folgenden mittels *Live cell imaging* analysiert. Dabei wurden Zeitserien mit einer Gesamtdauer von 22 Stunden aufgezeichnet. Die Aufnahmen zeigten, dass die Mitosen von U2OS-Zellen, transfiziert mit Kontroll-siRNA (siLUC), im Durchschnitt ca. $60,34 \pm 1,85$ min dauerten (Abb. 3-19 A obere Reihe, B). Nach RNAi-vermittelter Depletion von MCPH1 bzw. PCNT konnte bei $43,3 \pm 13,3\%$ (siMCPH1, *, $p=0,03$) bzw. $27,8 \pm 7,7\%$ (siPCNT; *, $p=0,025$) der observierten Mitosen eine Verlängerung der Mitosedauer beobachtet werden (Abb. 3-19 A mittlere Reihe, C). Als verlängerte Mitosen wurden diejenigen gezählt, die länger als 69 min dauerten, entsprechend dem Mittelwert der

Mitosedauer nach der Transfektion mit Kontroll-siRNA zuzüglich fünf Standardabweichungen. Der errechnete Mittelwert der Mitosedauer, ermittelt aus der Analyse von jeweils 100 Mitosen, lag somit bei $99,16 \pm 17,91$ min in siMCPH1-transfizierten U2OS-Zellen bzw. bei $113,63 \pm 25,79$ min in siPCNT-transfizierten U2OS-Zellen (Abb. 3-19 B). Nach RNAi-vermittelter Depletion von PCNT resultierten außerdem $45,6 \pm 8,4\%$ (*, $p=0,01$) der Mitosen im Absterben der Zellen (Abb. 3-19 A untere Reihe, C).

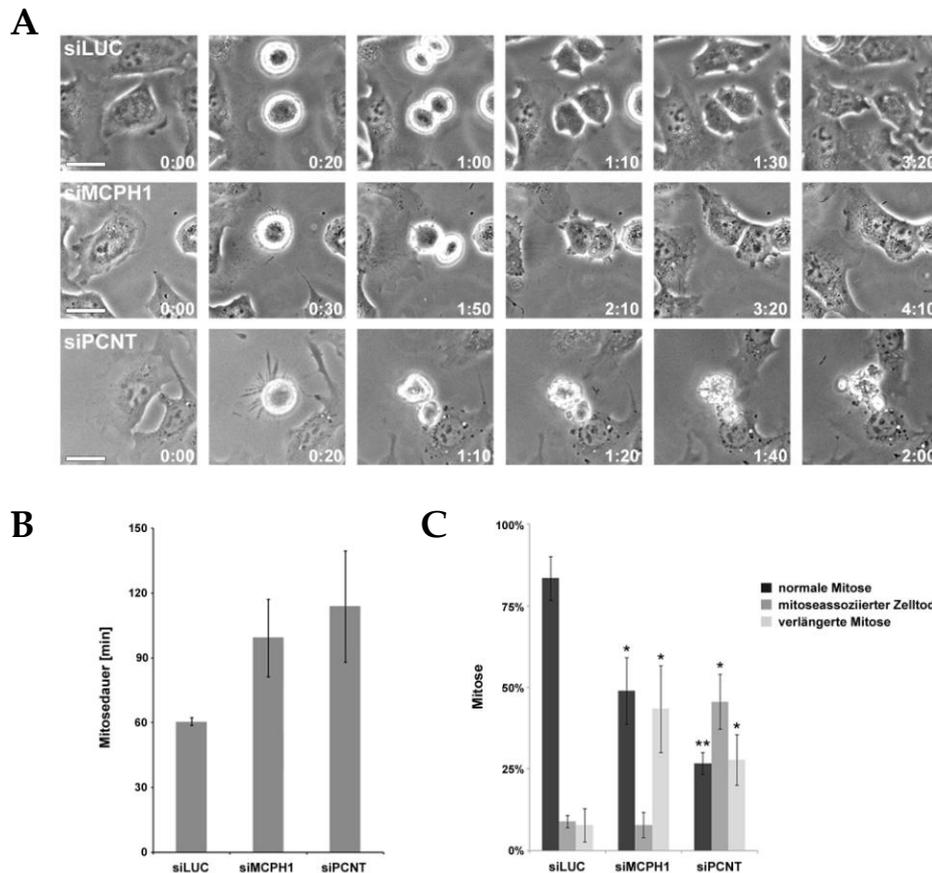


Abbildung 3-19: RNAi-vermittelte Depletion von MCPH1 und PCNT führt zur Verlängerung der Mitosedauer und zum mitoseassoziierten Zelltod in U2OS-Zellen. (A) Mikroskopische Zeitraffer-Aufnahmen von U2OS-Zellen, 72h nach Transfektion mit MCPH1-spezifischer (siMCPH1), PCNT-spezifischer (siPCNT) sowie Kontroll-siRNA (siLUC). Repräsentatives Beispiel einer normalen Mitose (obere Reihe), einer verlängerten Mitose (mittlere Reihe) und eines Zelltodes während der Mitose (untere Reihe). Zeitangaben in h:min. Der Maßstabsbalken entspricht 20 μ m. (B) Mittlere Mitosedauer mit entsprechenden Standardabweichungen, ermittelt aus der Zeitraffer-Analyse von jeweils 100 Mitosen. (C) Prozentualer Anteil normaler Mitosen, verlängerter Mitosen sowie mit Zelltod assoziierter Mitosen aus drei unabhängigen *Live cell imaging*-Untersuchungen. Dargestellt sind Mittelwerte mit entsprechenden Abweichungen sowie statistische Signifikanz (Sterne) im Vergleich zur siLUC-Transfektion (zweiseitiger Student's t-Test).

Der mitotische Index wurde auch in MCPH1- und PCNT-defizienten Lymphoblasten mittels Durchflusszytometrie ermittelt. Im Vergleich zur Kontrolle war der mitotische Index der MCPH1^{427insA} Lymphoblasten signifikant erhöht ($2,74 \pm 0,33\%$ versus $0,84 \pm 0,04\%$, **,

$p=0,009$), wie auch der Anteil an G_2 -Phase-Zellen in der erfassten Zellpopulation (Abb. 3-20 A, B). Die Zellzyklusverteilung der PCNT-defizienten Lymphoblasten entsprach weitgehend der von Kontroll-Lymphoblasten, der Anteil an mitotischen Zellen war jedoch erhöht ($1,03 \pm 0,12\%$ versus $0,84 \pm 0,04\%$). Ein statistisch signifikanter Unterschied zur Kontrolle ließ sich für diese Zellen jedoch nicht nachweisen.

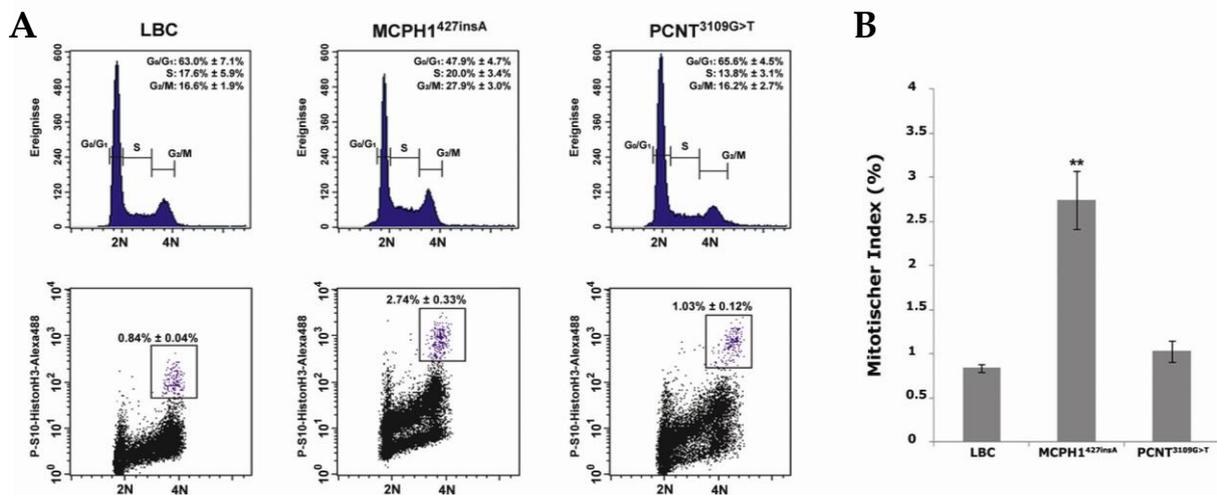


Abbildung 3-20: MCPH1-Defizienz führt zu einem erhöhten mitotischen Index. (A) FACS-Profiles von exponentiell wachsenden MCPH1^{427insA}, PCNT^{3109G>T} und Kontroll-Lymphoblasten. Die Zellen wurden mit Propidiumiodid und anti-P-S10-Histon H3 Antikörper gefärbt. Die Histogramme (obere Reihe) zeigen die Verteilung der Zellen in den benannten Zellzyklusphasen. Die Gegenfärbung von P-S10-Histon H3 (untere Reihe) gestattet innerhalb des G_2 /M-Peaks die Differenzierung zwischen mitotischen Zellen (P-S10-Histon H3-positiv, violett hervorgehoben) und Zellen, die sich noch in der Interphase (G_2) befinden. Angegeben ist der Anteil der Zellen in G_0 /G₁-, S- und G_2 /M-Phase sowie mitotischer Zellen aus drei unabhängigen Messungen von 50.000 Zellen. (B) Prozentualer Anteil der mitotischen Zellen (P-S10-Histon H3-positiv) aus drei unabhängigen FACS-Analysen von jeweils 50.000 Zellen. Dargestellt sind Mittelwerte mit entsprechenden Standardabweichungen sowie statistische Signifikanz (Sterne) im Vergleich zu Kontroll-Lymphoblasten (zweiseitiger Student's t-Test).

Durch ein „Rescue“-Experiment konnte gezeigt werden, dass eine transiente Expression von MCPH1 in MCPH1-defizienten Lymphoblasten eine Reduktion des mitotischen Index auf die Werte von Kontroll-Lymphoblasten bewirkt. Hierzu wurde zunächst ein MCPH1-FLAG-Expressionskonstrukt hergestellt, indem die MCPH1-cDNA unter Verwendung der Primer MCPH1_{EcoR1} und MCPH1_{pCMVr} sowie des Template-Plasmids pEGFP-C1-MCPH1 mittels PCR amplifiziert und in die EcoRI/Sall- Schnittstellen des pCMV-Tag4A-Vektors kloniert wurde. Die exponentiell wachsende MCPH1^{427insA} Lymphoblasten wurden mittels Elektroporation mit dem Expressionskonstrukt transfiziert und 12 Stunden nach der Transfektion mittels Durchflusszytometrie analysiert. Dabei zeigten die FACS-Profiles der mit MCPH1-FLAG transfizierten MCPH1^{427insA} eine signifikante Reduktion des mitotischen Index

auf $0,75 \pm 0,1\%$ ($p=0,04$) im Vergleich zu MCPH1^{427insA} ($1,28 \pm 0,2\%$), die mit leerem pCMV-Tag4A-Vektor transfiziert wurden (Abb. 3-21).

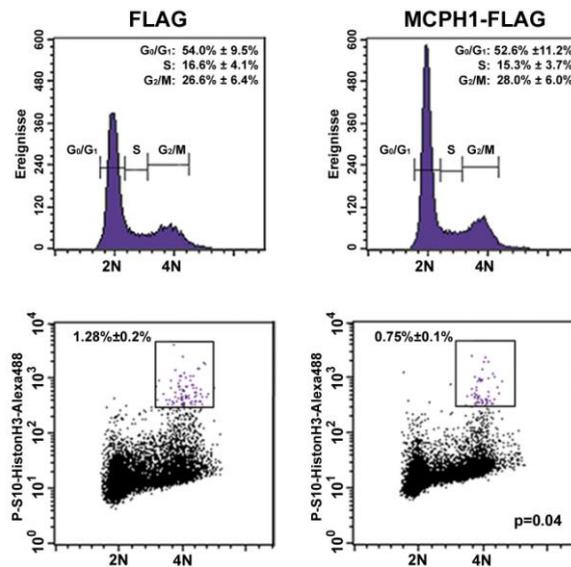


Abbildung 3-21: „Rescue“ des mitotischen Index nach transienter Expression von MCPH1-FLAG in MCPH1-defizienten Lymphoblasten. FACS-Profilen von MCPH1^{427insA} Lymphoblasten nach transienter Transfektion mit leerem pCMV-Tag4A-Vektor (FLAG) oder dem MCPH1-FLAG-Expressionskonstrukt. Die Zellen wurden mit Propidiumiodid und anti-P-S10-Histon H3 Antikörper gefärbt. Die Histogramme (obere Reihe) zeigen die Verteilung der Zellen in den benannten Zellzyklusphasen. Die Gegenfärbung von P-S10-Histon H3 (untere Reihe) gestattet innerhalb des G₂/M-Peaks die Differenzierung zwischen mitotischen Zellen (P-S10-Histon H3-positiv, violett hervorgehoben) und Zellen, die sich noch in der Interphase (G₂) befinden. Angegeben ist der Anteil der Zellen in G₀/G₁-, S- und G₂/M-Phase sowie mitotischer Zellen aus drei unabhängigen FACS-Analysen von 35.000 Zellen.

Für die Ermittlung der Transfektionseffizienz wurden die MCPH1^{427insA} Lymphoblasten mit dem GFP-MCPH1-Expressionskonstrukt unter gleichen Bedingungen wie bei dem MCPH1-FLAG-Expressionskonstrukt transfiziert und 12 Stunden nach der Transfektion fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Die Transfektionsrate lag bei 70-80%.

3.11. MCPH1- und PCNT-defiziente Lymphoblasten weisen keinen Defekt im Intra-S-Phase-Checkpoint auf

Eine weitere bekannte Funktion von Chk1 besteht in der Regulation der S-Phase-Progression. Bei Auftreten von DNA-Schäden oder einer chemischen Inhibierung von DNA-Polymerasen werden die Replikationsgabeln geblockt und der Intra-S-Phase-Checkpoint, Chk1-vermittelt, aktiviert (Feijoo et al., 2001; Bartek et al., 2004). Die Fortsetzung der DNA-Synthese nach dem Replikationsblock ist somit Chk1-abhängig. Um zu prüfen, ob auch diese

Funktion von Chk1 in MCPH1- und PCNT-defizienten Zellen beeinträchtigt ist, wurden IdU / CldU-Doppelpulsmarkierungs-Versuche durchgeführt. Dabei wurden die Replikationsgabeln in exponentiell wachsenden MCPH1^{427insA}, PCNT^{3109G>T} und Kontroll-Lymphoblasten mit CldU markiert und anschließend mit Aphidicolin geblockt. Nach dem Entfernen des Aphidicolins wurden die fortschreitenden Replikationsgabeln durch Zugabe von IdU markiert. CldU- und IdU-Markierungen wurden fluoreszenzmikroskopisch ausgewertet und der Anteil der Zellen bestimmt, die sowohl CldU als auch IdU eingebaut haben. Die Abbildung 3-22 zeigt, dass die DNA-Synthese nach dem Replikationsblock in MCPH1^{427insA}, PCNT^{3109G>T} Lymphoblasten im gleichen Ausmaß fortgesetzt wurde wie in den Kontroll-Lymphoblasten, so dass man von einem intakten Intra-S-Phase-Checkpoint ausgehen kann.

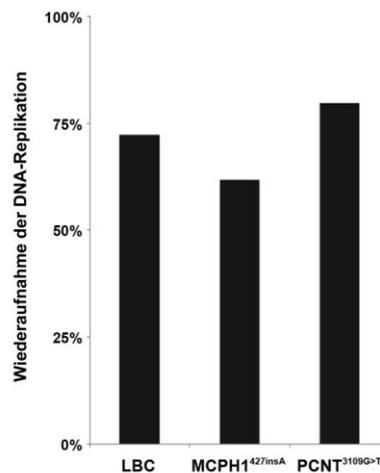


Abbildung 3-22: Die Chk1-abhängige Wiederaufnahme der DNA-Synthese nach DNA-Replikationsblock ist intakt in MCPH1- und PCNT-defizienten Lymphoblasten. Exponentiell wachsende MCPH1^{427insA}, PCNT^{3109G>T} und Kontroll-Lymphoblasten wurden mit CldU vor und mit IdU nach dem Replikationsblock mit Aphidicolin markiert. CldU wurde mit monoklonalem Ratte-anti-BrdU Antikörper, IdU mit monoklonalem Maus-anti-BrdU Antikörper in der Immunfluoreszenz detektiert. Dargestellt ist der prozentuale Anteil der Zellen, die ein CldU-Signal und zusätzlich ein IdU-Signal aufwiesen.

3.12. Vorzeitige Chromosomenkondensation in MCPH1-defizienten Zellen wird verstärkt durch Chk1-Immobilisierung am Zentrosom

Ein charakteristisches Merkmal der MCPH1-Defizienz ist die Präsenz von Zellen mit Prophase-ähnlichem PCC Phänotyp (*Premature Chromosome Condensation*), der auf eine

aberrante Regulation der Chromosomenkondensation zurückzuführen ist (Trimborn et al., 2004). Um den PCC-Phänotyp näher zu charakterisieren, wurden U2OS-Zellen mit MCPH1-spezifischer siRNA transfiziert und mittels Immunfluoreszenz untersucht. Die Immunfärbung mit Cyclin B-spezifischem Antikörper zeigte eine zytoplasmatische Verteilung des Cyclin B in PCC-Zellen, die auch G₂-Phase-Zellen der Kontroll-transfizierten U2OS aufwiesen (Abb. 3-23 A). Die PCC-Zellen hatten außerdem eine intakte Kernhülle und waren negativ für P-S10-Histon H3, wie die Immunfärbungen mit Lamin A-spezifischen bzw. P-S10-Histon H3-spezifischen Antikörpern zeigten (Abb. 3-23 B, C). Zusammenfassend deuteten diese Ergebnisse darauf hin, dass der PCC-Phänotyp einer vorzeitigen Chromosomenkondensation in der G₂-Phase entspricht.

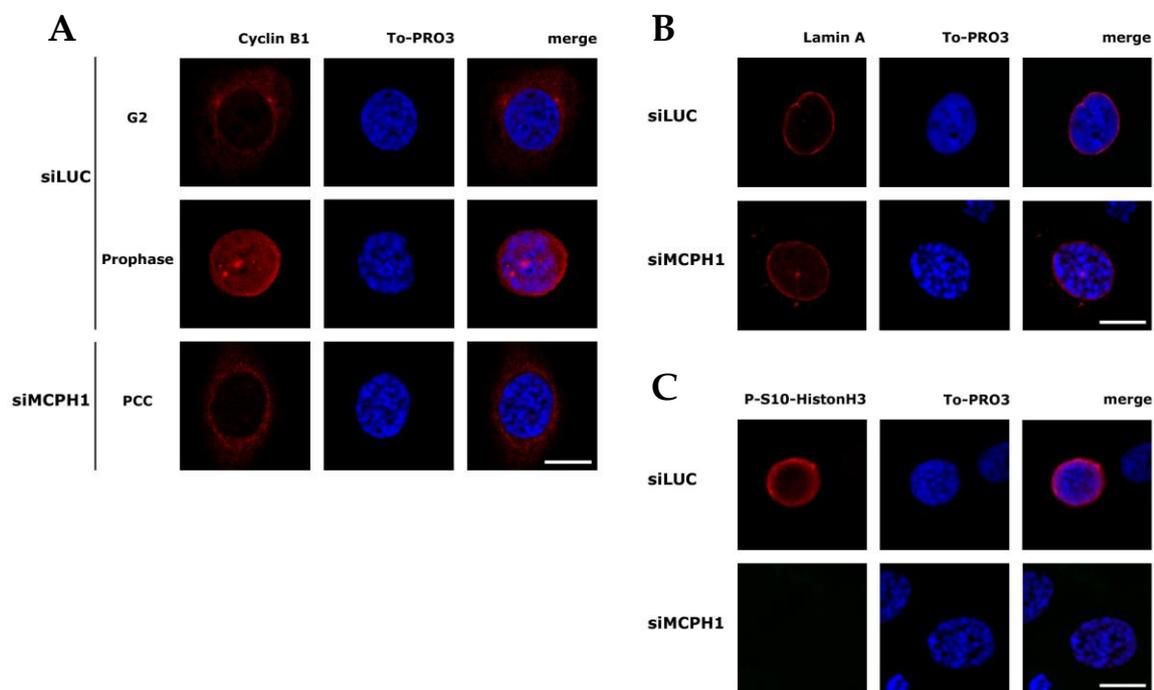


Abbildung 3-23: Charakterisierung des PCC Phänotyps in MCPH1-defizienten Zellen. Konfokale Aufnahmen von U2OS-Zellen, 72h nach der Transfektion mit MCPH1-spezifischer (siMCPH1) bzw. Kontroll-siRNA (siLUC). Immunfärbung mit monoklonalem Maus-anti-CyclinB (A), monoklonalem Maus-anti-LaminA (B) und polyklonalem Kaninchen-anti-P-S10-Histon H3 Antikörper (C), dargestellt im roten Kanal. DNA-Färbung mit To-PRO3 (blauer Kanal). Maßstabsbalken entspricht 10 μ m.

In U2OS-Zellen, die mit einem Tetracyclin-induzierbaren GFP-Chk1-PACT-Konstrukt stabil transfiziert waren (Chk1(WT)), führte die RNAi-vermittelte MCPH1-Depletion zu einer Anreicherung von PCC-Zellen (Abb. 3-23). Im GFP-Chk1-PACT-Konstrukt ist GFP-Chk1 an die PACT-Domäne (*PCNT-AKAP450 Centrosomal Targeting*) von AKAP450, einem

Ankerprotein der perizentriolären Matrix, fusioniert. Diese Fusion ermöglicht eine MCPH1- und PCNT-unabhängige Immobilisierung von Chk1 am Zentrosom, wodurch die Aktivierung von Cdk1 und somit der Eintritt in die Mitose unterbunden wird (Krämer et al., 2004). Nach der Depletion von MCPH1 war GFP-Chk1-PACT trotzdem am Zentrosom lokalisiert und der Anteil an PCC-Zellen lag bei $34,0 \pm 5,5\%$. Als Kontrolle diente die stabile Zelllinie Chk1(KD), bei der es sich um U2OS-Zellen handelt, die Tetracyclin-abhängig das Fusionsprotein GFP-Chk1(KD)-PACT mit Kinase-inaktiver Variante von Chk1 exprimieren. Nach MCPH1-Depletion wiesen nur $14,2 \pm 3,9\%$ der Chk1(KD)-Zellen den PCC-Phänotyp auf (***, $p=0,0002$), vergleichbar mit $16,2 \pm 2,3\%$ von Wildtyp-U2OS-Zellen nach der Transfektion mit siMCPH1 (***, $p=0,0008$).

Nach der Transfektion mit Kontroll-siRNA wurde der PCC-Phänotyp weder in U2OS, noch in Chk1(WT)- oder Chk1(KD)-Zellen beobachtet.

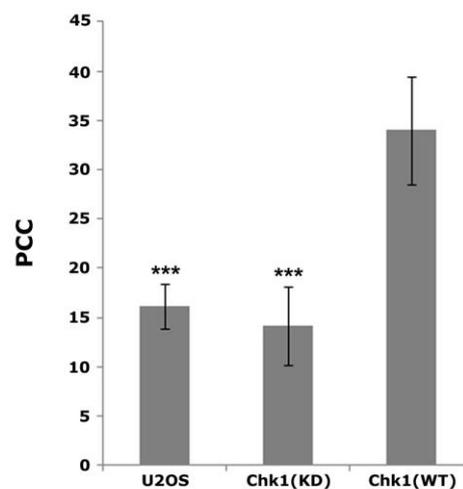


Abbildung 3-24: Immobilisierung von Chk1 am Zentrosom resultiert in einer Anreicherung von PCC-Zellen nach MCPH1-Depletion. 72h nach Transfektion mit MCPH1-spezifischer siRNA wurden U2OS-, Chk1(KD)- und Chk1(WT)-Zellen mit To-PRO3 gefärbt und fluoreszenzmikroskopisch ausgewertet. Die Expression von GFP-Chk1(WT)-PACT und GFP-Chk1(KD)-PACT wurde am ersten Tag nach siRNA-Transfektion mit Tetracyclin induziert. Dargestellt sind Mittelwerte von drei unabhängigen Experimenten mit entsprechenden Standardabweichungen sowie statistischer Signifikanz (Sterne) im Vergleich zu Chk1(WT) (zweiseitiger Student's t-Test).

3.13. Identifikation neuer Interaktionspartner von MCPH1

Die Aufklärung der MCPH1- und PCNT-abhängigen zentrosomalen Rekrutierung von Chk1 bedarf weiterer Analysen zur Entstehung und Regulation des MCPH1-PCNT-Chk1-Komplexes. Dies erfordert u.a. die Identifikation und Charakterisierung anderer Komponenten des Komplexes sowie neuer Interaktionspartner.

In folgenden Versuchen wurde die *in vivo* Interaktion von MCPH1 und Chk1 verifiziert und neue potentielle Interaktionspartner von MCPH1 im Hefe-Zwei-Hybrid-System (*Yeast-Two-Hybrid*) identifiziert.

3.13.1. *Yeast-Two-Hybrid-Screen*

Zur Identifikation neuer MCPH1-Interaktionspartner wurden GAL4-basierende Hefe-Zwei-Hybrid-Interaktionsstudien nach Protokollen aus dem "*Matchmaker™ Pretransformed Libraries User Manual*" (Clontech) durchgeführt. Dabei wurde das GAL4BD-MCPH1-Fusionsprotein als „bait“ für den Screen der „prey“-cDNA-Bibliothek aus humanem fötalen Gehirn eingesetzt. Diese cDNA-Bibliothek wurde ausgewählt, weil MCPH1 besonders stark im embryonalen Gehirn exprimiert wird (Jackson et al., 2002). Für die Herstellung des Hefeexpressionskonstruktes pGBKT7-MCPH1 (GAL4BD-MCPH1) wurde die vollständige MCPH1-cDNA unter Verwendung der Primer MCPH1_EcoR1 und MCPH1r2 sowie des Template-Plasmids pAcGFP-MCPH1 mittels PCR amplifiziert und in die EcoRI/Sall-Schnittstellen des pGBKT7-Vektors kloniert. Das Konstrukt wurde in den Hefestamm AH109 transformiert und die Expression des Fusionsproteins mittels Western Blot mit c-Myc spezifischem Antikörper nachgewiesen (Abb. 3-25 A). Der Antikörper erkennt das an GAL4BD bzw. GAL4BD-MCPH1 N-terminal fusionierte c-Myc-Epitop. Eine Aktivierung der Reportergentranskription allein durch die Expression des GAL4BD-MCPH1-Fusionsproteins (Autoaktivierung) konnte ausgeschlossen werden, da die GAL4BD-MCPH1 exprimierenden Hefezellen nicht auf den selektiven -Leu/-Trp/-His (-LTH) und -Ade/-Leu/-Trp/-His (-ALTH) SD-Agarplatten wuchsen (Abb. 3-25 B obere Reihe). Bei einer Kotransformation der Hefezellen mit pGBKT7-MCPH1 und leerem pGADT7-Vektor, der die kodierende Sequenz der GAL4-Aktivierungsdomäne enthält, konnte auch keine Autoaktivierung der Reportergene beobachtet werden (Abb. 3-25 B untere Reihe).

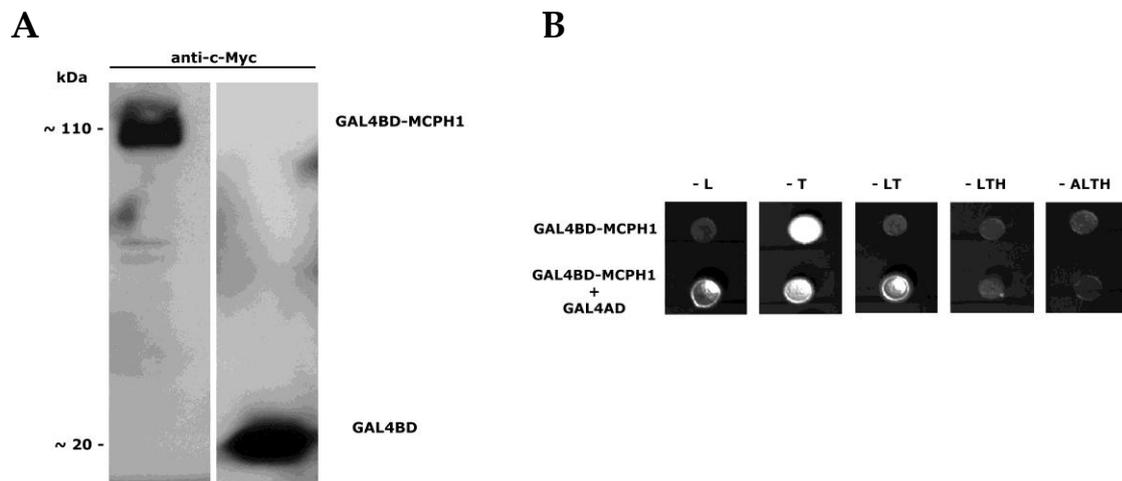


Abbildung 3-25: Test auf autonome Reporter-gen-Aktivierung durch GAL4BD-MCPH1. (A) Western Blot Analyse zur Expressionskontrolle von GAL4BD (rechts) und GAL4BD-MCPH1 (links) in transformierten *S. cerevisiae* AH109-Zellen. Der Nachweis erfolgte mit monoklonalem Maus-anti-c-Myc Antikörper. Das Molekulargewicht der Proteinbanden ist in kDa angegeben. (B) Wachstumstest transformierter *S. cerevisiae* AH109-Zellen. Die Hefezellen wurden entweder mit pGBKT7-MCPH1 allein oder zusammen mit pGADT7 transformiert und auf selektivem SD-Medium ausplattiert. Die Abwesenheit von Leucin (L) und Tryptophan (T) im Medium diente der Selektion für pGADT7- und pGBKT7-Konstrukte, die Abwesenheit von Histidin (H) und Adenin (A) dem Nachweis der Reporter-genexpression.

Im *Yeast-Two-Hybrid* System sollte die *in vivo* Interaktion zwischen MCPH1 und Chk1 verifiziert werden und als Positivkontrolle dienen. Dafür wurde die vollständige cDNA von Chk1 in der PCR unter Verwendung der Primer Chk1_EcoR1 und Chk1_Xho1 sowie des Template-Plasmids GFP-Chk1 amplifiziert und in die EcoRI/XhoI-Restriktionsschnittstellen des pGADT7-Vektors kloniert. Die AH109-Hefezellen wurden mit den Konstrukten pGBKT7-MCPH1 und pGADT7-Chk1 kotransformiert und auf -LTH und -ALTH Selektionsplatten kultiviert. Nach 48 Stunden Inkubation bei 30°C konnten auf den Platten zahlreiche Hefekolonien beobachtet werden (Abb. 3-26), was auf die aktivierte Transkription der Reporter gene HIS3 und ADE2 in den Kotransformanten schließen ließ. Hefezellen, kotransformiert mit pGBKT7-MCPH1-Konstrukt und leerem pGADT7-Vektor bzw. pGADT7-Chk1-Konstrukt und leerem pGBKT7-Vektor, waren hingegen nicht in der Lage auf SD-Medium ohne Histidin und Adenin zu wachsen.

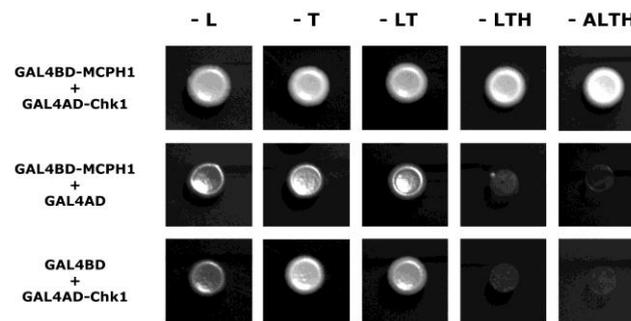


Abbildung 3-26: MCPH1 interagiert mit Chk1 im Yeast-Two-Hybrid-System. Wachstumstest kotransformierter *S. cerevisiae* AH109-Zellen. Die Hefezellen wurden mit pGBKT7-MCPH1 und pGADT7-Chk1 kotransformiert und auf selektivem SD-Medium ausplattiert. Als Negativkontrolle diente die Kontransformation mit den leeren Vektoren pGADT7 oder pGBKT7. Die Abwesenheit von Leucin (L) und Tryptophan (T) im Medium diente der Selektion für pGADT7- und pGBKT7-Konstrukte, die Abwesenheit von Histidin (H) und Adenin (A) dem Nachweis der Reporterexpression.

Der *Yeast-Two-Hybrid Screen* erfolgte durch sexuelle Verpaarung des mit GAL4BD-MCPH1 transformierten AH109-Hefestammes mit dem Y187-Stamm, der mit der cDNA-Bibliothek prätransformiert war. Die Hefezellen wurden auf -Ade/-Leu/-Trp/-His SD-Agarplatten ausplattiert und bei 30°C inkubiert. Es wurden insgesamt $7,7 \times 10^6$ Klone gescreent. Die ersten Klone konnten bereits nach 3 Tagen beobachtet werden, nach 7 Tagen wurden keine heranwachsenden Kolonien mehr berücksichtigt (*background*). Um den Selektionsdruck aufrecht zu erhalten, wurden die potentiell positiven Hefeklone dreimal auf frische -Ade/-Leu/-Trp/-His-SD-Agarplatten passiert. Insgesamt wurden 49 Klone isoliert, die unter hoch-stringenten Bedingungen gewachsen waren. Aus 21 Klonen wurde die Plasmid-DNA isoliert, sequenziert und mit der BLAST-Datenbank verglichen. Die Ergebnisse des Datenbankabgleichs sind in der Tabelle 3-4 zusammengefasst.

Tabelle 3-4: Im Yeast-Two-Hybrid-Screen identifizierte potentielle Interaktionspartner von MCPH1.

Gen	GenBank-Nr.	Anzahl der Klone	Annotation
GABARAPL2	AB030710	4	Intra Golgi-Transport, Autophagozytose
GFAP	J04569	2	Klasse III-Intermediärfilament
GNAS	AJ224867	2	G-Protein, α -Untereinheit
MRPL55	BC052806	2	Komponente der mitochondrialen Ribosomen
IK Cytokine	BC013005	2	unbekannt

Gen	GenBank-Nr.	Anzahl der Klone	Annotation
FAM101B	BC031341	2	unbekannt
CCDC13	NM_001033784	1	<i>Coiled-coil</i> Domäne
THAP11	BC012182	1	Transkriptionsfaktor
ASCC3L1	AJ844618	1	Helicase SKI2 Unterfamilie.
ZBTB38	NM_001080412	1	C ₂ H ₂ -Zinkfingerprotein
LARP6	BC014018	1	La-Typ HTH-Domäne
ZN644	BC050656	1	C ₂ H ₂ -Zinkfingerprotein
FYN	M14676	1	Tyrosinkinase

3.13.2. Vorläufige Charakterisierung eines potentiellen MCPH1-Interaktionspartners

Fünf der identifizierten putativen MCPH1-Interaktionspartner (GFAP, GNAS, THAP11, ASCC3L1 und CCDC13) sind Proteine mit einer *Coiled-Coil*-Struktur. Dieses Strukturmotiv ist in vielen Proteinfamilien verbreitet, wie z.B. bei zahlreichen Transkriptionsfaktoren mit Zinkfingermotiv. Aber auch zentrosomale Proteine, wie z. B. PCNT, AKAP450, Ninein und Cep135, haben multiple *Coiled-Coil*-Domänen, über welche unterschiedliche Protein-Protein-Interaktion mit wichtigen zentrosomalen Regulatoren stattfinden (Salisbury, 2003).

CCDC13 (*Coiled-Coil Domain-Containing protein 13*) ist ein bislang nicht näher charakterisiertes Protein mit vier vorhergesagten *Coiled-Coil*-Domänen. Die Interaktion mit MCPH1 wurde in einem reziproken *Yeast-Two-Hybrid* Assay verifiziert, bei dem MCPH1, fusioniert an die GAL4-Aktivierungsdomäne, mit GAL4BD-CCDC13-Fusionsprotein koexprimiert wurde. Die vollständige cDNA von CCDC13 wurde vom RZPD (Deutsches Ressourcenzentrum für Genomforschung GmbH, Berlin; Klon IRAT p970E0932D6) bezogen, kloniert im pBluescriptR-Vektor. Unter Verwendung von pBluescriptR-CCDC13 als Template-DNA sowie der Primer CCDC13_BDF und CCDC13_BDR wurde die CCDC13-cDNA mittels PCR amplifiziert und in die EcoRI/SalI- Schnittstellen des pGBKT7-Vektors kloniert. Die MCPH1-cDNA wurde mittels PCR unter Verwendung der Primer

MCPH1_EcoR1 und MCPH1_Xho1 sowie des Template-Plasmids GFP-MCPH1 amplifiziert und in die EcoRI/XhoI-Schnittstellen des pGADT7-Vektors kloniert. Die AH109-Hefezellen wurden mit beiden Konstrukten kotransformiert und auf -Leu/-Trp/-His und -Ade/-Leu/-Trp/-His SD-Medium kultiviert. Nach 3 Tagen Inkubation bei 30°C konnten zahlreiche Hefekolonien beobachtet werden, was auf eine Interaktion von GAL4BD-CCDC13 und GAL4-MCPH1 und eine daraus resultierende Transaktivierung der Reportergenexpression (HIS3 und ADE2) zurückzuführen ist. Bei Negativkontrollen (Kotransformationen mit leeren pGADT7- bzw. pGBKT7-Vektoren) konnte kein Wachstum auf selektiven Nährmedienplatten beobachtet werden. Somit wurde die Protein-Protein-Interaktion zwischen CCDC13 und MCPH1 im *Yeast-Two-Hybrid* System bestätigt.

Als Nächstes wurden die Expressionskonstrukte CCDC13-FLAG und CCDC13-GFP hergestellt, um die subzelluläre Distribution von CCDC13 analysieren zu können. Die vollständige CCDC13-cDNA wurde mittels PCR unter Verwendung von pGBKT7-CCDC13 als Template-DNA sowie der Primerpaare CCDC13_GFPf/CCDC13_GFPPr2 und CCDC13_GFPf/CCDC13_CMVr amplifiziert und in die EcoRI/SalI-Schnittstellen des pEGFP-N1- bzw. pCMV-Tag4A-Vektors kloniert. U2OS-Zellen wurden mit jeweils einem Konstrukt transfiziert und nach 48 Stunden mit γ -Tubulin-spezifischem Antikörper immungefärbt. Der Nachweis von CCDC13-FLAG erfolgte mittels Immunfärbung mit FLAG-spezifischem Antikörper. Die konfokale Laser-Scanning Mikroskopie-Analyse der Immunfärbungen zeigte eine Kollokalisierung des γ -Tubulin-Signals mit dem Signal von CCDC13-FLAG bzw. CCDC13-GFP (Abb. 3-27, A, B). Auch weitere Immunfluoreszenz-Doppelfärbungen mit PCNT-, MCPH1- oder Cep170-spezifischen Antikörpern bestätigten die zentrosomale Lokalisation von CCDC13. In U2OS-Zellen, transfiziert mit dem CCDC13-GFP-Konstrukt konnte man außerdem eine Ansammlung des Fusionsproteins im Zytoplasma beobachten, das jedoch möglicherweise ein Überexpressionsartefakt darstellte.

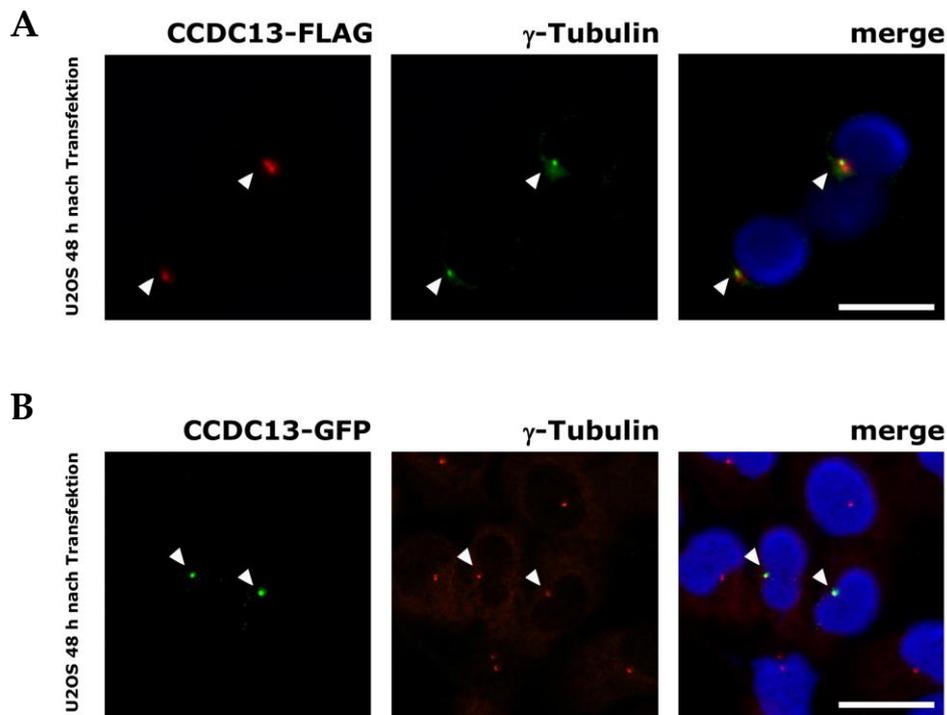


Abbildung 3-27: Zentrosomale Lokalisation von CCDC13-FLAG und CCDC13-GFP. Konfokale Aufnahmen von U2OS-Zellen, 48h nach Transfektion mit dem CCDC13-FLAG- bzw. CCDC13-GFP-Konstrukt. **(A)** Der Nachweis von CCDC13-FLAG erfolgte mit monoklonalem Maus-anti-FLAG Antikörper (roter Kanal) und einer Gegenfärbung mit polyklonalem Kaninchen-anti- γ -Tubulin Antikörper (grüner Kanal). **(B)** Immunfärbung mit monoklonalem Maus-anti- γ -Tubulin Antikörper (roter Kanal) sowie direkter Nachweis des GFP-Signals. DNA-Färbung mit To-PRO3 (blauer Kanal). Die Pfeilköpfe deuten auf Zentrosomen. Der Maßstabsbalken entspricht 40 μ m.

Des weiteren sollte untersucht werden, inwiefern CCDC13 analog zu MCPH1 einen Einfluss auf die zentrosomale Lokalisation von Chk1, PCNT oder γ -Tubulin hat. Hierzu wurden U2OS-Zellen mit CCDC13-spezifischer siRNA transfiziert und fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Die Immunfärbung mit Chk1- und γ -Tubulin-spezifischen Antikörpern zeigte eine Reduktion der zentrosomalen Signale beider Proteine nach RNAi-vermittelter Depletion von CCDC13, in vielen Zellen waren die Signale nicht detektierbar (Abb. 2-28 A). Diese Beobachtung muss jedoch noch quantitativ ausgewertet werden, da einige Zellen, wie Abbildung 2-28 A zeigt, noch ganz deutliche zentrosomale Signale von Chk1 und γ -Tubulin aufwiesen und möglicherweise untransfizierte Zellen repräsentierten.

Die Immunfluoreszenzfärbung mit einem PCNT-spezifischen Antikörper zeigte keinen Unterschied zwischen den Kontroll-siRNA- und CCDC13-siRNA-transfizierten Zellen (Abb. 3-28 B).

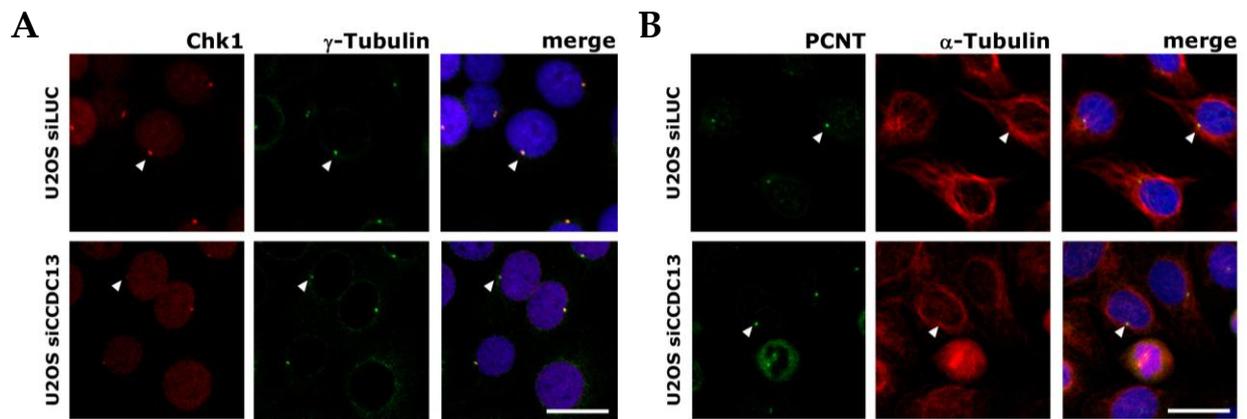


Abbildung 3-28: Reduktion von zentrosomalem Chk1 und γ -Tubulin, nicht jedoch von PCNT, nach RNAi-vermittelter Depletion von CCDC13. Konfokale Aufnahmen von U2OS-Zellen, 72h nach Transfektion mit CCDC13-spezifischer (siCCDC13) bzw. Kontroll-siRNA (siLUC). **(A)** Immunfluoreszenzfärbung mit monoklonalem Maus-anti-Chk1 Antikörper (roter Kanal) und polyklonalem Kaninchen-anti- γ -Tubulin Antikörper (grüner Kanal). **(B)** Immunfärbung mit monoklonalem Maus-anti- α -Tubulin Antikörper (roter Kanal) und polyklonalem Kaninchen-anti-PCNT Antikörper (grüner Kanal). DNA-Färbung mit To-PRO3 (blauer Kanal). Die Pfeilköpfe deuten auf Zentrosomen. Der Maßstabsbalken entspricht 40 μ m.

Zusammenfassend zeigen diese vorläufigen Untersuchungen, dass CCDC13 ähnlich wie MCPH1 zentrosomal lokalisiert ist und möglicherweise auch an der zentrosomalen Rekrutierung von Chk1 und γ -Tubulin beteiligt ist. Im Gegensatz zu MCPH1 hat CCDC13 jedoch keinen Einfluss auf die zentrosomale Lokalisation von PCNT.

4. Diskussion

In tierischen Zellen sind die Zentrosomen die wesentlichen Mikrotubulus-organisierenden Zentren (MTOC: *Microtubule Organising Center*), bestehend aus einem Paar Zentriolen, die in eine perizentrioläre Matrix (PCM: *Pericentriolar Matrix*) eingebettet sind. Die Zentrosomen erfüllen u.a. wichtige Funktionen in der Regulation der Zellpolarität, Zellmotilität sowie des zytoplasmatischen Organellentransports und fungieren als Basalkörper von Primärzilien in Interphasezellen. Während der Mitose ermöglichen sie die Ausbildung der Spindelpole und spielen eine wichtige Rolle in der Zytokinese. Abgesehen von ihrer konventionellen Funktion in der Nukleation und Organisation von Mikrotubuli besitzen Zentrosomen offensichtlich eine große Bedeutung als Knotenpunkte zahlreicher Signalnetzwerke. Mit Hilfe von massenspektrometrischen sowie vergleichenden genomischen Analysen des zentrosomalen Proteoms bzw. des Proteoms von Zilien und Flagellen wurden mehr als 200 zentrosomen-assoziierte Proteine identifiziert (Andersen et al., 2003; Li et al., 2004). Unter den Kandidaten befanden sich nicht nur Struktur- oder Motorproteine sondern auch viele Regulatoren diverser zellulären Prozesse wie z.B. des Zellzyklus, der Apoptose oder der Proteindegradation. Es ist noch nicht bekannt, ob die Komponenten des Zentrosoms über universelle Motive oder Domänen verfügen, viele Strukturproteine des Zentrosoms weisen jedoch eine *Coiled-Coil*-Tertiärstruktur auf, die oft in Protein-Protein-Interaktionen involviert ist (Rose und Meier, 2004). Somit fungieren die Zentrosomen wahrscheinlich als eine Art Gerüststruktur, an der die Komponenten bestimmter Signalwege lokal angereichert werden. Dieser Mechanismus limitiert nicht nur unspezifische Interaktionen, sondern ermöglicht auch eine räumliche und zeitliche Kontrolle regulatorischer Prozesse (Doxsey et al., 2005). So ist z.B. die zentrosomale Rekrutierung von Cyclin E in der G₁-Phase, unabhängig von der normalerweise assoziierten Cyclin-abhängigen Kinase 2 notwendig, um die DNA-Replikation zu initiieren (Matsumoto und Maller, 2004). Ebenso ist die zentrosomale Lokalisation von Cdc20, dem Coaktivator der zellzyklusregulierenden Ubiquitin-Ligase APC (*Anaphase Promoting Complex*), eine der Voraussetzungen für die Ausbildung der Dendriten bei postmitotischen Neuronen (Kim et al., 2009). Ein gut untersuchtes Beispiel für die zentrosomenabhängige Regulation der Zellzyklusprogression ist die Aktivierung von Cdk1 beim Übergang von der G₂-Phase in die Mitose (Abb.4-1). Während der Interphase

akkumulieren Cdk1 und Cyclin B an den Zentrosomen (Bailly et al., 1992), wobei man einen aktivierten zentrosomen-assoziierten Cyclin B/Cdk1-Komplex erst in der späten G₂-Phase bzw. Prophase detektieren kann (Jackman et al., 2003; Lindqvist et al., 2007). Die Aktivierung erfolgt durch die Dephosphorylierung von Cdk1 an Tyrosin 15 durch die ans Zentrosom rekrutierte Cdc25B Phosphatase (Dutertre et al., 2004; Krämer et al., 2004; Lindqvist et al., 2005). Cdk1 bindet an aktiviertes Cyclin B, der Cyclin B/Cdk1-Komplex wandert in den Zellkern bzw. ins Zytoplasma und leitet dort die Mitose ein (Pines und Rieder, 2001; Lindqvist et al., 2007). Die zeitliche Abfolge der Mitoseinitiierung unterliegt einer strikten Kontrolle. So verhindert die Checkpoint Kinase 1 (Chk1) den vorzeitigen Eintritt in die Mitose und induziert einen G₂/M-Arrest in Anwesenheit einer DNA-Schädigung (Chen et al., 2003b; Krämer et al., 2004), indem sie am Zentrosom die Cdc25B Phosphatase inhibitorisch phosphoryliert (Schmitt et al., 2006).

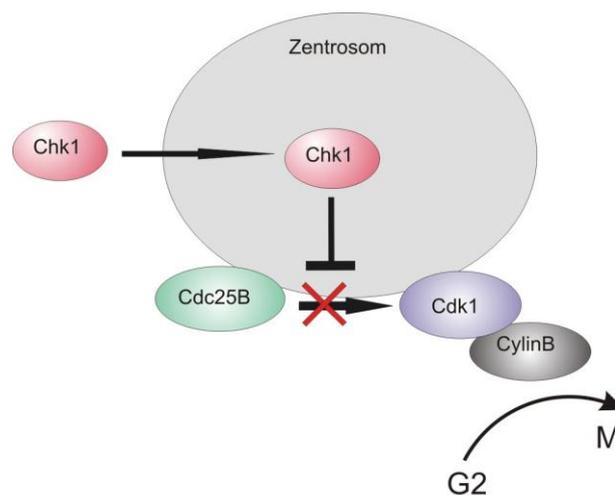


Abbildung 4-1: Vereinfachtes Modell zentrosomen-assoziiierter Prozesse, die den Eintritt in die Mitose über die Regulation des Cyclin B/Cdk1-Komplexes kontrollieren.

Es wurde gezeigt, dass ein Teil des zellulären Chk1 in Interphasezellen, jedoch nicht in mitotischen Zellen, zentrosomen-assoziiert ist (Krämer et al., 2004). Chk1 enthält zwei Kernlokalisations-signale und ist hauptsächlich im Zellkern lokalisiert. Es ist nicht bekannt, welche Domänen oder Struktur-motive für die zentrosomale Rekrutierung von Chk1 notwendig sind. Abgesehen von einigen Hinweisen, dass eine Änderung im Phosphorylierungsstatus von Chk1 (Phosphorylierung an Serin 345) am Übergang von der G₂-Phase in die Mitose die Chk1-Dissoziation vom Zentrosom bewirkt (Wilsker et al., 2008),

bleibt es weitgehend ungeklärt, wie die zentrosomale Lokalisation von Chk1 im Laufe des Zellzyklus reguliert wird.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die zentrosomalen Proteine MCPH1 und PCNT während der Interphase Chk1 an das Zentrosom rekrutieren. Ein Verlust von MCPH1 oder PCNT führt zu einem Verlust von zentrosomalem Chk1 und dem Ausfall der regulatorischen Inhibierung des Cyclin B/Cdk1-Komplexes am Zentrosom. Somit könnte diese Deregulierung der Mitoseinitiierung der gemeinsame pathologisch veränderte Signalweg sein, der bei den Erkrankungen, die auf Mutationen im *MCPH1*- bzw. *PCNT*-Gen zurückzuführen sind, einen ähnlichen klinischen Phänotyp im Sinne von Mikrozephalie und Kleinwüchsigkeit bedingt.

4.1. Zentrosomale Chk1-Lokalisation in Abhängigkeit von MCPH1 und PCNT

4.1.1. Chk1 und MCPH1 - Komponenten eines Signalnetzwerks?

Chk1 ist in eine Vielzahl von komplexen Signalwegen involviert, die für eine geregelte Zellzyklusprogression verantwortlich sind und die im Zuge der zellulären Antwort auf eine DNA-Schädigung induziert werden. Die Funktion von Chk1 in der zellulären Antwort auf genotoxischen Stress sowie Replikationsstress wurde umfangreich untersucht. Chk1 spielt eine zentrale Rolle in der Aktivierung des intra-S- und G₂/M-Checkpoints infolge einer DNA-Schädigung (*DNA damage Checkpoints*) und bewirkt dabei eine Verzögerung der DNA-Replikation bzw. des Eintritts in die Mitose (Mailand et al., 2000; Zachos et al., 2003). Bei diesen Prozessen wird die Aktivität von Chk1 hauptsächlich durch die ATR-Kinase (*ataxia-telangiectasia mutated- and Rad3-related*) reguliert (Guo et al., 2000). Auch unabhängig von einer exogenen DNA-Schädigung spielt der ATR-Chk1-Signalweg eine wichtige Rolle in der Regulation der Initiierung und Progression der DNA-Replikation (Guo et al., 2000; Feijoo et al., 2001; Shechter et al., 2004).

Die Funktion von Chk1 in der Regulation der Zellproliferation unter normalen physiologischen Bedingungen ist inzwischen fest etabliert, jedoch noch nicht vollständig verstanden. Chk1 ist essentiell für die embryonale Entwicklung der Säuger, eine homozygote

Deletion von Chk1 resultiert in embryonaler Letalität von Mäusen (Liu et al., 2000; Takai et al., 2000). Abgesehen von der Funktion in den Kontrollmechanismen der DNA-Replikation und der Mitoseinitiierung über die Regulation der Phosphatasenfamilie Cdc25 (Petermann et al., 2006; Trinkle-Mulcahy und Lamond, 2006) sowie über transkriptionelle Regulation (Shimada et al., 2008) ist Chk1, als eine Komponente des *Spindel-Checkpoints*, auch für die fehlerfreie Chromosomensegregation während der Mitose verantwortlich (Zachos et al., 2007).

Das *MCPH1*-Gen wurde innerhalb eines der zunächst sechs identifizierten Loci entdeckt, die in eine autosomal-rezessive Funktionsstörung der neuronalen Entwicklung involviert sind (Jackson et al., 2002). Eine Mutation im *MCPH1*-Gen, die mit einem Funktionsverlust des Proteins einhergeht, führt zu einer erheblichen Reduktion des Gehirnvolumens in Abwesenheit von anderen schwerwiegenden Fehlbildungen oder signifikanten neurologischen Auffälligkeiten (Primäre Mikrozephalie). Das Protein enthält drei BRCT-Domänen (*BRCA carboxy-terminal*), die häufig in Proteinen der Zellzykluskontrolle und DNA-Reparatur vorkommen. Dies führte zu der Annahme, dass der klinische Phänotyp der Primären Mikrozephalie auf eine Störung der Zellzyklusregulation in den neuronalen Vorläuferzellen oder auf Apoptose als Folge der deregulierten zellulären Antwort auf eine DNA-Schädigung zurückzuführen sein könnte (Jackson et al., 2002). Zahlreiche Studien wurden unter Bedingungen der akuten DNA-Schädigung oder des Replikationsarrests durchgeführt, um die funktionelle Einbindung von MCPH1 in die Mechanismen der *DNA damage Checkpoints* zu untersuchen (Chaplet et al., 2006; O'Driscoll et al., 2006), wobei MCPH1 u.a. als Komponente des ATR-Chk1-Signalwegs charakterisiert wurde (Lin et al., 2005; Alderton et al., 2006). Darüber hinaus zeigen humane MCPH1-defiziente Zellen und *Drosophila* MCPH1-Deletionsmutanten eine vorzeitige Aktivierung von Cdk1 – ein Phänomen, das auch in konditional Chk1-defizienten embryonalen Mausstammzellen beobachtet wurde (Niida et al., 2005; Alderton et al., 2006; Brunk et al., 2007).

Die genannten Arbeiten veranschaulichen einige Gemeinsamkeiten in Bezug auf die Funktionen von Chk1 und MCPH1. Beide Proteine sind in die molekularen Mechanismen der zellulären Antwort auf DNA-Schädigung involviert, wobei sie an derselben Signalkaskade (ATR-Signalweg) beteiligt sind. Außerdem spielen Chk1 und MCPH1 eine wichtige Rolle in der Regulation der Zellzyklusprogression unter physiologischen

Bedingungen, im Speziellen in den Prozessen der Mitoseinitiierung. Wenngleich die infolge einer DNA-Schädigung induzierten Signalwege nicht notwendigerweise mit denen unter physiologischen Bedingungen übereinstimmen müssen, so scheinen Chk1 und MCPH1 doch in beiden Fällen als Komponenten eines gemeinsamen Signalweges zu agieren.

4.1.2. Chk1-MCPH1-Interaktion

Zelluläre Kompartimentierung ist ein wichtiger Mechanismus zur Regulation von Proteinfunktionen. Viele Arbeiten haben gezeigt, dass die unterschiedlichen Funktionen von Chk1 durch spezifische Lokalisation dieses Proteins in bestimmten zellulären Kompartimenten determiniert werden. So ist z.B. Chromatin-assoziiertes Chk1 an der Transkriptionsregulation über die aktivierende Phosphorylierung von Histon H3 an Threonin 11 beteiligt (Smits et al., 2006; Shimada et al., 2008). Nukleäres, nicht an Chromatin gebundenes Chk1 reguliert im Verlauf der Interphase die Cdc25A-Phosphatase (Chen et al., 2003a), während zentrosomen-assoziiertes Chk1 Cdc25B reguliert (Schmitt et al., 2006).

Die vorliegende Arbeit erbringt zum ersten Mal den Nachweis, dass MCPH1 an der Regulation der zentrosomalen Lokalisation von Chk1 beteiligt ist. Es konnte gezeigt werden, dass sowohl in humanen MCPH1-defizienten Lymphoblasten als auch nach einer RNAi-vermittelten MCPH1-Depletion in U2OS-Zellen signifikant weniger Chk1 an Interphase-Zentrosomen lokalisiert ist. Die Reduktion von zentrosomalem Chk1 wurde mittels konfokaler Laserscanmikroskopie quantifiziert und mittels Western Blot Analyse zentrosomaler Extrakte verifiziert. Wichtig hierbei war, dass in MCPH1-defizienten Lymphoblasten nur die zentrosomale Lokalisation von Chk1 beeinträchtigt war, während die zelluläre Gesamtmenge an Chk1 im Vergleich zu Kontroll-Lymphoblasten unverändert blieb. U2OS-Zellen, die mit MCPH1-spezifischer siRNA transfiziert wurden, zeigten dagegen zusätzlich zur Reduktion des zentrosomalen Chk1 auch eine geringere Gesamtmenge an Chk1 im Vergleich zur Kontrolle. Dieses Phänomen ist bereits bekannt und wird mit einer Funktion von MCPH1 in der Regulation der Chk1-Transkription in Verbindung gebracht (Xu et al., 2004; Lin et al., 2005). Interessanterweise konnte dieser MCPH1 siRNA-vermittelte Effekt nicht in humanen Lymphoblasten reproduziert werden (Alderton et al., 2006). Eine mögliche Erklärung für die Diskrepanz zwischen den Ergebnissen aus den Untersuchungen von Patienten-Zelllinien und RNAi-depletierten

U2OS-Zellen wären Zelltyp-spezifische Faktoren, die jedoch bislang nicht näher untersucht wurden. Ungeachtet dessen konnte die zentrosomale Chk1-Delokalisation in beiden Modellen gezeigt werden, was zu der Annahme führte, dass die Rekrutierung von Chk1 an das Zentrosom eine generelle Funktion von MCPH1 darstellt.

Um zu klären, wie die zentrosomale Lokalisation von Chk1 durch MCPH1 reguliert wird, musste zunächst die subzelluläre Distribution von MCPH1 bestimmt werden. Es gibt nur wenige Arbeiten, die sich mit der zellulären Lokalisation von MCPH1 in Abhängigkeit von der Zellzyklusprogression auseinandergesetzt haben. Im Zusammenhang mit seiner Funktion in den Prozessen der DNA-Reparatur wurde MCPH1 als Chromatin-assoziiertes Kernprotein beschrieben (Lin et al., 2005). Eine spätere Arbeit derselben Gruppe zeigte eine überwiegend zentrosomale Lokalisation von MCPH1, die zellzyklusunabhängig war (Rai et al., 2008). Da in beiden Arbeiten die gleiche Zelllinie und der gleiche Antikörper für die Immunfluoreszenz verwendet wurden, stellen diese scheinbar widersprüchlichen Ergebnisse die Spezifität des verwendeten Antikörpers in Frage. Andererseits kann MCPH1 wie auch Chk1 sowohl nukleär als auch zentrosomen-assoziiert vorliegen, wobei die unterschiedliche subzelluläre Lokalisation dieses Proteins möglicherweise mit unterschiedlichen Funktionen im Zusammenhang steht.

Die zentrosomale Lokalisation von MCPH1 in humanen Zellen wird schon lange diskutiert, da auch andere identifizierte Mikrocephalie-Proteine (ASPM, CENPJ, CDK5RAP2 und STIL) zentrosomal bzw. zentrosomen-assoziiert sind (Cox et al., 2006). Außerdem wurde für avianes MCPH1 die zentrosomale Lokalisation bereits beschrieben und die dafür zuständigen Domänen identifiziert (Jeffers et al., 2008).

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde ein monoklonaler Antikörper gegen humanes MCPH1 hergestellt, der im Gegensatz zu kommerziellen MCPH1-Antikörpern sowohl in der Immunfluoreszenz als auch im Western Blot eingesetzt werden konnte. Die Spezifität des Antikörpers wurde mit Hilfe der MCPH1-defizienten Lymphoblasten und siRNA-transfizierten U2OS-Zellen bestätigt, was weitere Untersuchungen zur subzellulären Lokalisation von MCPH1 ermöglichte. Dabei zeigten die fluoreszenzmikroskopischen Analysen von Lymphoblasten und U2OS-Zellen eine zentrosomale Lokalisation von MCPH1 während der Interphase. MCPH1 konnte außerdem in zentrosomalen Extrakten von

Kontroll-Lymphoblasten im Western Blot detektiert werden. Der Antikörper erkannte auch die nukleäre Fraktion von MCPH1. Vor allem nach ionisierender oder UV-Bestrahlung konnte eine Akkumulation von MCPH1 im Zellkern beobachtet werden. Dieses Ergebnis demonstriert zusätzlich die Spezifität des Antikörpers, da bereits mehrfach beschrieben wurde, dass MCPH1 verstärkt an geschädigte DNA-Abschnitte rekrutiert wird (Rai et al., 2006; Wood et al., 2007).

Zusammenfassend zeigten die Daten, dass MCPH1 wie auch Chk1 in der Interphase zentrosomal lokalisiert ist und der Verlust von MCPH1 zur zentrosomalen Delokalisation von Chk1 führt. Eine *in vitro* Interaktion zwischen MCPH1 und Chk1 wurde bereits beschrieben (Alderton et al., 2006). Auf Grundlage dieser Information und eigener Beobachtungen konnte angenommen werden, dass Chk1 über eine Protein-Protein-Interaktion mit MCPH1 an das Zentrosom rekrutiert wird. Tatsächlich konnten wir eine *in vivo* Interaktion zwischen MCPH1 und Chk1 mittels Co-Immunpräzipitationsversuchen und im *Yeast-Two-Hybrid*-System nachweisen, über die die zentrosomale Chk1-Rekrutierung offensichtlich reguliert wird.

4.1.3. Pericentrin

Pericentrin (PCNT) ist eine der wichtigsten Komponenten der perizentriolären Matrix und spielt eine zentrale Rolle für die Nukleation und Organisation der mitotischen Spindel (Doxsey et al., 1994). PCNT bleibt im Laufe des Zellzyklus am Zentrosom lokalisiert (Flory et al., 2000) und rekrutiert viele Proteine an das Zentrosom, die an der Zellzyklusregulation beteiligt sind (Diviani et al., 2000; Chen et al., 2004). Eine Depletion von PCNT in Hefezellen und einigen humanen Zelllinien resultiert im Verlust der zentrosomalen Integrität und nachfolgend in Apoptose (Flory et al., 2002; Zimmerman et al., 2004), was eine essentielle Funktion dieses Proteins auf zellulärer Ebene zu implizieren schien. Umso überraschender war die Identifizierung von homozygoten *PCNT*-Mutationen in Patienten mit Seckel-Syndrom sowie MOPD II-Patienten, die in einem Funktionsverlust des Proteins resultierten (Griffith et al., 2008; Rauch et al., 2008). Diese autosomal-rezessiven Erkrankungen weisen zwei ähnliche klinische Merkmale auf – Mikrozephalie und Kleinwuchs. Beachtenswert ist, dass auch Patienten mit Primärer Mikrozephalie, die auf *MCPH1*-Mutationen zurückzuführen ist, eine postnatale Wachstumsretardierung zeigen (Neitzel et al., 2002).

Eine Arbeit von Rauch und Kollegen zeigte, dass der PCNT-Verlust bei MOPD II-Patienten mit einer Vielzahl von mitotischen Defekten assoziiert ist, die möglicherweise apoptotische Signalkaskaden aktivieren (Rauch et al., 2008). Griffith und Kollegen vermuten hingegen, dass der klinische Phänotyp des PCNT-Seckel-Syndroms infolge eines Defektes im ATR-Chk1-vermittelten *DNA damage Checkpoint* entstehen könnte, der zu einer fehlerhaften Mitoseprogression nach DNA-Schädigung führt (Griffith et al., 2008). Beide Arbeiten deuten darauf hin, dass der Verlust zentrosomalen PCNT eine Deregulation der mitotischen Abläufe und demnach möglicherweise auch eine gestörte Zellzykluskontrolle zur Folge hat, was auch in Bezug auf MCPH1-Defizienz diskutiert wurde (Jackson et al., 2002; Trimborn et al., 2004). Folglich könnte man annehmen, dass der Entstehung der Mikrozephalie und der Wachstumsdefizite bei Primärer Mikrozephalie sowie MOPD II und Seckel-Syndrom, die mit *MCPH1*- bzw. *PCNT*-Mutationen einhergehen, zumindest partiell ähnliche Pathomechanismen zugrunde liegen.

Die vorliegende Arbeit zeigt, dass PCNT ähnlich dem MCPH1 für die zentrosomale Lokalisation von Chk1 verantwortlich ist. Mittels fluoreszenzmikroskopischer und biochemischer Methoden konnte eine signifikante Reduktion des zentrosomalen Chk1-Signals in einer PCNT-defizienten Zelllinie von einem Patienten mit MOPD II-Syndrom nachgewiesen werden. Dieses Ergebnis konnte zusätzlich durch eine RNAi-vermittelte PCNT-Depletion in U2OS-Zellen bestätigt werden. Eine Reduktion der zellulären Gesamtmenge an Chk1 in PCNT-defizienten Lymphoblasten fand sich dagegen nicht, sodass eine verminderte Proteinexpression bzw. verstärkte Proteindegradation von Chk1 in diesen Zellen ausgeschlossen werden konnte. Darüber hinaus wurde eine *in vivo* Interaktion zwischen PCNT und Chk1 mittels Co-Immunpräzipitationsversuchen nachgewiesen, die eine bereits existierende Annahme bestätigte, dass Pericentrin die zentrosomale Lokalisation von Chk1 indirekt oder direkt regulieren könnte (Griffith et al., 2008). Interessanterweise fand diese Interaktion auch in Abwesenheit von MCPH1 statt. Somit stellte sich Frage, ob MCPH1 und PCNT unabhängig voneinander Chk1 an das Zentrosom rekrutieren oder ob ein funktioneller Zusammenhang zwischen den beiden Proteinen existiert. Tatsächlich konnte eine *in vivo* Interaktion zwischen PCNT und MCPH1 mittels Co-Immunpräzipitationsversuchen nachgewiesen werden. Zusätzlich zeigte sich eine Reduktion

von zentrosomalem PCNT in MCPH1-defizienten Zellen, während in PCNT-defizienten Zellen MCPH1 weder reduziert war, noch disloziert vom Zentrosom vorlag.

Die Menge an zentrosomalem PCNT nimmt von der G₁-Phase bis zur Metaphase kontinuierlich zu (Dichtenberg et al., 1998). Es ist somit vorstellbar, dass die geringeren Mengen an zentrosomalem PCNT in MCPH1-defizienten Zellen auf einer Änderung in der Zellzyklusprogression und somit auf einer Anreicherung von Zellen mit früheren Stadien der Zentrosomenreifung beruhen. Eine genauere Quantifizierung der zentrosomalen PCNT-Level in MCPH1-defizienten Interphasezellen zeigte jedoch bereits in der G₀/G₁-Phase eine deutliche Reduktion von PCNT, die auch in der S/G₂-Phase fortbestand. Schlussfolgernd reguliert MCPH1 die zentrosomale Rekrutierung von PCNT wohl unabhängig von der Zellzyklusprogression.

Sowohl in MCPH1- als auch in PCNT-defizienten Zellen wurde eine signifikante Reduktion des zentrosomalen γ -Tubulins beobachtet. In Interphase-Zellen wird der γ -Tubulin-Ringkomplex u.a. über PCNT an das Zentrosom gebunden (Takahashi et al., 2002). Eine RNAi-vermittelte Depletion von PCNT führt zu einer partiellen Delokalisation des γ -Tubulins, wobei eine Teilmenge, möglicherweise über andere Proteine, wie z.B. AKAP450, zentrosomal verankert bleibt (Takahashi et al., 2002). Auf Grundlage dieser Informationen wäre die Reduktion des zentrosomalen PCNT in MCPH1-defizienten Zellen bzw. seine Abwesenheit in PCNT-defizienten Zellen eine mögliche Erklärung für verminderte zentrosomale γ -Tubulin-Level in diesen Zellen.

Der Verlust von MCPH1 oder PCNT zeigte keine Auswirkung auf andere zentrosomale Proteine wie zentrioläres Centrin und Cep170 (Salisbury et al., 2002; Guarguaglini et al., 2005) und die Kinase Nek2 (Fry, 2002), was darauf hindeutet, dass Zentrosomen in MCPH1- und PCNT-defizienten Zellen intakte Zentriolen enthalten und andere regulatorische Proteine normal rekrutiert werden.

Zusammenfassend erbringen die Daten den Nachweis, dass PCNT notwendig für die zentrosomale Lokalisation von Chk1 ist, wobei die Rekrutierung von PCNT an das Zentrosom selbst direkt oder indirekt durch MCPH1 reguliert zu sein scheint.

4.1.4. Strukturelle Aspekte der MCPH1-Chk1-PCNT-Interaktion

Die vorliegende Arbeit zeigt, dass Chk1, PCNT und MCPH1 *in vivo* interagieren, wobei noch nicht geklärt ist, ob es sich hierbei um direkte Interaktionen handelt. Weiterhin liefern die Ergebnisse der Größenausschlusschromatographie Hinweise dafür, dass alle drei Proteine in Proteinkomplexen unterschiedlicher Größe vorliegen.

Der detektierte größere Proteinkomplex migriert bei über 2 MDa und enthält beide Isoformen von PCNT (PCNT_B ca. 360 kDa; PCNT_A ca. 250 kDa). Wenn man davon ausgeht, dass beide PCNT-Isoformen, MCPH1 (ca. 85 kDa) und Chk1 (ca. 54 kDa) jeweils nur einmal im Komplex vorkommen und direkt miteinander interagieren, wäre der Proteinkomplex insgesamt ca. 750 kDa groß. Der Unterschied zwischen der theoretischen und der beobachteten Größe des Proteinkomplexes lässt darauf schließen, dass zusätzlich noch andere Proteine an diesem Komplex beteiligt sind oder PCNT, Chk1 und MCPH1 in unterschiedlichem stöchiometrischem Verhältnis in diesem Komplex vorliegen.

Der kleinere Proteinkomplex (ca. 500 kDa) enthält weder die B-Isoform noch die A-Isoform von PCNT. Die in diesem Komplex mit dem PCNT-spezifischen Antikörper detektierte Proteinbande entsprach einer Größe von ca. 200 kDa und könnte sowohl einem unspezifischen Abbauprodukt als auch einem Produkt aus der proteolytischen Spaltung des PCNT B entsprechen (Golubkov et al., 2005). In diesem Fall würde die Größe des detektierten Proteinkomplexes tatsächlich derjenigen entsprechen, die für den Proteinkomplex errechnet wurde (ca. 490 kDa), der nur aus MCPH1, Chk1 und PCNT B besteht. Es muss jedoch noch geklärt werden, inwiefern diese Proteinbande ein Abbauprodukt von PCNT B oder vielleicht doch eine bislang noch nicht charakterisierte Isoform von PCNT repräsentiert. Letzteres würde bedeuten, dass auch im kleineren Proteinkomplex außer PCNT, MCPH1 und Chk1 noch weitere Proteine beteiligt sein könnten. Dafür spricht auch die Größe eines weiteren potentiellen Proteinkomplexes (ca. 1,7 MDa), in dem Chk1 und MCPH1 zusammen mit PCNT (200 kDa) nachgewiesen wurden.

Die Identifizierung von Proteinen, die zur Entstehung der beschriebenen Proteinkomplexe beitragen, würde einen bedeutenden Beitrag zur Aufklärung der PCNT-Chk1-MCPH1-Interaktion leisten. Im Hinblick darauf wären weitere methodische Ansätze notwendig, wie z.B. die Aufreinigung der Proteinkomplexe und massenspektrometrische Analysen. Eine

genaue Validierung sowie Charakterisierung der im *Yeast-Two-Hybrid-Screen* identifizierten potentiellen Interaktionspartner von MCPH1 würde möglicherweise zusätzliche Informationen zur Struktur und Regulation des PCNT-Chk1-MCPH1-Komplexes geben. In initialen Versuchen konnte bereits gezeigt werden, dass ein potentieller MCPH1-Interaktionspartner, CCDC13, zentrosomal lokalisiert ist und eine RNAi-vermittelte Depletion von CCD13 eine deutliche Reduktion des zentrosomalen γ -Tubulins und Chk1, jedoch nicht von PCNT zur Folge hat. Diese vorläufigen Beobachtungen erfordern jedoch noch weitere detaillierte Untersuchungen.

Auf Grundlage der präsentierten Daten zur MCPH1-Chk1-PCNT-Interaktion, können mehrere Modelle diskutiert werden, wie die MCPH1- und PCNT-abhängige Rekrutierung von Chk1 an das Zentrosom reguliert wird:

MCPH1 und PCNT sind notwendig für die zentrosomale Lokalisation von Chk1, beide Proteine sind auch am Zentrosom lokalisiert und interagieren miteinander und mit Chk1 (Abb. 4-2). MCPH1 interagiert direkt mit Chk1, es ist jedoch noch unklar, inwiefern diese Interaktion am Zentrosom stattfindet. Vorstellbar ist, dass Chk1 im Komplex mit MCPH1 an das Zentrosom rekrutiert wird und dort mit PCNT interagiert. Die zentrosomale Lokalisation von MCPH1 ist weder PCNT- noch Chk1-abhängig.

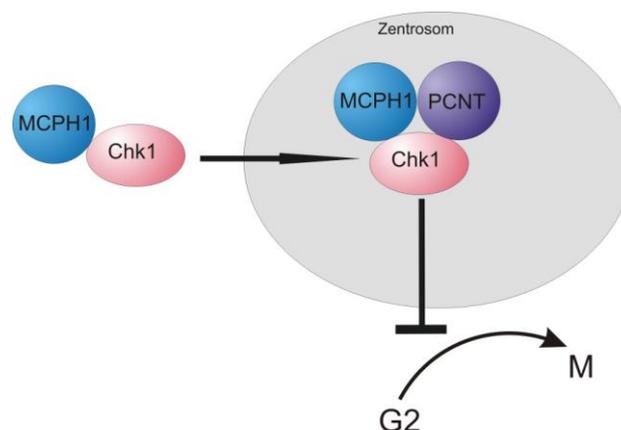


Abbildung 4-2: Modell zur zentrosomalen Rekrutierung von Chk1. Die zentrosomale Lokalisation von Chk1 ist abhängig von MCPH1 und PCNT. MCPH1 rekrutiert Chk1 über eine direkte Interaktion zellzyklusabhängig an das Zentrosom, wo beide Proteine direkt oder indirekt mit zentrosomalem PCNT interagieren.

Es ist anzunehmen, dass PCNT diejenige zentrosomale Strukturkomponente ist, über die Chk1 am Zentrosom verankert wird. Es ist noch nicht geklärt, welche Bedeutung die

zentrosomale Lokalisation von MCPH1 für die PCNT-Chk1-Interaktion hat, da diese beiden Proteine auch in Abwesenheit von MCPH1 zumindest indirekt miteinander interagieren. MCPH1 beeinflusst die zentrosomale Lokalisation von PCNT und reguliert möglicherweise dadurch die zentrosomale Rekrutierung von Chk1. Dabei könnte MCPH1 die zelluläre Gesamtmenge und somit auch die zentrosomale Fraktion von PCNT auf transkriptioneller Ebene regulieren (Abb. 4-3 a). Tatsächlich ist eine Funktion von MCPH1 in der Transkriptionsregulation bekannt: Yang und Kollegen haben gezeigt, dass MCPH1 im Komplex mit dem E2F1-Transkriptionsfaktor die Transkription vieler Gene, u.a. Chk1, BRCA1, APAF1 und p73 reguliert (Yang et al., 2008a). Somit wäre es möglich, dass MCPH1 auch die Transkription des PCNT-Gens beeinflusst, entweder über eine Interaktion mit bestimmten Transkriptionsfaktoren oder durch andere Mechanismen, wie z.B. eine Chromatinmodifikation (Kouzarides, 2007). Demzufolge würde eine verminderte PCNT-Expression zur Reduktion des zentrosomalen PCNT und somit auch von zentrosomalem Chk1 führen.

Eine andere Möglichkeit zur Regulation des zentrosomalen PCNT-Levels wäre die Beteiligung von MCPH1 an den Prozessen der zentrosomalen Rekrutierung von PCNT (Abb. 4-3 b und c). Der Transport von PCNT aus dem Zytoplasma zum Zentrosom erfolgt auf mindestens zwei Wegen: Dynein/Dynactin-abhängig im Komplex mit PCM1 (Young et al., 2000; Kubo und Tsukita, 2003) oder Dynein/Dynactin-unabhängig über eine Interaktion mit anderen Transportproteinen, wie z.B. Nudel (Guo et al., 2006). MCPH1 könnte in diese Prozesse direkt oder indirekt involviert sein und auf diese Weise die zentrosomale Lokalisation von PCNT und darüber auch die von Chk1 regulieren.

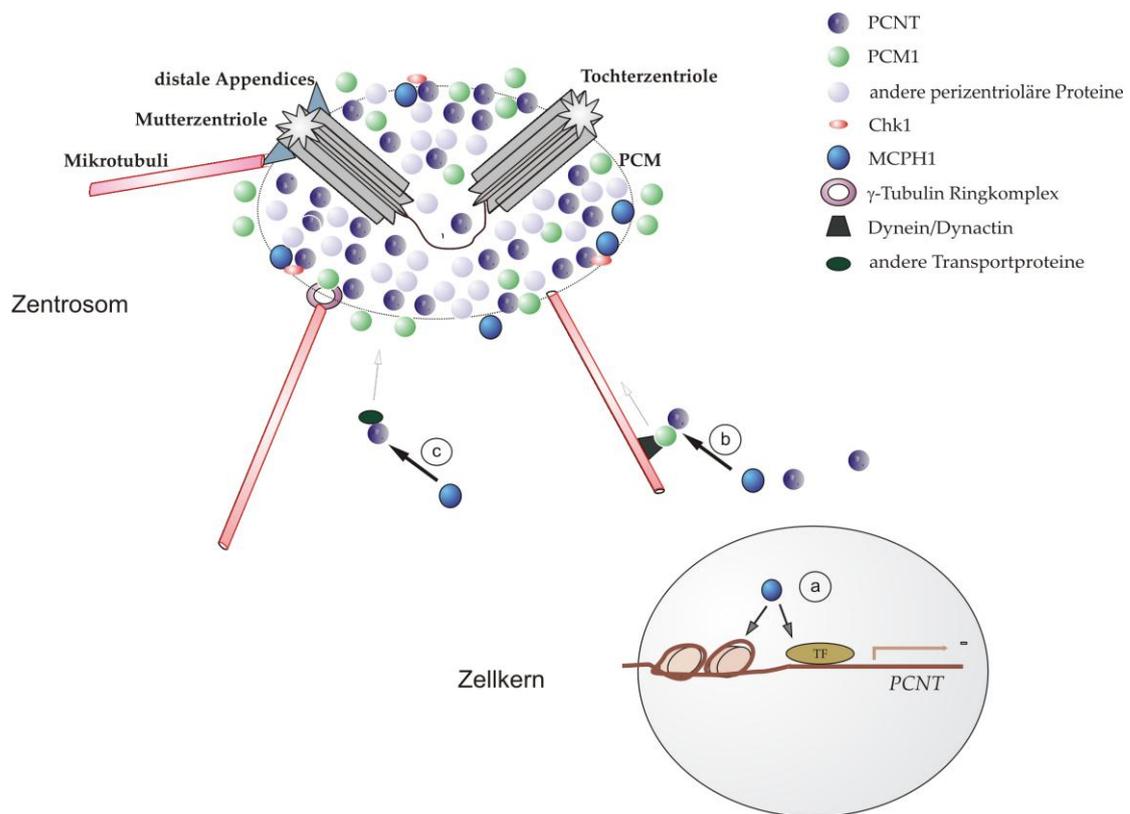


Abbildung 4-3: Potentielle Funktionen von MCPH1 in der Regulation zentrosomaler PCNT-Level. (a) Regulation der PCNT-Expression auf transkriptioneller Ebene. (b) Regulation des Dynein/Dynactin-abhängigen Transports von PCNT an das Zentrosom. (c) Regulation der Dynein/Dynactin-unabhängigen zentrosomalen Rekrutierung von PCNT. *TF*: Transkriptionsfaktor, *PCM*: Perizentrioläre Matrix, *PCM1*: pericentriolar matrix-1.

4.2. Funktionelle Aspekte der MCPH1-Chk1-PCNT-Interaktion

Bereits bei einer der Erstbeschreibungen von MCPH1-defizienten Lymphoblasten wurde die Beobachtung gemacht, dass die Zellen viel früher in die Prophase eintreten als Kontrollzellen (Neitzel et al., 2002). Eine spätere Arbeit zeigte, dass die aktivierende Dephosphorylierung von Cdk1 in diesen Zellen bereits in der Phase stattfindet, die bei den Kontrollzellen der S-Phase entspricht (Alderton et al., 2006). Diese Daten deuten auf eine Deregulation Mitose-initiiierender Prozessen hin.

Die vorliegende Arbeit führt den Nachweis, dass die vorzeitige Aktivierung des Cyclin B/Cdk1-Komplexes in MCPH1- und PCNT-defizienten Zellen infolge der zentrosomalen Delokalisation von Chk1 induziert wird. Wie bereits beschrieben, verhindert zentrosomen-assoziiertes Chk1 die vorzeitige Mitoseinitiation durch inhibitorische Phosphorylierung der Cdc25B Phosphatase, eines Aktivators von Cdk1. In MCPH1- und PCNT-defizienten Zellen lagen Cdc25B und Cdk1 bereits in der G₂-Phase im aktiven

(dephosphorylierten) Zustand vor und es konnten nur geringe Mengen an zentrosomen-assoziiertem pCdc25B. bzw. pCdk1 in diesen Zellen detektiert werden. Diese Ergebnisse zeigen, dass die vorzeitige Aktivierung von Cdk1 und die darauf folgende Initiierung der Mitose auf die fehlende inhibitorische Cdc25B-Phosphorylierung infolge des Verlustes von zentrosomalem Chk1 zurückzuführen ist.

Welche Auswirkungen hat die vorzeitige Initiierung der Mitose? Der Verlust von MCPH1 und PCNT führt zu einem erhöhten mitotischen Index, was sowohl in den defizienten Lymphoblasten als auch in siRNA-Experimenten beobachtet wurde. In einem „Rescue“-Versuch, bei dem MCPH1-defiziente Lymphoblasten mit Wildtyp-MCPH1 transfiziert wurden, konnte der mitotische Index auf die Werte der Kontroll-Lymphoblasten reduziert werden. Mikroskopische Zeitraffer-Aufnahmen von U2OS-Zellen, die mit MCPH1- oder PCNT-spezifischer siRNA transfiziert waren, zeigten ein ähnliches Muster der Mitoseprogression. Die MCPH1-depletierten U2OS-Zellen brauchten bis zu doppelt so lange für die Mitose wie die Kontrollzellen, teilten sich aber erfolgreich. Der Verlust von PCNT hingegen führte nicht nur zu einer Verlängerung der Mitose, sondern war auch mit erhöhtem Zelltod während der Mitose verbunden. Zimmerman und Kollegen konnten in ihren Versuchen mit PCNT-siRNA einen Anstieg von apoptotischen Zellen in der Antephase beobachten, also der Phase zwischen G₂ und früher Prophase (Zimmerman et al., 2004). Diese Phase ist gekennzeichnet durch positive Histon H3-Phosphorylierung, die noch vor einer sichtbaren Chromosomenkondensation detektierbar ist. Die Arbeit von Zimmerman und Kollegen deutete darauf hin, dass der Verlust von PCNT zu schwerwiegenden Defekten in der Ausbildung von mitotischen Spindeln führt und dadurch Apoptose bereits vor Eintritt in die Mitose einleitet. In der vorliegenden Arbeit wurde der mitotische Index aus einer durchflusszytometrischen Messung der phospho-Histon H3 positiven Zellen ermittelt bei der dementsprechend auch die Antephase-Zellen erfasst wurden. Die mikroskopischen Zeitraffer-Aufnahmen zeigten jedoch, dass auch ca. 50% der Mitosen nach der Depletion von PCNT apoptotisch wurden, wobei man auch hier nicht genau sagen, in welcher mitotischen Phase die Zellen sich befanden. Ca. 30% der Mitosen waren stark verlängert, endeten aber in einer normalen Zytokinese. Diese Ergebnisse zeigen, dass PCNT-depletierte Zellen durchaus in die Mitose eintreten können, jedoch zu einem verfrühten Zeitpunkt, was zu einer abnormalen Mitoseprogression und somit auch zu einem erhöhtem mitotischen Index führt.

Mit Hilfe von weiteren experimentellen Ansätzen sollte die Frage geklärt werden, inwiefern der verlängerten Mitosedauer in PCNT- und MCPH1-defizienten Zellen gleiche Mechanismen zugrunde liegen, wie z.B. die Aktivierung des *Spindle Assembly Checkpoints*, bei dem Chk1 auch eine wichtige Rolle spielt (Zachos et al., 2007).

4.3. Der PCC-Phänotyp der MCPH1-defizienten Zellen

MCPH1-Defizienz ist mit einem charakteristischen Phänotyp der vorzeitigen Chromosomenkondensation (PCC, *premature chromosome condensation*) assoziiert (Neitzel et al., 2002). Diesen Phänotyp findet man sowohl bei Patientenzellen als auch nach einer exogenen Depletion von MCPH1 mittels RNAi. Der PCC-Phänotyp findet sich in 10 - 20% der Zellen einer unsynchronisierter Zellkultur und geht mit einer schlechten chromosomalen Bandenauflösung in zytogenetischen Routinepräparaten einher (Trimborn et al., 2004). Thymidin-Pulsmarkierungsexperimente zeigten, dass die Chromosomen der MCPH1-defizienten Zellen bereits am Übergang zwischen der S- und G₂-Phase anfangen zu kondensieren (Neitzel et al., 2002). Es wird angenommen, dass MCPH1 über eine Komplexbildung mit Condensin II die Prozesse der Chromosomenkondensierung reguliert (Trimborn et al., 2006; Wood et al., 2008), eine genaue Charakterisierung dieser Prozesse steht jedoch aus.

Die vorliegende Arbeit bestätigt, dass der PCC-Phänotyp charakteristisch für Zellen ist, die sich noch in der G₂-Phase befinden. Obwohl diese Zellen kondensierte Chromosomen aufweisen, gibt es keine weiteren Hinweise für die mitotische Progression: Die Zellen sind phospho-Histon H3-negativ und haben eine intakte Zellkernmembran. Außerdem entspricht die zytoplasmatische Lokalisation des Cyclin B in diesen Zellen eher einer G₂-Phase, da nach der Initiierung der Mitose der aktivierte Cyclin B/Cdk1-Komplex im Zellkern akkumuliert.

Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass eine Immobilisierung von Chk1 am Zentrosom durch die Fusion mit der zentrosomalen Lokalisationsdomäne von AKAP450 (PACT) in MCPH1-depletierten Zellen zu einer Anreicherung der Zellen mit PCC-Phänotyp führt. In Zellen mit zentrosomal immobilisiertem Kinase-inaktivem Chk1 trat der PCC-Phänotyp nach einer Depletion von MCPH1 dagegen nur genauso oft auf wie in normalen U2OS-Zellen. Diese Daten deuten darauf hin, dass der PCC-Phänotyp kein von Chk1 abhängiges

Phänomen ist: In Anwesenheit von MCPH1 zeigt sich bei zentrosomaler Immobilisierung weder einer Wildtyp- noch einer Kinase-inaktiven Variante von Chk1 ein Auftreten von PCC-Zellen. Nach Depletion von MCPH1 führt die konstitutive zentrosomale Kinase-Aktivität von Chk1 zwar zu einer Erhöhung des Anteils von Zellen mit PCC-Phänotyp, dies erklärt sich jedoch anhand der beschriebenen inhibitorischen Funktion von zentrosomalem Chk1 auf die Zellzyklusprogression und die Notwendigkeit seiner Delokalisation vom Zentrosom für den Übergang von der G₂-Phase in die Mitose.

4.4. Ausblick

In dieser Arbeit wurden erste Hinweise auf die Funktion von MCPH1 und PCNT für die Regulation Mitose-initiiierender Prozesse gefunden. Beide Proteine kontrollieren diese Prozesse über die Regulation der Lokalisation von zentrosomen-assoziiertem Chk1, das eine vorzeitige Initiierung der Mitose verhindert.

Ein weiterer wichtiger Schritt zum Verständnis der zugrundeliegenden Mechanismen wäre die Aufklärung der MCPH1- und PCNT-abhängigen Rekrutierung von Chk1 an das Zentrosom. Als eine Strukturkomponente des Zentrosoms hat PCNT eine etablierte Funktion in der Rekrutierung regulatorischer Proteine (Chen et al., 2004). Somit ist vorstellbar, dass Chk1 über eine direkte oder indirekte Interaktion mit PCNT an das Zentrosom lokalisiert. Die Bedeutung der zentrosomalen Lokalisation von MCPH1 für die Chk1-PCNT-Interaktion sollte geklärt werden, indem man die subzelluläre Distribution von MCPH1 in Abhängigkeit von der Zellzyklusprogression detaillierter studiert. Außerdem könnte z.B. mittels des FRET-Verfahrens (*Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer*) die Assoziationsdynamik von MCPH1 mit seinen Interaktionspartnern in lebenden Zellen untersucht werden. Die Charakterisierung der identifizierten potentiellen Interaktionspartner von MCPH1 sowie weiterer struktureller Komponenten des MCPH1-PCNT-Chk1-Komplexes würde einen bedeutenden Beitrag zur Aufklärung der MCPH1-Chk1-PCNT-Interaktion leisten.

Die vorzeitige Initiierung der Mitose in MCPH1- und PCNT-defizienten Zellen ist einer von vielen potentiellen pathologisch veränderten Signalwegen, die zur Entstehung von Mikrozephalie und zum Kleinwuchs bei Patienten mit Primärer Mikrozephalie bzw. mit MOPD II oder Seckel-Syndrom führen können (Abb. 4-3).

MCPH1- und PCNT-defiziente Zellen weisen Defekte in der zellulären Antwort auf eine DNA-Schädigung auf, speziell im ATR-Signalweg (Alderton et al., 2006; Griffith et al., 2008). Chk1 spielt als Effektor kinase eine essentielle Rolle in diesem Signalweg und ist für die Aktivierung des G₂/M-Checkpoints verantwortlich (Liu et al., 2000). Infolge von genotoxischem Stress wird Chk1 an mehreren Stellen von ATR phosphoryliert, dissoziiert vom Chromatin und akkumuliert auch am Zentrosom (Löffler et al., 2007; Niida et al., 2007), wo es die Cyclin B/Cdk1-Aktivierung inhibiert. Deshalb ist es wichtig zu untersuchen, inwiefern MCPH1 und PCNT diese Prozesse der Zellzyklusregulation nach DNA-Schädigung über die Regulation der zentrosomalen Lokalisation von Chk1 oder anderer regulatorischer Proteine beeinflussen. Es gibt immer mehr Hinweise, dass die Zentrosomen Signalwege des Zellzyklusarrests und der DNA-Reparatur koordinieren und im Fall einer DNA-Schädigung sowohl ihre eigene Inaktivierung bewirken als auch zentrosomenunabhängige Prozesse mitbeeinflussen (Löffler et al., 2006; Wang et al., 2009). Defekte der zellulären Antwort auf eine DNA-Schädigung würden somit nicht nur zu einer aberranten Zellzyklusprogression sondern auch zu einer Dysfunktion der Zentrosomen und daraus resultierenden mitotischen Defekten führen.

Zusätzlich zu *MCPH1* wurden sechs weitere Genloci beschrieben, die bei Patienten mit Primärer Mikrozephalie Mutationen aufweisen. Bislang wurden vier dazugehörige Genprodukte identifiziert: *CDK5RAP2*, *ASPM*, *CENPJ* und *STIL* (Cox et al., 2006; Kumar et al., 2009). Diese Proteine sind zentrosomal lokalisiert und haben eine wichtige Funktion in der Organisation und Koordination der mitotischen Spindel. Im Gegensatz zu *MCPH1* scheint die Funktion dieser Proteine nur für die mitotischen Vorgänge in neuronalen Stammzellen essentiell zu sein. Diese Stammzellen teilen sich asymmetrisch und produzieren dabei eine weitere Stammzelle und ein Neuron, während bei einer symmetrischen Teilung der Stammzelle zwei Stammzellen entstehen. Wie sich die Stammzelle teilt, bestimmt die Orientierung der mitotischen Spindel, wobei bei diesem Prozess die Zentrosomen eine entscheidende Rolle spielen (Fish et al., 2006; Rusan und Peifer, 2007). Zentrosomale Dysfunktion, die infolge eines Funktionsverlustes von *MCPH1* und *PCNT* sowie von *CDK5RAP2*, *ASPM*, *CENPJ* und *STIL* entstehen könnte, würde somit die Ausbildung und Positionierung der mitotischen Spindel beeinträchtigen und auf diesem Weg entweder die Produktion neuronaler Stammzellen oder Neuronen beeinflussen. Da

diese Prozesse auf neuronale und andere sich asymmetrisch teilende Stammzellen beschränkt sind und die entsprechenden Stammzellnischen voraussetzen, sollten sie mit Hilfe geeigneter *in vivo* Modelle studiert werden.

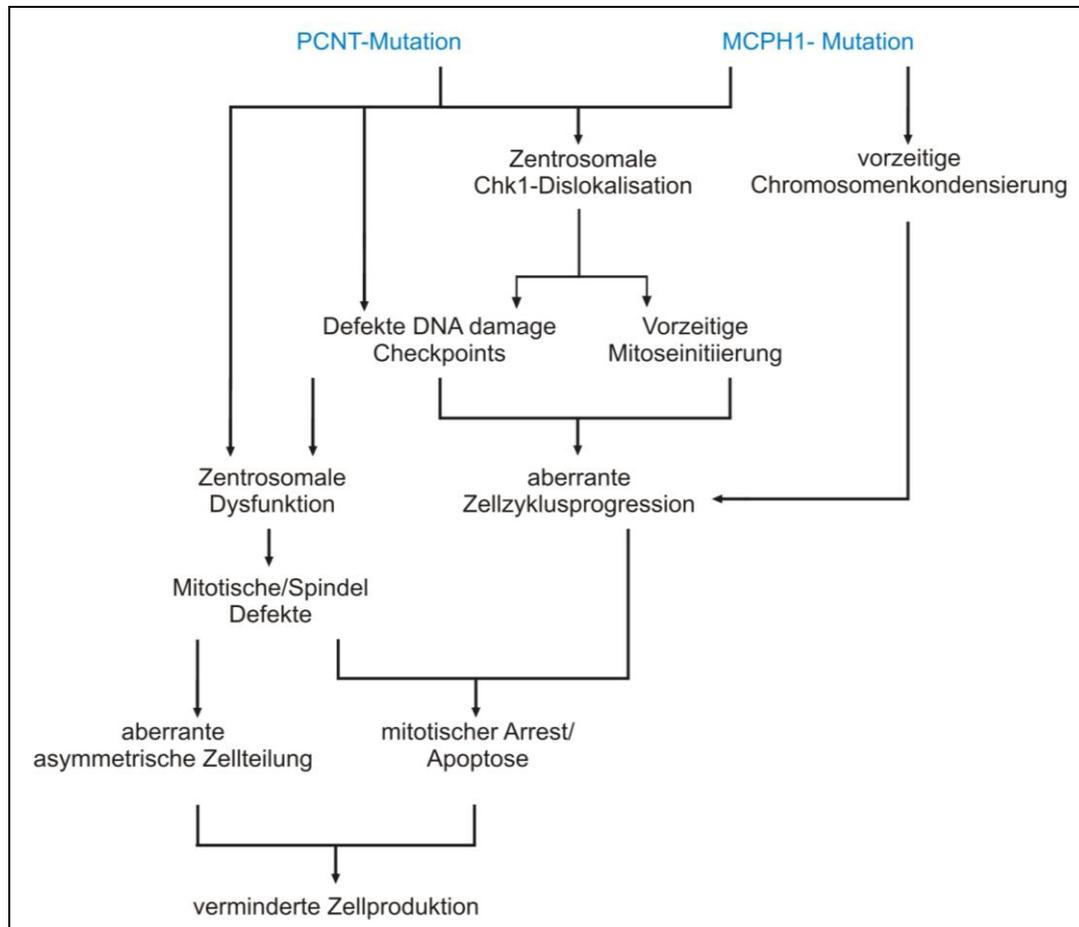


Abbildung 4-4: Potentielle aberrante Signalwege in MCPH1- und PCNT-defizienten Zellen. Aberrante Zellzyklusprogression, zentrosomale Deregulation und Defekte im *DNA-damage* Signalweg könnten verantwortlich für die verminderte Zellproduktion sein, die zur Entstehung von Mikrozephalie und Kleinwüchsigkeit führen.

Neue Erkenntnisse zu den unterschiedlichen Funktionen von MCPH1 und PCNT würden ihre Rolle in solch fundamentalen Prozessen wie Zellzyklusregulation, *DNA-Checkpoint*-Kontrolle, DNA-Reparatur und asymmetrischer Zellteilung weiter etablieren. Vergleichende Untersuchungen anderer Proteine (CDK5RAP2, ASPM, CENPJ und STIL), die in die Entstehungsmechanismen von Mikrozephalie und Kleinwüchsigkeit involviert sind, werden möglicherweise weitere konvergente Signalwege aufzeigen und die Bedeutung der Zentrosomen für die Regulation der Gehirnentwicklung und Körpergröße aufklären.

5. Zusammenfassung

Die Primäre Mikrozephalie, das Seckel-Syndrom und der Mikrozephale Osteodysplastische Primordiale Zwergwuchs Typ Majewski II (MOPD II) sind autosomal-rezessive Erkrankungen, die unter anderem durch eine ausgeprägte Reduktion der Gehirngröße als Folge einer verminderten Produktion von Neuronen während der Embryogenese charakterisiert sind. Trotz ähnlichem klinischem Phänotyp sind die genetischen Ursachen genannter Erkrankungen heterogen: So ist bekannt, dass Mutationen von *ATR* (*Ataxia telangiectasia and Rad3 related*), einer für die Antwort auf DNA-Schädigung wichtigen Proteinkinase, zum Phänotyp des Seckel-Syndroms führen. Bei Patienten mit Seckel-Syndrom ohne *ATR*-Mutation, wie auch bei Patienten mit MOPD II konnten kürzlich Mutationen von *PCNT* nachgewiesen werden. Weiterhin führen Mutationen im *MCPH1*-Gen zum Phänotyp der Primären Mikrozephalie. Wie auch *ATR*, spielen die entsprechenden Genprodukte, Microcephalin (*MCPH1*) und Pericentrin (*PCNT*), eine wichtige Rolle für die Initiierung und Progression der Mitose, sowie in der zellulären Antwort auf eine DNA-Schädigung.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden die Funktionen von *PCNT* und *MCPH1* im Hinblick auf zentrosomale Mechanismen der Mitoseregulation untersucht, insbesondere auf die räumliche und zeitliche Regulation der Checkpoint Kinase 1 (*Chk1*). Die Ergebnisse zeigen, dass sowohl ein mutationsbedingter als auch RNAi-vermittelter Verlust von *MCPH1* oder *PCNT* zu einer zentrosomalen Delokalisation von *Chk1* führt und somit beide Proteine für die zentrosomale Lokalisation von *Chk1* während der Interphase notwendig sind. Darüber hinaus konnten Interaktionen zwischen *MCPH1*, *PCNT* und *Chk1* *in vivo* nachgewiesen und alle drei Proteine in einem Komplex isoliert werden.

Mit Hilfe eines im Rahmen dieser Arbeit hergestellten monoklonalen Antikörpers gegen humanes *MCPH1* wurde weiterhin die subzelluläre Distribution dieses Proteins genauer analysiert. Die Untersuchungen zeigen eine zentrosomale Lokalisation von *MCPH1* während der Interphase, analog der Lokalisationen von *PCNT* und *Chk1*; *MCPH1* und *Chk1* lassen sich darüber hinaus auch im Zellkern detektieren. Die Ergebnisse zeigen ebenfalls, dass die Defizienz von *MCPH1* zu einer Reduktion von zentrosomalem *PCNT* führt, was auf eine Beteiligung von *MCPH1* auch an der zentrosomalen Rekrutierung von *PCNT* hinweist.

Neben diesen strukturellen Zusammenhängen wurde auch der funktionelle Aspekt der beobachteten Interaktionen im Hinblick auf die Regulation des Zellzyklus untersucht. Die Ergebnisse zeigen, dass die durch den Verlust von PCNT bzw. MCPH1 bedingte Delokalisation von Chk1 zu einer vorzeitigen Aktivierung des Cyclin B/Cdk1-Komplexes und somit einem verfrühten Eintritt in die Mitose führt. Die mittels mikroskopischer Zeitrafferaufnahmen dokumentierten Effekte dieser Zellzyklusderegulation im Sinne einer verlängerten Mitosedauer, wie auch einer erhöhten Zelltod-Rate während der Mitose, implizieren eben diese Störung des Zellzyklus als gemeinsame molekulare Endstrecke in der Pathogenese von Primärer Mikrozephalie und MOPD II, und erklären somit den ähnlichen klinischen Phänotyp dieser genetisch unterschiedlichen Entitäten.

6. Summary

Primary microcephaly, Seckel syndrome, and microcephalic osteodysplastic primordial dwarfism type II (MOPD II) are autosomal recessive disorders exhibiting marked microcephaly with reduced brain size reflecting decreased neuron production during fetal life. Despite showing similar clinical phenotypes, the genetic cause of these disorders is heterogeneous: Some individuals with Seckel syndrome harbour a mutation in the *ataxia-telangiectasia and Rad3-related (ATR)* gene, which encodes a kinase that has an essential function in coordinating the response to DNA damage. Recently, it has been reported that mutations in *pericentrin (PCNT)* also cause Seckel syndrome and MOPD II. *Microcephalin (MCPH1)* was the first causative gene being identified in patients with primary microcephaly. The corresponding gene products, ATR, PCNT, and MCPH1 play a crucial role in DNA damage response signalling as well as in the regulation of mitotic initiation and progression in unperturbed cells.

The aim of the presented dissertation was to examine the function of PCNT and MCPH1 in centrosome-mediated regulation of mitosis, in particular their role in spatiotemporal regulation of checkpoint kinase 1 (Chk1). The results showed that Chk1 is lost from centrosomes in MCPH1- and PCNT-deficient cells derived from individuals with primary microcephaly and MOPD II, as well as in cells treated with MCPH1- and PCNT-specific siRNAs. These data indicate that MCPH1 and PCNT are required to recruit Chk1 to the centrosome during the interphase of the cell cycle. Further results showed that Chk1, MCPH1 and PCNT not only interact with each other *in vivo*, but also are detectable in the same protein-complex.

The creation of a monoclonal antibody, raised against the N-terminal fragment of human MCPH1 enabled us to analyze the subcellular distribution of this protein. The data show that MCPH1 localizes to interphase centrosomes, similar to the localizations of PCNT and Chk1; both MCPH1 and Chk1 could also be detected in the nucleus. Furthermore, the observation of significantly reduced levels of centrosomal PCNT indicates that MCPH1 contributes to the centrosomal recruitment of PCNT.

In addition to the structural context we also examined the functional aspects of the observed interactions, in particular regarding their effects on cell cycle regulation. The results demonstrate that depletion of MCPH1 or PCNT and the ensuing loss of Chk1 from the centrosome lead to premature activation of cyclin B/Cdk1, thus resulting in a premature entry into mitosis. Time-lapse video microscopy of MCPH1- and PCNT-depleted cells showed this deregulation of cell cycle control to cause a significant delay in mitosis, as well as increased rates of cell death in the affected cells. Consequently, loss of regulatory restraints on the initial activation of cyclin B–Cdk1 at the centrosome might be a common final path in microcephalic disorders with reduced body size, thereby explaining for the first time why seemingly unrelated genetic defects result in a common human disease phenotype.

7. Literaturverzeichnis

Alderton, G.K., Galbiati, L., Griffith, E., Surinya, K.H., Neitzel, H., Jackson, A.P., Jeggo, P.A. und O'Driscoll, M. (2006). Regulation of mitotic entry by microcephalin and its overlap with ATR signalling. *Nat Cell Biol* 8, 725-733.

Andersen, J.S., Wilkinson, C.J., Mayor, T., Mortensen, P., Nigg, E.A. und Mann, M. (2003). Proteomic characterization of the human centrosome by protein correlation profiling. *Nature* 426, 570-574.

Ansley, S.J., Badano, J.L., Blacque, O.E., Hill, J., Hoskins, B.E., Leitch, C.C., Kim, J.C., Ross, A.J., Eichers, E.R., Teslovich, T.M., Mah, A.K., Johnsen, R.C., Cavender, J.C., Lewis, R.A., Leroux, M.R., Beales, P.L. und Katsanis, N. (2003). Basal body dysfunction is a likely cause of pleiotropic Bardet-Biedl syndrome. *Nature* 425, 628-633.

Azimzadeh, J. und Bornens, M. (2007). Structure and duplication of the centrosome. *J Cell Sci* 120, 2139-2142.

Badano, J.L., Teslovich, T.M. und Katsanis, N. (2005). The centrosome in human genetic disease. *Nat Rev Genet* 6, 194-205.

Bahe, S., Stierhof, Y.D., Wilkinson, C.J., Leiss, F. und Nigg, E.A. (2005). Rootletin forms centriole-associated filaments and functions in centrosome cohesion. *J Cell Biol* 171, 27-33.

Bailly, E., Doree, M., Nurse, P. und Bornens, M. (1989). p34cdc2 is located in both nucleus and cytoplasm; part is centrosomally associated at G2/M and enters vesicles at anaphase. *EMBO J* 8, 3985-3995.

Bailly, E., Pines, J., Hunter, T. und Bornens, M. (1992). Cytoplasmic accumulation of cyclin B1 in human cells: association with a detergent-resistant compartment and with the centrosome. *J Cell Sci* 101 (Pt 3), 529-545.

Barr, A.R. und Gergely, F. (2007). Aurora-A: the maker and breaker of spindle poles. *J Cell Sci* 120, 2987-2996.

Barr, F.A., Sillje, H.H. und Nigg, E.A. (2004). Polo-like kinases and the orchestration of cell division. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5, 429-440.

Bartek, J., Lukas, C. und Lukas, J. (2004). Checking on DNA damage in S phase. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5, 792-804.

Berdnik, D. und Knoblich, J.A. (2002). Drosophila Aurora-A is required for centrosome maturation and actin-dependent asymmetric protein localization during mitosis. *Curr Biol* 12, 640-647.

Besson, A., Dowdy, S.F. und Roberts, J.M. (2008). CDK inhibitors: cell cycle regulators and beyond. *Dev Cell* 14, 159-169.

Bettencourt-Dias, M. und Glover, D.M. (2009). SnapShot: centriole biogenesis. *Cell* 136, 188-188 e181.

Blagden, S.P. und Glover, D.M. (2003). Polar expeditions--provisioning the centrosome for mitosis. *Nat Cell Biol* 5, 505-511.

- Bond, J., Roberts, E., Mochida, G.H., Hampshire, D.J., Scott, S., Askham, J.M., Springell, K., Mahadevan, M., Crow, Y.J., Markham, A.F., Walsh, C.A. und Woods, C.G. (2002). ASPM is a major determinant of cerebral cortical size. *Nat Genet* 32, 316-320.
- Bond, J., Roberts, E., Springell, K., Lizarraga, S.B., Scott, S., Higgins, J., Hampshire, D.J., Morrison, E.E., Leal, G.F., Silva, E.O., Costa, S.M., Baralle, D., Raponi, M., Karbani, G., Rashid, Y., Jafri, H., Bennett, C., Corry, P., Walsh, C.A. und Woods, C.G. (2005). A centrosomal mechanism involving CDK5RAP2 and CENPJ controls brain size. *Nat Genet* 37, 353-355.
- Bornens, M. und Moudjou, M. (1999). Studying the composition and function of centrosomes in vertebrates. *Methods Cell Biol* 61, 13-34.
- Bourke, E., Dodson, H., Merdes, A., Cuffe, L., Zachos, G., Walker, M., Gillespie, D. und Morrison, C.G. (2007). DNA damage induces Chk1-dependent centrosome amplification. *EMBO Rep* 8, 603-609.
- Boveri, T. (1887). Über die Befruchtung der Eier von *Ascaris megalocephala* Sitzungsberichte der Gesellschaft für Morphologie und Physiologie in München 3.
- Boveri, T. (1888). Zellenstudien II: Die Befruchtung und Teilung des Eies von *Ascaris megalocephala*. *Jenaische Zeitschrift für Naturwissenschaft* 22, 685-882.
- Boveri, T. (1914). Zur Frage der Entstehung maligner Tumoren. Fischer, Jena.
- Brunk, K., Vernay, B., Griffith, E., Reynolds, N.L., Strutt, D., Ingham, P.W. und Jackson, A.P. (2007). Microcephalin coordinates mitosis in the syncytial *Drosophila* embryo. *J Cell Sci* 120, 3578-3588.
- Chaplet, M., Rai, R., Jackson-Bernitsas, D., Li, K. und Lin, S.Y. (2006). BRIT1/MCPH1: a guardian of genome and an enemy of tumors. *Cell Cycle* 5, 2579-2583.
- Chen, D., Purohit, A., Halilovic, E., Doxsey, S.J. und Newton, A.C. (2004). Centrosomal anchoring of protein kinase C betaII by pericentrin controls microtubule organization, spindle function, and cytokinesis. *J Biol Chem* 279, 4829-4839.
- Chen, M.S., Ryan, C.E. und Piwnica-Worms, H. (2003a). Chk1 kinase negatively regulates mitotic function of Cdc25A phosphatase through 14-3-3 binding. *Mol Cell Biol* 23, 7488-7497.
- Chen, Z., Xiao, Z., Chen, J., Ng, S.C., Sowin, T., Sham, H., Rosenberg, S., Fesik, S. und Zhang, H. (2003b). Human Chk1 expression is dispensable for somatic cell death and critical for sustaining G2 DNA damage checkpoint. *Mol Cancer Ther* 2, 543-548.
- Cox, J., Jackson, A.P., Bond, J. und Woods, C.G. (2006). What primary microcephaly can tell us about brain growth. *Trends Mol Med* 12, 358-366.
- Dammermann, A. und Merdes, A. (2002). Assembly of centrosomal proteins and microtubule organization depends on PCM-1. *J Cell Biol* 159, 255-266.
- Dammermann, A., Muller-Reichert, T., Pelletier, L., Habermann, B., Desai, A. und Oegema, K. (2004). Centriole assembly requires both centriolar and pericentriolar material proteins. *Dev Cell* 7, 815-829.
- Dawe, H.R., Farr, H. und Gull, K. (2007). Centriole/basal body morphogenesis and migration during ciliogenesis in animal cells. *J Cell Sci* 120, 7-15.

- Dictenberg, J.B., Zimmerman, W., Sparks, C.A., Young, A., Vidair, C., Zheng, Y., Carrington, W., Fay, F.S. und Doxsey, S.J. (1998). Pericentrin and gamma-tubulin form a protein complex and are organized into a novel lattice at the centrosome. *J Cell Biol* 141, 163-174.
- Diviani, D., Langeberg, L.K., Doxsey, S.J. und Scott, J.D. (2000). Pericentrin anchors protein kinase A at the centrosome through a newly identified RII-binding domain. *Curr Biol* 10, 417-420.
- Dodson, H., Bourke, E., Jeffers, L.J., Vagnarelli, P., Sonoda, E., Takeda, S., Earnshaw, W.C., Merdes, A. und Morrison, C. (2004). Centrosome amplification induced by DNA damage occurs during a prolonged G2 phase and involves ATM. *EMBO J* 23, 3864-3873.
- Doxsey, S., Zimmerman, W. und Mikule, K. (2005). Centrosome control of the cell cycle. *Trends Cell Biol* 15, 303-311.
- Doxsey, S.J., Stein, P., Evans, L., Calarco, P.D. und Kirschner, M. (1994). Pericentrin, a highly conserved centrosome protein involved in microtubule organization. *Cell* 76, 639-650.
- Dutertre, S., Cazales, M., Quaranta, M., Froment, C., Trabut, V., Dozier, C., Mirey, G., Bouche, J.P., Theis-Febvre, N., Schmitt, E., Monsarrat, B., Prigent, C. und Ducommun, B. (2004). Phosphorylation of CDC25B by Aurora-A at the centrosome contributes to the G2-M transition. *J Cell Sci* 117, 2523-2531.
- Evans, T., Rosenthal, E.T., Youngblom, J., Distel, D. und Hunt, T. (1983). Cyclin: a protein specified by maternal mRNA in sea urchin eggs that is destroyed at each cleavage division. *Cell* 33, 389-396.
- Feijoo, C., Hall-Jackson, C., Wu, R., Jenkins, D., Leitch, J., Gilbert, D.M. und Smythe, C. (2001). Activation of mammalian Chk1 during DNA replication arrest: a role for Chk1 in the intra-S phase checkpoint monitoring replication origin firing. *J Cell Biol* 154, 913-923.
- Fields, S. und Song, O. (1989). A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature* 340, 245-246.
- Fish, J.L., Kosodo, Y., Enard, W., Paabo, S. und Huttner, W.B. (2006). Aspm specifically maintains symmetric proliferative divisions of neuroepithelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 10438-10443.
- Flory, M.R. und Davis, T.N. (2003). The centrosomal proteins pericentrin and kendrin are encoded by alternatively spliced products of one gene. *Genomics* 82, 401-405.
- Flory, M.R., Morphey, M., Joseph, J.D., Means, A.R. und Davis, T.N. (2002). Pcp1p, an Spc110p-related calmodulin target at the centrosome of the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Cell Growth Differ* 13, 47-58.
- Flory, M.R., Moser, M.J., Monnat, R.J., Jr. und Davis, T.N. (2000). Identification of a human centrosomal calmodulin-binding protein that shares homology with pericentrin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 5919-5923.
- Fry, A.M. (2002). The Nek2 protein kinase: a novel regulator of centrosome structure. *Oncogene* 21, 6184-6194.
- Ganem, N.J., Godinho, S.A. und Pellman, D. (2009). A mechanism linking extra centrosomes to chromosomal instability. *Nature* 460, 278-282.
- Gietz, D., St Jean, A., Woods, R.A. und Schiestl, R.H. (1992). Improved method for high efficiency transformation of intact yeast cells. *Nucleic Acids Res* 20, 1425.

- Gillingham, A.K. und Munro, S. (2000). The PACT domain, a conserved centrosomal targeting motif in the coiled-coil proteins AKAP450 and pericentrin. *EMBO Rep* 1, 524-529.
- Golubkov, V.S., Boyd, S., Savinov, A.Y., Chekanov, A.V., Osterman, A.L., Remacle, A., Rozanov, D.V., Doxsey, S.J. und Strongin, A.Y. (2005). Membrane type-1 matrix metalloproteinase (MT1-MMP) exhibits an important intracellular cleavage function and causes chromosome instability. *J Biol Chem* 280, 25079-25086.
- Goodship, J., Gill, H., Carter, J., Jackson, A., Splitt, M. und Wright, M. (2000). Autozygosity mapping of a seckel syndrome locus to chromosome 3q22. 1-q24. *Am J Hum Genet* 67, 498-503.
- Graser, S., Stierhof, Y.D. und Nigg, E.A. (2007). Cep68 and Cep215 (Cdk5rap2) are required for centrosome cohesion. *J Cell Sci* 120, 4321-4331.
- Griffith, E., Walker, S., Martin, C.A., Vagnarelli, P., Stiff, T., Vernay, B., Al Sanna, N., Saggar, A., Hamel, B., Earnshaw, W.C., Jeggo, P.A., Jackson, A.P. und O'Driscoll, M. (2008). Mutations in pericentrin cause Seckel syndrome with defective ATR-dependent DNA damage signaling. *Nat Genet* 40, 232-236.
- Guarguaglini, G., Duncan, P.I., Stierhof, Y.D., Holmstrom, T., Duensing, S. und Nigg, E.A. (2005). The forkhead-associated domain protein Cep170 interacts with Polo-like kinase 1 and serves as a marker for mature centrioles. *Mol Biol Cell* 16, 1095-1107.
- Guo, J., Yang, Z., Song, W., Chen, Q., Wang, F., Zhang, Q. und Zhu, X. (2006). Nudel contributes to microtubule anchoring at the mother centriole and is involved in both dynein-dependent and -independent centrosomal protein assembly. *Mol Biol Cell* 17, 680-689.
- Guo, Z., Kumagai, A., Wang, S.X. und Dunphy, W.G. (2000). Requirement for Atr in phosphorylation of Chk1 and cell cycle regulation in response to DNA replication blocks and UV-damaged DNA in *Xenopus* egg extracts. *Genes Dev* 14, 2745-2756.
- Habedanck, R., Stierhof, Y.D., Wilkinson, C.J. und Nigg, E.A. (2005). The Polo kinase Plk4 functions in centriole duplication. *Nat Cell Biol* 7, 1140-1146.
- Halazonetis, T.D., Gorgoulis, V.G. und Bartek, J. (2008). An oncogene-induced DNA damage model for cancer development. *Science* 319, 1352-1355.
- Hall, J.G., Flora, C., Scott, C.I., Jr., Pauli, R.M. und Tanaka, K.I. (2004). Majewski osteodysplastic primordial dwarfism type II (MOPD II): natural history and clinical findings. *Am J Med Genet A* 130A, 55-72.
- Hinchcliffe, E.H., Miller, F.J., Cham, M., Khodjakov, A. und Sluder, G. (2001). Requirement of a centrosomal activity for cell cycle progression through G1 into S phase. *Science* 291, 1547-1550.
- Jackman, M., Lindon, C., Nigg, E.A. und Pines, J. (2003). Active cyclin B1-Cdk1 first appears on centrosomes in prophase. *Nat Cell Biol* 5, 143-148.
- Jackson, A.P., Eastwood, H., Bell, S.M., Adu, J., Toomes, C., Carr, I.M., Roberts, E., Hampshire, D.J., Crow, Y.J., Mighell, A.J., Karbani, G., Jafri, H., Rashid, Y., Mueller, R.F., Markham, A.F. und Woods, C.G. (2002). Identification of microcephalin, a protein implicated in determining the size of the human brain. *Am J Hum Genet* 71, 136-142.

- Janke, C., Rogowski, K., Wloga, D., Regnard, C., Kajava, A.V., Strub, J.M., Temurak, N., van Dijk, J., Boucher, D., van Dorsselaer, A., Suryavanshi, S., Gaertig, J. und Edde, B. (2005). Tubulin polyglutamylase enzymes are members of the TTL domain protein family. *Science* 308, 1758-1762.
- Jeffers, L.J., Coull, B.J., Stack, S.J. und Morrison, C.G. (2008). Distinct BRCT domains in Mcph1/Brit1 mediate ionizing radiation-induced focus formation and centrosomal localization. *Oncogene* 27, 139-144.
- Jurczyk, A., Gromley, A., Redick, S., San Agustin, J., Witman, G., Pazour, G.J., Peters, D.J. und Doxsey, S. (2004). Pericentrin forms a complex with intraflagellar transport proteins and polycystin-2 and is required for primary cilia assembly. *J Cell Biol* 166, 637-643.
- Kawaguchi, S. und Zheng, Y. (2004). Characterization of a Drosophila centrosome protein CP309 that shares homology with Kendrin and CG-NAP. *Mol Biol Cell* 15, 37-45.
- Khodjakov, A. und Rieder, C.L. (2001). Centrosomes enhance the fidelity of cytokinesis in vertebrates and are required for cell cycle progression. *J Cell Biol* 153, 237-242.
- Kim, A.H., Puram, S.V., Bilimoria, P.M., Ikeuchi, Y., Keough, S., Wong, M., Rowitch, D. und Bonni, A. (2009). A centrosomal Cdc20-APC pathway controls dendrite morphogenesis in postmitotic neurons. *Cell* 136, 322-336.
- Kim, J.C., Badano, J.L., Sibold, S., Esmail, M.A., Hill, J., Hoskins, B.E., Leitch, C.C., Venner, K., Ansley, S.J., Ross, A.J., Leroux, M.R., Katsanis, N. und Beales, P.L. (2004). The Bardet-Biedl protein BBS4 targets cargo to the pericentriolar region and is required for microtubule anchoring and cell cycle progression. *Nat Genet* 36, 462-470.
- Kouzarides, T. (2007). Chromatin modifications and their function. *Cell* 128, 693-705.
- Krämer, A., Mailand, N., Lukas, C., Syljuasen, R.G., Wilkinson, C.J., Nigg, E.A., Bartek, J. und Lukas, J. (2004). Centrosome-associated Chk1 prevents premature activation of cyclin-B-Cdk1 kinase. *Nat Cell Biol* 6, 884-891.
- Krämer, A., Neben, K. und Ho, A.D. (2005). Centrosome aberrations in hematological malignancies. *Cell Biol Int* 29, 375-383.
- Kubo, A., Sasaki, H., Yuba-Kubo, A., Tsukita, S. und Shiina, N. (1999). Centriolar satellites: molecular characterization, ATP-dependent movement toward centrioles and possible involvement in ciliogenesis. *J Cell Biol* 147, 969-980.
- Kubo, A. und Tsukita, S. (2003). Non-membranous granular organelle consisting of PCM-1: subcellular distribution and cell-cycle-dependent assembly/disassembly. *J Cell Sci* 116, 919-928.
- Kumar, A., Girimaji, S.C., Duvvari, M.R. und Blanton, S.H. (2009). Mutations in STIL, encoding a pericentriolar and centrosomal protein, cause primary microcephaly. *Am J Hum Genet* 84, 286-290.
- Li, J.B., Gerdes, J.M., Haycraft, C.J., Fan, Y., Teslovich, T.M., May-Simera, H., Li, H., Blacque, O.E., Li, L., Leitch, C.C., Lewis, R.A., Green, J.S., Parfrey, P.S., Leroux, M.R., Davidson, W.S., Beales, P.L., Guay-Woodford, L.M., Yoder, B.K., Stormo, G.D., Katsanis, N. und Dutcher, S.K. (2004). Comparative genomics identifies a flagellar and basal body proteome that includes the BBS5 human disease gene. *Cell* 117, 541-552.

- Lin, S.Y., Rai, R., Li, K., Xu, Z.X. und Elledge, S.J. (2005). BRIT1/MCPH1 is a DNA damage responsive protein that regulates the Brca1-Chk1 pathway, implicating checkpoint dysfunction in microcephaly. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 15105-15109.
- Lindqvist, A., Kallstrom, H., Lundgren, A., Barsoum, E. und Rosenthal, C.K. (2005). Cdc25B cooperates with Cdc25A to induce mitosis but has a unique role in activating cyclin B1-Cdk1 at the centrosome. *J Cell Biol* 171, 35-45.
- Lindqvist, A., Rodriguez-Bravo, V. und Medema, R.H. (2009). The decision to enter mitosis: feedback and redundancy in the mitotic entry network. *J Cell Biol* 185, 193-202.
- Lindqvist, A., van Zon, W., Karlsson Rosenthal, C. und Wolthuis, R.M. (2007). Cyclin B1-Cdk1 activation continues after centrosome separation to control mitotic progression. *PLoS Biol* 5, e123.
- Liu, Q., Guntuku, S., Cui, X.S., Matsuoka, S., Cortez, D., Tamai, K., Luo, G., Carattini-Rivera, S., DeMayo, F., Bradley, A., Donehower, L.A. und Elledge, S.J. (2000). Chk1 is an essential kinase that is regulated by Atr and required for the G(2)/M DNA damage checkpoint. *Genes Dev* 14, 1448-1459.
- Löffler, H., Bochtler, T., Fritz, B., Tews, B., Ho, A.D., Lukas, J., Bartek, J. und Kramer, A. (2007). DNA damage-induced accumulation of centrosomal Chk1 contributes to its checkpoint function. *Cell Cycle* 6, 2541-2548.
- Löffler, H., Lukas, J., Bartek, J. und Kramer, A. (2006). Structure meets function--centrosomes, genome maintenance and the DNA damage response. *Exp Cell Res* 312, 2633-2640.
- Ma, W., Koch, J.A. und Viveiros, M.M. (2008). Protein kinase C delta (PKCdelta) interacts with microtubule organizing center (MTOC)-associated proteins and participates in meiotic spindle organization. *Dev Biol* 320, 414-425.
- Mailand, N., Falck, J., Lukas, C., Syljuasen, R.G., Welcker, M., Bartek, J. und Lukas, J. (2000). Rapid destruction of human Cdc25A in response to DNA damage. *Science* 288, 1425-1429.
- Malumbres, M. und Barbacid, M. (2009). Cell cycle, CDKs and cancer: a changing paradigm. *Nat Rev Cancer* 9, 153-166.
- Martinez-Campos, M., Basto, R., Baker, J., Kernan, M. und Raff, J.W. (2004). The Drosophila pericentrin-like protein is essential for cilia/flagella function, but appears to be dispensable for mitosis. *J Cell Biol* 165, 673-683.
- Matsumoto, Y. und Maller, J.L. (2004). A centrosomal localization signal in cyclin E required for Cdk2-independent S phase entry. *Science* 306, 885-888.
- Mayor, T., Hacker, U., Stierhof, Y.D. und Nigg, E.A. (2002). The mechanism regulating the dissociation of the centrosomal protein C-Nap1 from mitotic spindle poles. *J Cell Sci* 115, 3275-3284.
- Meraldi, P. und Nigg, E.A. (2002). The centrosome cycle. *FEBS Lett* 521, 9-13.
- Mikule, K., Delaval, B., Kaldis, P., Jurczyk, A., Hergert, P. und Doxsey, S. (2007). Loss of centrosome integrity induces p38-p53-p21-dependent G1-S arrest. *Nat Cell Biol* 9, 160-170.
- Miyoshi, K., Asanuma, M., Miyazaki, I., Matsuzaki, S., Tohyama, M. und Ogawa, N. (2006). Characterization of pericentrin isoforms in vivo. *Biochem Biophys Res Commun* 351, 745-749.

- Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G. und Erlich, H. (1986). Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 51 Pt 1, 263-273.
- Murray, A.W. (2004). Recycling the cell cycle: cyclins revisited. *Cell* 116, 221-234.
- Neitzel, H., Neumann, L.M., Schindler, D., Wirges, A., Tonnie, H., Trimborn, M., Krebsova, A., Richter, R. und Sperling, K. (2002). Premature chromosome condensation in humans associated with microcephaly and mental retardation: a novel autosomal recessive condition. *Am J Hum Genet* 70, 1015-1022.
- Nigg, E.A. (2006). Origins and consequences of centrosome aberrations in human cancers. *Int J Cancer* 119, 2717-2723.
- Nigg, E.A. (2007). Centrosome duplication: of rules and licenses. *Trends Cell Biol* 17, 215-221.
- Niida, H., Katsuno, Y., Banerjee, B., Hande, M.P. und Nakanishi, M. (2007). Specific role of Chk1 phosphorylations in cell survival and checkpoint activation. *Mol Cell Biol* 27, 2572-2581.
- Niida, H., Tsuge, S., Katsuno, Y., Konishi, A., Takeda, N. und Nakanishi, M. (2005). Depletion of Chk1 leads to premature activation of Cdc2-cyclin B and mitotic catastrophe. *J Biol Chem* 280, 39246-39252.
- O'Driscoll, M., Jackson, A.P. und Jeggo, P.A. (2006). Microcephalin: a causal link between impaired damage response signalling and microcephaly. *Cell Cycle* 5, 2339-2344.
- O'Driscoll, M., Ruiz-Perez, V.L., Woods, C.G., Jeggo, P.A. und Goodship, J.A. (2003). A splicing mutation affecting expression of ataxia-telangiectasia and Rad3-related protein (ATR) results in Seckel syndrome. *Nat Genet* 33, 497-501.
- Ou, Y. und Rattner, J.B. (2004). The centrosome in higher organisms: structure, composition, and duplication. *Int Rev Cytol* 238, 119-182.
- Ou, Y., Zhang, M. und Rattner, J.B. (2004). The centrosome: The centriole-PCM coalition. *Cell Motil Cytoskeleton* 57, 1-7.
- Palazzo, R.E., Vogel, J.M., Schnackenberg, B.J., Hull, D.R. und Wu, X. (2000). Centrosome maturation. *Curr Top Dev Biol* 49, 449-470.
- Peng, G., Yim, E.K., Dai, H., Jackson, A.P., Burgt, I.V., Pan, M.R., Hu, R., Li, K. und Lin, S.Y. (2009). BRIT1/MCPH1 links chromatin remodelling to DNA damage response. *Nat Cell Biol*.
- Petermann, E., Maya-Mendoza, A., Zachos, G., Gillespie, D.A., Jackson, D.A. und Caldecott, K.W. (2006). Chk1 requirement for high global rates of replication fork progression during normal vertebrate S phase. *Mol Cell Biol* 26, 3319-3326.
- Pines, J. und Rieder, C.L. (2001). Re-staging mitosis: a contemporary view of mitotic progression. *Nat Cell Biol* 3, E3-6.
- Ponten, J. und Saksela, E. (1967). Two established in vitro cell lines from human mesenchymal tumours. *Int J Cancer* 2, 434-447.
- Rai, R., Dai, H., Multani, A.S., Li, K., Chin, K., Gray, J., Lahad, J.P., Liang, J., Mills, G.B., Meric-Bernstam, F. und Lin, S.Y. (2006). BRIT1 regulates early DNA damage response, chromosomal integrity, and cancer. *Cancer Cell* 10, 145-157.

- Rai, R., Phadnis, A., Haralkar, S., Badwe, R.A., Dai, H., Li, K. und Lin, S.Y. (2008). Differential regulation of centrosome integrity by DNA damage response proteins. *Cell Cycle* 7, 2225-2233.
- Rauch, A., Thiel, C.T., Schindler, D., Wick, U., Crow, Y.J., Ekici, A.B., van Essen, A.J., Goecke, T.O., Al-Gazali, L., Chrzanowska, K.H., Zweier, C., Brunner, H.G., Becker, K., Curry, C.J., Dallapiccola, B., Devriendt, K., Dorfler, A., Kinning, E., Megarbane, A., Meinecke, P., Semple, R.K., Spranger, S., Toutain, A., Trembath, R.C., Voss, E., Wilson, L., Hennekam, R., de Zegher, F., Dorr, H.G. und Reis, A. (2008). Mutations in the pericentrin (PCNT) gene cause primordial dwarfism. *Science* 319, 816-819.
- Reinhardt, H.C., Aslanian, A.S., Lees, J.A. und Yaffe, M.B. (2007). p53-deficient cells rely on ATM- and ATR-mediated checkpoint signaling through the p38MAPK/MK2 pathway for survival after DNA damage. *Cancer Cell* 11, 175-189.
- Rodriguez, M.C. und Songyang, Z. (2008). BRCT domains: phosphopeptide binding and signaling modules. *Front Biosci* 13, 5905-5915.
- Roninson, I.B., Broude, E.V. und Chang, B.D. (2001). If not apoptosis, then what? Treatment-induced senescence and mitotic catastrophe in tumor cells. *Drug Resist Updat* 4, 303-313.
- Rose, A. und Meier, I. (2004). Scaffolds, levers, rods and springs: diverse cellular functions of long coiled-coil proteins. *Cell Mol Life Sci* 61, 1996-2009.
- Rusan, N.M. und Peifer, M. (2007). A role for a novel centrosome cycle in asymmetric cell division. *J Cell Biol* 177, 13-20.
- Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B. und Erlich, H.A. (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239, 487-491.
- Salisbury, J.L. (2003). Centrosomes: coiled-coils organize the cell center. *Curr Biol* 13, R88-90.
- Salisbury, J.L., Suino, K.M., Busby, R. und Springett, M. (2002). Centrin-2 is required for centriole duplication in mammalian cells. *Curr Biol* 12, 1287-1292.
- Sanger, F., Nicklen, S. und Coulson, A.R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74, 5463-5467.
- Schmitt, E., Boutros, R., Froment, C., Monsarrat, B., Ducommun, B. und Dozier, C. (2006). CHK1 phosphorylates CDC25B during the cell cycle in the absence of DNA damage. *J Cell Sci* 119, 4269-4275.
- Shechter, D., Costanzo, V. und Gautier, J. (2004). ATR and ATM regulate the timing of DNA replication origin firing. *Nat Cell Biol* 6, 648-655.
- Shimada, M., Niida, H., Zineldeen, D.H., Tagami, H., Tanaka, M., Saito, H. und Nakanishi, M. (2008). Chk1 is a histone H3 threonine 11 kinase that regulates DNA damage-induced transcriptional repression. *Cell* 132, 221-232.
- Smits, V.A., Reaper, P.M. und Jackson, S.P. (2006). Rapid PIKK-dependent release of Chk1 from chromatin promotes the DNA-damage checkpoint response. *Curr Biol* 16, 150-159.
- Stearns, T. (2001). Centrosome duplication. a centriolar pas de deux. *Cell* 105, 417-420.
- Takada, S., Kelkar, A. und Theurkauf, W.E. (2003). Drosophila checkpoint kinase 2 couples centrosome function and spindle assembly to genomic integrity. *Cell* 113, 87-99.

- Takahashi, M., Shibata, H., Shimakawa, M., Miyamoto, M., Mukai, H. und Ono, Y. (1999). Characterization of a novel giant scaffolding protein, CG-NAP, that anchors multiple signaling enzymes to centrosome and the golgi apparatus. *J Biol Chem* 274, 17267-17274.
- Takahashi, M., Yamagiwa, A., Nishimura, T., Mukai, H. und Ono, Y. (2002). Centrosomal proteins CG-NAP and kendrin provide microtubule nucleation sites by anchoring gamma-tubulin ring complex. *Mol Biol Cell* 13, 3235-3245.
- Takai, H., Tominaga, K., Motoyama, N., Minamishima, Y.A., Nagahama, H., Tsukiyama, T., Ikeda, K., Nakayama, K. und Nakanishi, M. (2000). Aberrant cell cycle checkpoint function and early embryonic death in Chk1(-/-) mice. *Genes Dev* 14, 1439-1447.
- Takizawa, C.G. und Morgan, D.O. (2000). Control of mitosis by changes in the subcellular location of cyclin-B1-Cdk1 and Cdc25C. *Curr Opin Cell Biol* 12, 658-665.
- Thomas, J.O. und Kornberg, R.D. (1975). An octamer of histones in chromatin and free in solution. *Proc Natl Acad Sci U S A* 72, 2626-2630.
- Trimborn, M., Bell, S.M., Felix, C., Rashid, Y., Jafri, H., Griffiths, P.D., Neumann, L.M., Krebs, A., Reis, A., Sperling, K., Neitzel, H. und Jackson, A.P. (2004). Mutations in microcephalin cause aberrant regulation of chromosome condensation. *Am J Hum Genet* 75, 261-266.
- Trimborn, M., Richter, R., Sternberg, N., Gavvovidis, I., Schindler, D., Jackson, A.P., Prott, E.C., Sperling, K., Gillessen-Kaesbach, G. und Neitzel, H. (2005). The first missense alteration in the MCPH1 gene causes autosomal recessive microcephaly with an extremely mild cellular and clinical phenotype. *Hum Mutat* 26, 496.
- Trimborn, M., Schindler, D., Neitzel, H. und Hirano, T. (2006). Misregulated chromosome condensation in MCPH1 primary microcephaly is mediated by condensin II. *Cell Cycle* 5, 322-326.
- Trinkle-Mulcahy, L. und Lamond, A.I. (2006). Mitotic phosphatases: no longer silent partners. *Curr Opin Cell Biol* 18, 623-631.
- Tsou, M.F. und Stearns, T. (2006). Mechanism limiting centrosome duplication to once per cell cycle. *Nature* 442, 947-951.
- Van Beneden, É. (1876). Recherches sur les Dicyémides, Survivants Actuels d'un Embranchement des Mésozoaires. *Bulletins de l' Académie Royale des Sciences, des Lettres et des Beaux-Arts de Belgique* 2, 41, 42, 1160-1205 and 1135-1197.
- Wang, Y., Ji, P., Liu, J., Broaddus, R.R., Xue, F. und Zhang, W. (2009). Centrosome-associated regulators of the G(2)/M checkpoint as targets for cancer therapy. *Mol Cancer* 8, 8.
- Wilsker, D., Petermann, E., Helleday, T. und Bunz, F. (2008). Essential function of Chk1 can be uncoupled from DNA damage checkpoint and replication control. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 20752-20757.
- Wood, J.L., Li, K., Liang, Y. und Chen, J. (2008). Microcephalin/MCPH1 associates with the condensin ii complex to function in homologous recombination repair. *J Biol Chem*.
- Wood, J.L., Singh, N., Mer, G. und Chen, J. (2007). MCPH1 functions in an H2AX-dependent but MDC1-independent pathway in response to DNA damage. *J Biol Chem* 282, 35416-35423.

- Woods, C.G., Bond, J. und Enard, W. (2005). Autosomal recessive primary microcephaly (MCPH): a review of clinical, molecular, and evolutionary findings. *Am J Hum Genet* 76, 717-728.
- Xu, X., Lee, J. und Stern, D.F. (2004). Microcephalin is a DNA damage response protein involved in regulation of CHK1 and BRCA1. *J Biol Chem* 279, 34091-34094.
- Yang, S.Z., Lin, F.T. und Lin, W.C. (2008a). MCPH1/BRIT1 cooperates with E2F1 in the activation of checkpoint, DNA repair and apoptosis. *EMBO Rep* 9, 907-915.
- Yang, Z., Loncarek, J., Khodjakov, A. und Rieder, C.L. (2008b). Extra centrosomes and/or chromosomes prolong mitosis in human cells. *Nat Cell Biol* 10, 748-751.
- Young, A., Dichtenberg, J.B., Purohit, A., Tuft, R. und Doxsey, S.J. (2000). Cytoplasmic dynein-mediated assembly of pericentrin and gamma tubulin onto centrosomes. *Mol Biol Cell* 11, 2047-2056.
- Zachos, G., Black, E.J., Walker, M., Scott, M.T., Vagnarelli, P., Earnshaw, W.C. und Gillespie, D.A. (2007). Chk1 is required for spindle checkpoint function. *Dev Cell* 12, 247-260.
- Zachos, G., Rainey, M.D. und Gillespie, D.A. (2003). Chk1-deficient tumour cells are viable but exhibit multiple checkpoint and survival defects. *EMBO J* 22, 713-723.
- Zaghloul, N.A. und Katsanis, N. (2009). Mechanistic insights into Bardet-Biedl syndrome, a model ciliopathy. *J Clin Invest* 119, 428-437.
- Zhou, B.B. und Elledge, S.J. (2000). The DNA damage response: putting checkpoints in perspective. *Nature* 408, 433-439.
- Zimmerman, W.C., Sillibourne, J., Rosa, J. und Doxsey, S.J. (2004). Mitosis-specific anchoring of gamma tubulin complexes by pericentrin controls spindle organization and mitotic entry. *Mol Biol Cell* 15, 3642-3657.

8. Anhang

8.1. Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
AA	<i>amino acid</i> , Aminosäure
Abb.	Abbildung
Ade (A)	Adenin
bp	<i>base pairs</i> , Basenpaare
BrdU	Bromdesoxyuridin
BSA	<i>Bovine Serum Albumine</i> , Rinderserumalbumin
cDNA	<i>copy DNA</i> , zur mRNA komplementäre DNA
CldU	Chlordeoxyuridin
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i> , Desoxyribonukleinsäure
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTT	Dithiotreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGFP	<i>enhanced green fluorescent protein</i>
et al.	<i>et alii</i> , und andere
FACS	<i>fluorescence activated cell sorting</i>
GFP	<i>green fluorescent protein</i>
H+L	<i>heavy+light chain</i> , schwere und leichte Kette von IgG

HA	Hämagglutinin Epitop
HCl	Salzsäure
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-Ethansulfonsäure
His (H)	Histidin
HRP	<i>horseradish peroxidase</i> , Meerrettich-Peroxidase
IdU	Ioddeoxyuridin
IgG	Immunglobulin G
IgM	Immunglobulin M
IP	Immunpräzipitation
kb	kilo Basenpaare
KD	<i>kinase-dead</i>
kDa	kilo Dalton
LB	Luria-Bertani
LBC	<i>lymphoblastoid cells</i> , Kontroll-Lymphoblasten
Leu (L)	Leucin
M	Molar
M _r	Molekulargewicht
mRNA	<i>messenger</i> Ribonukleinsäure
OD	optische Dichte
OptiMEM	<i>Eagle's Minimum Essential Medium</i> , serumreduziert
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i> , Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> , Polymerasekettenreaktion
PEG	Polyethylenglykol
RIPA	<i>radio immunoprecipitation assay</i>

RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
pH	negativ dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionen-Konzentration
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
RNAi	RNA-Interferenz
RT	Raumtemperatur
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SDS	<i>sodium dodecylsulfate</i> , Natrium-Dodecylsulfat
siRNA	<i>small interfering</i> Ribonukleinsäure
Tab.	Tabelle
TAE	Tris Acetat EDTA
TBS	<i>Tris buffered saline</i> , Tris-gepufferte Kochsalzlösung
TE	Tris EDTA
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
Triton X-100	Octoxinol-9
Trp (T)	Tryptophan
Tween 20	Polyoxyethylen(20)-sorbitan-monolaurat
U	<i>unit</i> , Einheit
UpM	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett
WT	Wildtyp
YPD	<i>Yeast Peptone Dextrose</i>

8.2. *Abbildungsverzeichnis*

Abbildung 1-1: Zentrosomenstruktur.	2
Abbildung 1-2: Zentrosomenzyklus.	7
Abbildung 1-3: <i>DNA damage Checkpoints</i>	9
Abbildung 1-4: Phänotyp der Primären autosomal-rezessiven Mikrozephalie.	12
Abbildung 1-5: Humanes MCPH1.	13
Abbildung 1-6: MCPH1-Funktionen in der zellulären Antwort auf DNA-Schädigung und Zellzykluskontrolle.	14
Abbildung 1-7: Humanes Pericentrin (PCNT).	17
Abbildung 1-8: Potentielle Funktion von PCNT in ATR-vermittelter Regulation des G ₂ /M-Checkpoints.	19
Abbildung 3-1: Reduktion des zentrosomalen Chk1-Signals in MCPH1- und PCNT-defizienten Lymphoblasten.	55
Abbildung 3-2: Quantifizierung des zentrosomalen Chk1-Signals.	56
Abbildung 3-3: Reduktion des zentrosomalen Chk1-Signals in U2OS-Zellen, transfiziert mit MCPH1-spezifischer (siMCPH1) und PCNT-spezifischer (siPCNT) siRNA.	57
Abbildung 3-4: Chk1 ist reduziert in zentrosomalen Extrakten von MCPH1- und PCNT-defizienten Lymphoblasten.	58
Abbildung 3-5: Humanes MCPH1 lokalisiert am Zentrosom von Interphasezellen.	60
Abbildung 3-6: Transient exprimiertes GFP-MCPH1 interagiert mit endogenem Chk1 <i>in vivo</i>	61
Abbildung 3-7: Zentrosomale Lokalisation von MCPH1 wird nicht beeinträchtigt durch die Depletion von Chk1.	62
Abbildung 3-8: Reduktion des zentrosomalen PCNT-Signals in MCPH1-defizienten Lymphoblasten und MCPH1-depletierten U2OS-Zellen.	64
Abbildung 3-9: Reduktion des zentrosomalen PCNT-Levels in MCPH1-defizienten Zellen.	65
Abbildung 3-10: Zentrosomale Signale von Centrin, Nek2, Cep170 und γ -Tubulin in MCPH1- und PCNT-defizienten Lymphoblasten.	66
Abbildung 3-11: Transient exprimiertes GFP-MCPH1 interagiert mit endogenem PCNT <i>in vivo</i>	67
Abbildung 3-12: PCNT interagiert mit Chk1 <i>in vivo</i>	68
Abbildung 3-13: Die zentrosomale Lokalisation von PCNT ist unabhängig von Chk1.	69
Abbildung 3-14: PCNT, GFP-MCPH1 und Chk1 migrieren in einem großen Proteinkomplex.	70
Abbildung 3-15: Vorzeitige Dephosphorylierung von Cdc25B in MCPH1- und PCNT-defizienten Lymphoblasten.	72

Abbildung 3-16: Vorzeitige Aktivierung von zentrosomen-assoziiertem Cdk1 in MCPH1- und PCNT-defizienten Lymphoblasten.....	73
Abbildung 3-17: Zentrosomale Level von P-S230-Cdc25B und P-Y15-Cdk1 sind reduziert in MCPH1- und PCNT-defizienten Lymphoblasten.	74
Abbildung 3-18: RNAi-vermittelte Depletion von MCPH1 und PCNT führt zu einem erhöhten mitotischen Index in U2OS-Zellen.....	75
Abbildung 3-19: RNAi-vermittelte Depletion von MCPH1 und PCNT führt zur Verlängerung der Mitosedauer und zum mitoseassoziierten Zelltod in U2OS-Zellen.....	76
Abbildung 3-20: MCPH1-Defizienz führt zu einem erhöhten mitotischen Index.	77
Abbildung 3-21: „Rescue“ des mitotischen Index nach transienter Expression von MCPH1-FLAG in MCPH-defizienten Lymphoblasten.	78
Abbildung 3-22: Die Chk1-abhängige Wiederaufnahme der DNA-Synthese nach DNA-Replikationsblock ist intakt in MCPH1- und PCNT-defizienten Lymphoblasten.....	79
Abbildung 3-23: Charakterisierung des PCC Phänotyps in MCPH1-defizienten Zellen.....	80
Abbildung 3-24: Immobilisierung von Chk1 am Zentrosom resultiert in einer Anreicherung von PCC-Zellen nach MCPH1-Depletion.....	81
Abbildung 3-25: Test auf autonome Reporter-gen-Aktivierung durch GAL4BD-MCPH1.....	83
Abbildung 3-26: MCPH1 interagiert mit Chk1 im <i>Yeast-Two-Hybrid</i> -System.	84
Abbildung 3-27: Zentrosomale Lokalisation von CCDC13-FLAG und CCDC13-GFP.	87
Abbildung 3-28: Reduktion von zentrosomalem Chk1 und γ -Tubulin, nicht jedoch von PCNT, nach RNAi-vermittelter Depletion von CCDC13.	88
Abbildung 4-1: Vereinfachtes Modell zentrosomen-assoziiierter Prozesse, die den Eintritt in die Mitose über die Regulation des Cyclin B/Cdk1-Komplexes kontrollieren.	90
Abbildung 4-2: Modell zur zentrosomalen Rekrutierung von Chk1.	99
Abbildung 4-3: Potentielle Funktionen von MCPH1 in der Regulation zentrosomaler PCNT-Level.....	101
Abbildung 4-4: Potentielle aberrante Signalwege in MCPH1- und PCNT-defizienten Zellen.	106

8.3. Tabellenverzeichnis

Tabelle 2-1: Verwendete Stämme von <i>Escherichia coli</i>	21
Tabelle 2-2: Verwendete Zelllinien	21
Tabelle 2-3: Im <i>Yeast-Two-Hybrid-Screen</i> eingesetzte Hefestämme.....	22
Tabelle 2-4: Kommerziell erhältliche Expressionsvektoren und im Rahmen der Arbeit hergestellte Expressionskonstrukte	22
Tabelle 2-5: Oligonukleotide, die für die PCR-Amplifikationen verwendet wurden	23
Tabelle 2-6: Für die Transfektion von Säugetierzellen verwendete doppelsträngige siRNA- Oligonukleotide	24
Tabelle 2-7: Zusammenfassung der verwendete Primärantikörper.....	25
Tabelle 2-8: Eingesetzte Sekundärantikörper	26
Tabelle 2-9: Auflistung der verwendeten Laborgeräte	33
Tabelle 3-1: Intensitäten des zentrosomalen Chk1-Signals in Pixel ³	56
Tabelle 3-2: Intensitäten des zentrosomalen PCNT-Signals in Pixel ³	63
Tabelle 3-3: Intensitäten des zentrosomalen γ -Tubulin-Signals in Pixel ³	67
Tabelle 3-4: Im <i>Yeast-Two-Hybrid-Screen</i> identifizierte potentielle Interaktionspartner von MCPH1. ...	84

8.4. Veröffentlichungen

Originalarbeit

Tibelius, A., Marhold, J., Zentgraf, H., Heilig C.E., Neitzel, H., Ducommun, B., Rauch, A., Ho, A.D., Bartek, J. und Krämer, A. (2009). Microcephalin and Pericentrin regulate mitotic entry via centrosome-associated Chk1. *J Cell Biol* 185, 1149-1157

Kongreßbeiträge

Tibelius, A., Marhold, J., Heilig C.E., Neitzel, H., Ducommun, B., Rauch, A., Ho, A.D., Bartek, J. und Krämer, A. (2008). Microcephalin and Pericentrin regulate mitotic entry via centrosome-associated Chk1. EPFL Life Science Symposium "Cancer and the Cell Cycle". Lausanne, Schweiz, 2008. #99. [Posterbeitrag]

Tibelius, A., Marhold, J., Heilig C.E., Neitzel, H., Ducommun, B., Rauch, A., Ho, A.D., Bartek, J. und Krämer, A. (2008). Microcephalin and Pericentrin regulate mitotic entry via centrosome-associated Chk1. EMBO/EMBL Conference on Centrosomes and Spindle Pole Bodies. Heidelberg, 2008. [Posterbeitrag]

Der Lebenslauf ist in der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten.

Danksagung

Herrn Prof. Dr. med. Alwin Krämer danke ich für die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe und die Unterstützung bei der Durchführung und Anfertigung dieser Arbeit.

Ich möchte mich beim Herrn Prof. Dr. Klaus Hausmann bedanken, der diese Arbeit gegenüber dem Fachbereich Biologie, Chemie und Pharmazie der Freien Universität Berlin vertreten und das Fortkommen dieser Arbeit aufmerksam verfolgt hat.

Ein besonderer Dank gilt Herrn Dr. Joachim Marhold, der mir als fachlich überragend kompetenter Kollege und guter Freund stets mit Rat und Hilfe zur Seite stand.

Ich danke allen Mitgliedern der AG Krämer für die Unterstützung bei anfallenden Problemen und die gute Atmosphäre in der Arbeitsgruppe.

Prof. Dr. Hanswalter Zentgraf und seinem Team danke ich für die Zusammenarbeit bei der Herstellung des Antikörpers gegen MCPH1.

Nicht zuletzt möchte ich mich ganz besonders bei meiner Familie und meinem Freund Christoph bedanken. Ihnen ist diese Arbeit gewidmet.