

2 Material und Methoden

2.1 Geräte

2.1.1 Zentrifugen

Biofuge 15	Heraeus
Centrifuge 5417 R	Eppendorf
Minicentrifuge	Fisher Scientific
Megafuge 2.0	Heraeus
Kühlzentrifuge Varifuge RF	Heraeus
Zytozentrifuge Cytospin	Shandon Southern

2.1.2 Mikroskope

Axioskop-Fluoreszenz-Mikroskop inkl. Chilled CCD-Kamera	Zeiss
Axioskop-Mikroskop inkl. Chilled CCD-Kamera	Hamamatsu Photonics
Axiophot-Mikroskop inkl. Analog-Kamera	Zeiss
Invertoskop	Hamamatsu Photonics
	Zeiss
	Zeiss
	Zeiss

2.1.3 Elektrophorese und Westernblot

Electrophoresis Power Supply PS 3003	Gibco/BRL
Geltray, Elektrophoresekammer	Renner
UV-Transilluminator	UVP
X-Cell SureLock Elektrophoresekammer	Invitrogen
X-Cell II Blot Module	Invitrogen
Mini Trans-Blot	
Electrophoretic Transfer Cell	BioRAD

2.1.4 PCR

Mastercycler + Mastercycler gradient 7500 Real-Time PCR System	Eppendorf Applied Biosystems
---	---------------------------------

2.1.5 Sequenzierung

ABI Prism Genetic Analyzers 300/3100/377	Applied Biosystems
--	--------------------

2.1.6 Zellkultur

Lamin Flow Werkbank CA/REVK	Clean Air
Begasungsbrutschrank 6220	Heraeus

2.1.7 Sonstige Geräte

Ausstreichgerät ECT85	Toulemonde
Fluor Imager SI	Molecular Dynamics
Heizblock Thermostat 5320	Eppendorf
Incubator B15	Heraeus
Magnetrührer IKA-Combimag RCH	Jahnke&Kunkel

pH-Meter MP220	Mettler Todelo
Photometer Ultrospec 3000	Pharmacia Biotec
Pipetten	Gilson / Eppendorf
Polaroid CU 5 Kamera	Polaroid
Schüttelinkubator G25	Brunswick
Schütteltisch IKA-Vibrax-VXR	Jahnke&Kunkel
Schüttelwasserbad	Köttermann GFZ
Varioklav Dampfsterilisator	H+P Labortechnik
Vortex Vibrofix VF1	Jahnke&Kunkel
Waagen	Sartorius
Wärmeplatte	Medax
Wippschüttler Shaker DRS-12	neoLab

2.1.8 Software

Ikaros, Isis	Metasystems
Openlab	Improvisation
ABI Prism DNA Sequencing Software	Applied Biosystems
ABI PRISM® 3100 GeneScan®	
Analysis Software	Applied Biosystems
Clone-Suite Professional	Scientific & Educational Software Inc.

2.2 Verbrauchsmaterial und Reagenzien

2.2.1 Antikörper

Kommerziell erwerbbarer primäre Antikörper:

Spezifität	aus Spezies	Hersteller
Anti-Aurora B	Rabbit	Abcam
Anti-Cyclin B1	Mouse	Abcam
Anti-Fibrillarin	Mouse	Abcam
Anti-H3P-S28	Rabbit	Upstate
Anti-H3P-S10	Rabbit	Cell Signaling
Anti-H3P-S10-FITC	Rabbit	Cell Signaling
Anti-Lamin-B	Mouse	Oncogene
Anti- α -Tubulin	Mouse	Sigma
Anti- γ -Tubulin	Rabbit	Sigma
Anti-Topoisomerase II α	Mouse	TopoGen

Überlassene primäre Antikörper:

Spezifität	aus Spezies	überlassen von
CREST	H.sapiens	Alle überlassen von Dr. T. Hirano, CSHL, NY, USA
Anti-Cyclin A	Mouse	
Anti-hCAP-E	Rabbit	
Anti-hCAP-G	Rabbit	
Anti-hCAP-H	Rabbit	
Anti-hCAP-H2	Rabbit	
Anti-hCAP-H2-Biotin	Rabbit	
Anti-hCAP-G2	Rabbit	
Anti-hCAP-D3	Rabbit	
Anti-SMC3	Rabbit	
Anti-Pds5	Rabbit	
Anti-ISWI	Rabbit	
Anti-INCENP	Rabbit	

Sekundäre Antikörper, bzw. Detektoren:

Spezifität	aus Spezies	Hersteller
Anti-Mouse-TRITC	Goat	Sigma
Anti-Mouse-FITC	Goat	Oncogene
Anti-Mouse-HRP	Sheep	Amersham
Anti-Rabbit-TRITC	Donkey	Santa Cruz
Anti-Rabbit-FITC	Donkey	Santa Cruz
Anti-Rabbit-HRP	Donkey	Amersham
Avidin-TRITC		überlassen von Dr. T. Hirano, CSHL, NY, USA

2.2.2 Primer

Oligonukleotide wurden bei den Firmen BioTeZ, TIB Molbiol und biomers.net bezogen. Die exakten Sequenzen sind im Anhang dieser Arbeit aufgeführt.

2.2.3 siRNA Duplexe

siRNA-Duplexe wurden üblicherweise von den Firmen Qiagen und Dharmacon bezogen. Die exakten Sequenzen sind im Anhang dieser Arbeit aufgeführt.

2.2.4 Vektoren

S11IN	überlassen von Prof. D. Schindler, Würzburg
pSUPER.retro	OligoEngine
pGEM-T Easy-Vektor-System	Promega

2.2.5 Chemikalien und Reagenzien

Die üblichen, an dieser Stelle nicht aufgeführten Laborchemikalien und Reagenzien wurden in p.A. Qualität von den Herstellern Merck, neoLab, Roth und Sigma bezogen.

Colcemid	Gibco/BRL
Cyclosporin A	Novartis
Cytochalasin B	Sigma
DAPI	Serva
dATP, dCTP, dGTP, dTTP	Promega
FuGENE 6	Roche
Methotrexat	Lederle
Oligofectamin	Invitrogen
PCR-Puffer	Perkin Elmer
Phytohemagglutinin-L	Difco
RetroNectin	TaKaRa
Vectashield Antifading	Vector Laboratories

2.2.6 Längen und Größenstandards

GenScan 400HD [ROX Dye]	Applied Biosystems
DNA BioLadder 100	AGS
DNA BioLadder 1 kb	AGS
SeeBlue Plus2 Pre-stained Protein Standard	Invitrogen
SeeBlue Pre-Stained Protein Standard	Invitrogen
MagicMark XP Protein Standard	Invitrogen

2.2.7 Enzyme

Restriktionsenzyme	New England Biolabs
Calf Intestinal Phosphatase	New England Biolabs
Proteinase K	Boehringer Mannheim
RNase A	Boehringer Mannheim
AmpliTaq DNA-Polymerase	Applied Biosystems
AmpliTaq Gold DNA-Polymerase	Applied Biosystems
Trypsin/EDTA	Biochrom/ Gibco/BRL
M-MLV Reverse Transcriptase RNase H(-)	Promega
Easy A-High Fidelity Cloning Enzyme	Stratagene
LigaFast-Rapid Ligation System	Promega

2.2.8 Kits

ABI Prism BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit	Applied Biosystems
QiaPrep Spin Mini und Midi Kits	Qiagen
RNeasy RNA isolation Mini und Midi Kits	Qiagen
ABI PRISM® SNaPshot® Multiplex Kit	Applied Biosystems
QuikChange Site directed mutagenesis Kit	Stratagene

2.2.9 Säulen

Amicon Ultrafree DA	Millipore
Amicon Microcon-PCR Centrifugal Filter Devices	Millipore
DyeEx Spin Columns	Qiagen

2.2.10 Westernblot

NuPAGE 4-12% Bis-Tris-Gele	Invitrogen
Hybond P PVDF Membran	Amersham
Hyperfilm ECL	Amersham
ECL Detection System	Amersham
Advanced ECL Detection System	Amersham

2.2.11 Zellen

E.Coli:

JM109 competent cells	Promega
-----------------------	---------

Fibroblasten :

RetroPack PT67, amphotrope Verpackungszelllinie HeLa	Clonotech DZS
--	------------------

Eigene Zelllinien:

Fibroblasten:

LN9SV	Kontrollzelllinie, SV40 transformiert
Patient 1 SV	MCPH1 Patient, SV40 transformiert

Lymphoblastoide Zelllinien :

Patient 1, Patient 2, Patient 3,
Patient 4, Patient 5
und diverse Kontrollzelllinien

MCPH1 Patientenzelllinien, EBV transformiert

2.2.12 Zellkulturmedien

Amniomed
Dulbecco's Mod. Eagle Medium
Earles MEM
OptiMEM-Medium
RPMI 1640
FKS

Biochrom
Gibco/BRL
Biochrom
Gibco/BRL
Biochrom
Biochrom

2.2.13 Zellkulturmaterial

Sterile Einwegmaterialien: Pipetten, Zellkulturflaschen, Schnapp- und Schraubdeckelröhrchen, Petrischalen, Multiwell-Platten und Sterilfilter wurden von Falcon/Beckton-Dickinson sowie Nunc bezogen.

2.2.14 Standardpuffer, -Lösungen und -Medien

20x SSC (pH 7.0):	3 M NaCl, 0,3 M Trinatriumcitrat x 2 H ₂ O
Phosphatpuffer (0,025 M; pH 6.8):	22,26 g/l Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O, 17 g/l KH ₂ PO ₄
PBS (pH 7.4):	140 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 8 mM Na ₂ HPO ₄ , 1,4 mM KH ₂ PO ₄
TBS (pH 7.5):	20 mM Tris, 150 mM NaCl
10x TBE-Puffer (pH 8.3):	900 mM Tris-HCl, 900 mM Borsäure, 40 mM EDTA
TE-Puffer (pH 8.0):	10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA
LB-Medium:	5 g/l NaCl, 10 g/l Trypton, 5 g/l Hefeextrakt, pH 7.5
LB-Agar:	LB Medium inkl. 1,5% Agar (w/v)
SOC-Medium:	20 g/l Trypton, 5 g/l Hefeextrakt, 0,5 g/l NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl ₂ , Glucose 20 mM

2.2.15 Verbrauchsmaterialien

1,5 ml und 0,5 ml – Reaktionsgefäße	Eppendorf
Pipettenspitzen	Eppendorf
Objektträger	
und Deckgläschen (versch. Größen)	Menzel
Laborhandschuhe Peha-soft	Hartmann
Faltenfilter	Schleicher & Schuell
Polaroid Land Packfilme Typ 667	Polaroid
Vitro-Clud	Langenbrink
Zentrifugenröhrchen	Greiner/Falcon

2.2.16 Sonstiges

CEP-8, CEP-18 Zentromersonden	Vysis
SYBR GREEN PCR Master Mix	Applied Biosystems
Elektroporationsküvetten plus (4mm)	BTX Genetronix
Modified TAE-Buffer	Millipore

2.3 Molekularbiologische Methoden

2.3.1 DNA-Präparation

Zur DNA-Gewinnung aus peripherem Blut wurde zunächst eine Lyse der Erythrozyten im vierfachen Volumen Lysepuffer (10 mM Tris-HCl, 320 mM Saccharose, 5mM MgCl₂, 1% Triton-X100) durchgeführt. Zur Präparation genomischer DNA aus Fibroblasten und LCLs wurden diese dreimal mit PBS gewaschen. Die Zellen wurden in 400mM Tris-HCl, 60mM EDTA, 150mM NaCl, 1% SDS lysiert. Daraufhin wurde mit einer 5 M Na-Perchloratlösung deproteinisiert. Die DNA wurde mit Chloroform extrahiert und mit einem Volumen Isopropanol aus dem Überstand gefällt. Daraufhin wurde sie noch zweimal mit 70%-igem Ethanol gewaschen und in einem passenden Volumen TE-Puffer aufgenommen.

2.3.2 RNA-Präparation

RNA wurde mit Hilfe der RNeasy Midi bzw. Mini Kits von Qiagen nach den Vorgaben des Herstellers isoliert. Der Erfolg der Präparation wurde durch Gelelektrophorese auf einem denaturierenden Gel und durch Quantifizierung mittels UV Spektroskopie überprüft.

2.3.3 cDNA-Synthese

Die erste Strangsynthese wurde mit M-MLV Reverser Transcriptase RNase H (-) (Promega) und randomisierten Hexamerprimern (Promega) nach der Vorschrift des Herstellers durchgeführt. 0,5 µl - 1 µl der ersten Strangreaktion wurden für anschließende PCR-Amplifikationen eingesetzt.

2.3.4 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Genomische DNA von Patienten, Eltern und Kontrollen wurde entweder aus Blut (EDTA), Chorionzotten oder aus lymphoblastoiden Zelllinien nach der unter 2.3.1 aufgeführten Methode extrahiert. Die Gewinnung von cDNA wird in 2.3.3 beschrieben.

Für die Amplifikation von Abschnitten genomischer DNA, beispielsweise zur anschließenden Sequenzierung, SNP oder SSCP Analyse, wurde folgende Reaktion durchgeführt. Pro 25 µl Ansatz wurden 2,5 µl 10x PCR Puffer (inkl. 15 mM MgCl₂), 0,5 µl dNTPs (10mM), 1 µl Forward Primer (10 µM), 1 µl Reverse Primer (10 µM), 0,125 µl Taq-Polymerase (5 U/µl), 50

ng DNA eingesetzt und ad 25 µl mit H₂Od aufgefüllt. Die Reaktionen unterschieden sich nur in der Annealingtemperatur, die für die jeweiligen Primerpaare empirisch bestimmt wurde, sie lagen zwischen 50°C und 68°C sowie der Elongationszeit in Abhängigkeit von der Produktlänge (ca. 1 min / kbp Produktlänge). Nach einer initialen Denaturierung (95°C, 5 min) wurden 30 Zyklen zur Amplifikation durchgeführt (94°C – 30s, Annealingtemperatur – 30s, 72°C – 1 min / kb Produktlänge). Daran knüpfte eine abschließende Elongation von 10 min Dauer an.

Die Amplifikation von cDNA-Fragmenten erfolgte grundsätzlich auf die gleiche Weise. Es wurden 0,5 µl – 1 µl der ersten Strangsynthese als Template eingesetzt und gegebenenfalls die Zyklenzahl auf maximal 40 Zyklen erhöht. Plasmide wurden vor PCR-Reaktionen stark verdünnt und ca. 10 pg als Template eingesetzt. Die Zyklenzahl wurde in diesem Fall auf 20 – 25 Zyklen reduziert.

2.3.5 Single Strand conformational Polymorphism (SSCP) - Analyse

Durch SSCP-Analysen kann man Einzelbasensubstitutionen als Veränderungen der elektrophoretischen Mobilität im nativen Polyacrylamidgel detektieren. Unter nicht denaturierenden Bedingungen faltet sich einzelsträngige DNA in bestimmter, durch die Primärstruktur und Temperatur vorgegebener Weise. Diese Konformation wird durch intramolekulare Wechselwirkungen stabilisiert. Die Mutation einer einzigen Base kann also eine Änderung der Sekundärstruktur nach sich ziehen, welche die Laufeigenschaften des Fragments im Gel verändert. Dies wird bei der SSCP-Analyse ausgenutzt. Für eine SSCP-Analyse wird also das gewünschte DNA Fragment mittels PCR amplifiziert und durch Fluoreszenz-markierte Primer markiert. Dieses Fragment wird anschließend denaturiert, d.h. durch Erhitzen in die Einzelstränge aufgeteilt. Nach schneller Abkühlung auf Eis wird die Probe über eine nicht-denaturierende Polyacrylamidgelelektrophorese ausgewertet. Basenmutationen führen zu Veränderungen im Bandenmuster. Um während der gesamten Elektrophorese eine konstante, definierte Temperatur zu gewährleisten, sollte die Gelapparatur temperierbar sein. Die Banden werden über Fluoreszenzmarkierung sichtbar gemacht. 6 µl PCR-Produkt wurden mit 8,5 µl Denaturierungspuffer (95% Formamid, 0,025% Bromphenolblau, 0,025% Xylenecyanol, 0,02M EDTA) gemischt, für 5 min bei 94°C denaturiert und dann auf Eis gekühlt. Danach wurden die Proben auf 8 %ige Acrylamidgele aufgetragen. Die Laufzeit in TBE betrug bei 220V und 4°C 3h30 min. Die Gele wurden mit dem Fluor Imager SI (Molecular Dynamics) aufgenommen und dokumentiert.

2.3.6 Sequenzierung

Die Sequenzierung von PCR-Produkten und Plasmiden erfolgte nach der Didesoxy-Methode (Sanger *et al.*, 1977). Für die Sequenzierung wurde der ABI PRISM BigDye Terminator v3.0 Ready Reaction Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) verwendet. Die Durchführung erfolgte nach dem Protokoll des Herstellers mit sequenzspezifischen Primern. Die Analyse erfolgte auf ABI 377/310/3100 Genetic Analyzers (Applied Biosystems). Die Referenzsequenzen wurden aus der Reference Sequence Database (NCBI) (<http://www.ncbi.nih.gov/RefSeq/>) bezogen.

2.3.7 SNP (single nucleotide polymorphism)-Analyse

Detektierte Sequenzvariationen wurden auf Kontrollallelen unter anderem (siehe auch SSCP Analyse 2.3.6 und Sequenzierung 2.3.7) mit Hilfe des ABI PRISM SNaPshot Multiplex Kit und ABI PRISM 3100 GeneScan Analysis Software (Applied Biosystems) auf dem ABI 3100 Genetic Analyzer analysiert. Dabei wird ein die Sequenzvariation enthaltendes Fragment per PCR amplifiziert. Anschließend wird dieses PCR-Produkt als Template verwendet um spezifische Primer, die direkt vor der Mutationsstelle liegen, in einer Sequenzreaktion um nur ein Nukleotid zu verlängern. Dies wird durch ein Reaktionsgemisch, das ausschließlich Didesoxynukleotide enthält, ermöglicht. Die vier verschiedenen Nukleotide sind mit unterschiedlichen Fluoreszenzmarkern markiert. Das ermöglicht eine schnelle Genotypisierung mit hohem Durchsatz. für eine einzelne Position.

2.3.8 Mikrosatellitenanalyse

Mikrosatelliten sind tandemartig aufgebaute, hochpolymorphe DNA-Regionen, die von Allel zu Allel in der Zahl der Wiederholungsmotive variieren können. Die molekulargenetische Mikrosatellitenanalyse beruht auf dem Nachweis dieser hochpolymorphen Basen-Repeat-Regionen in der genomischen DNA mittels Fluoreszenz-PCR und automatisierter Fragmentlängenanalyse. Die Auswahl der Primer zur Amplifikation der Marker erfolgte über die UniSTS Datenbank (NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=unists>). Der Standardansatz für die Amplifikation von Mikrosatelliten entsprach im 15 µl Ansatz 1,5 µl 10x PCR Puffer (inkl. 15 mM MgCl₂), 0,3 µl dNTPs (10mM), 0,5 µl Forward Primer (5 µM, Fluoreszenz-markiert), 0,5 µl Reverse Primer (5 µM), 0,08 µl Taq-Polymerase (5 U/µl, Perkin Elmer), 1-5 ng DNA (genomisch). Die PCR-Bedingungen waren für fast alle Marker identisch. Nach einer initialen Denaturierung (94°C – 3 min) erfolgten 10 Zyklen einer *touchdown*-PCR (94°C – 5s, 63°C – 53°C – 5s, 72°C – 30s) und im Anschluss 25 Zyklen (94°C – 5s, 53°C – 5s,

72°C – 30s) und eine einmalige Elongation von 10 min bei 72°C. Der Erfolg der PCR wurde per Gelelektrophorese kontrolliert. Die Analyse erfolgte auf dem ABI 3100 Genetic Analyzer mit Hilfe der ABI PRISM 3100 GeneScan Analysis Software (Applied Biosystems) unter Verwendung des HD400-Rox Standards nach den Angaben des Herstellers.

2.3.9 Quantitative Real-Time PCR

Für Real-Time PCR Reaktionen wurden 1 µl cDNA als Template eingesetzt. PCRs wurden unter der Verwendung von SYBR GREEN PCR Master Mix (Applied Biosystems) und dem Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. 40 Zyklen mit Denaturierung bei 95°C für 15 Sekunden und ein kombinierter Annealing-/Elongationsschritt bei 60°C für 60 Sekunden wurden ausgeführt. HPRT-spezifische Primer wurden zur endogenen Kontrolle verwendet. Die relative Quantifizierung wurde nach der $\Delta\Delta C_t$ -Methode (Livak & Schmittgen, 2001) berechnet.

2.3.10 PCR-Klonierung

Die PCR-Klonierung erfolgte auf dem Prinzip der TA-Klonierung mit dem pGEM-T Easy System (Promega). PCR-Amplifikation erfolgte mit AmpliTaq Polymerase (Applied Biosystems). Ligiert wurde mit dem LigaFast Rapid DNA Ligation System (Promega) nach den Vorgaben des Herstellers.

2.3.11 Restriktionsverdau

Die Vektoren wurden mit den entsprechenden Restriktionsenzymen von New England Biolabs nach den Angaben des Herstellers verdaut. Die Aufreinigung der Fragmente erfolgte durch Elution aus einem Agarosegel (1% in modifiziertem TAE-Puffer (Millipore)) mit Amicon ultrafree DA Säulen (Millipore).

2.3.12 Ligation

Die Ligation der Fragmente in die entsprechenden Vektoren erfolgte mit LigaFast™ Rapid DNA Ligation System (Promega) nach den Vorgaben des Herstellers.

2.3.13 Transformation, Auswahl positiver Klone und Plasmidpräparation

Die Hälfte des Ligationsansatzes wurde nach den Angaben des Herstellers (Promega) für die chemische Transformation von JM109-Zellen (E.coli) verwendet. Die Auswahl positiver Klone erfolgte je nach Vektor über *lacZ*-vermittelte Blau-/Weißselektion oder über eine schnelle Lyse. Dazu wurde ein Teil der Klone in 25µl EDTA (25mM) resuspendiert. Nach Zugabe von 25 µl

Lyse-Lösung (0,2N NaOH, 0,5% SDS, 20% Saccharose), Vortexen und fünfminütiger Inkubation bei 70°C wurde für 10 min bei 14.000 rpm (Eppendorf Tischzentrifuge) zentrifugiert und schließlich 20 µl des Überstandes auf ein 1% Agarosegel aufgetragen und mit einer Kontrolle (Lysat von JM109 inkl. Vektor allein) verglichen. Klone die sich von der Kontrolle unterschieden, wurden ausgewählt und die Plasmide mit QIAprep Spin Mini- oder Midiprep Kit (Qiagen) präpariert .

Das Vorliegen eines Inserts mit der gewünschten Größe wurde durch Restriktionsverdau überprüft. Das Insert positiver Klone wurde sequenziert. Nur sequenzfehlerfreie Klone wurden für weitere Arbeiten verwendet.

2.3.14 Gerichtete Mutagenese

Gerichtete Mutagenese wurde mit dem QuickChange XL Site Directed Mutagenesis Kit (Stratagene) nach den Angaben des Herstellers durchgeführt.

2.3.15 Yeast-two-Hybrid-Screen (Y2H)

Das *Yeast-two-Hybrid*-System (Fields & Song, 1989) erlaubt die Identifikation von Protein-Protein-Interaktionen durch die Verwendung rekombinanter Transkriptionsfaktoren. Transkriptionsfaktoren sind durch eine DNA-bindende (BD) und eine transkriptionsaktivierende Domäne (AD) gekennzeichnet. Eine Transkription von einer an einen bestimmten Promotor gebundenen BD kann nur stattfinden, wenn sich die AD in dichter räumlicher Nähe befindet. Eine räumliche Trennung unterbindet diese Funktion. Liegen beide Domänen separat, aber jeweils fusioniert mit zu untersuchenden Proteinen vor, kann eine Transkriptionsaktivierung nur erfolgen, wenn die beiden zu untersuchenden Proteine miteinander interagieren und somit die beiden Domänen zueinander in räumliche Nähe bringen. In Kombination mit durch die induzierte Transkription exprimierten Reportergenen kann dieses Prinzip somit dazu genutzt werden, Protein-Protein-Interaktionen zu detektieren. Die Expression und eine mögliche Interaktion der beiden Fusions-(Hybrid-) Proteine findet in Hefen statt, daher die Bezeichnung *Yeast-two-Hybrid*. Man testet also ein Protein von Interesse (*bait*) gegen mögliche Interaktionspartner (*prey*).

Ein Screen, also die Untersuchung der Wechselwirkung des Proteins zu einer Vielzahl anderer Proteine (*library*) kann parallel und automatisiert im Rahmen eines Hochdurchsatzassays durchgeführt werden. Dies wurde am Max-Delbrück-Centrum, Berlin-Buch, durchgeführt (verantwortlich: Dr. Ulrich Stelzl, AG Wanker). Der Verlauf dieses Array-basierten Screens (den einzelnen, nicht redundanten Klonen der *library* ist eine genaue Position zugeordnet, positive

Klone sind somit direkt identifizierbar) soll im folgenden stark verkürzt dargestellt werden (siehe auch Stelz *et al.*, 2005).

Die Y2H-Plasmide (siehe 2.3.16) werden jeweils in Hefen eines unterschiedlichen Paarungstyps (L40ccua und L40cc α) eingeführt. Diese verwendeten Stämme sind auxotroph für die Aminosäuren Histidin, Uracil, Leucin und Tryptophan: L40ccua [MATa his3 Δ 200 trp1-901 leu2-3,112 LYS2::(*lexAop*)₄-HIS3 ura3::(*lexAop*)₈-lacZ ADE2::(*lexAop*)₈- URA3 GAL4 gal80 can1 cyh2], L40cc α [MAT α his3 Δ 200 trp1-910 leu2-3,112 ade2 LYS2::(*lexAop*)₄-HIS3 URA3::(*lexAop*)₈-lacZ GAL4 gal80 can1 cyh2]. Beide Stämme sind Derivative des 1997 veröffentlichten L40c-Stammes (Wanker *et al.*, 1997). Durch Verpaarung der Transformanten erhalten die Stämme über die Plasmide direkt (siehe Vektorkarten, Abbildung 8) die Fähigkeit zur Tryptophan- und Leucinbiosynthese zurück. Interaktion zwischen zwei Fusionsproteinen führt zur Transkriptionsaktivierung und Expression der einem LexA-Promotor nachgeschalteten Histidin und Uracil-Reporter. Selektion auf alle vier Reporter führt zur Identifikation von Protein-Protein-Interaktionen. Autoaktivierung wird zuvor ausgeschlossen. Für positive Klone wird der Prozess wiederholt (*backmating*). Klone die bei dieser Wiederholung nicht mehr positiv sind, werden von weiteren Untersuchungen ausgeschlossen. Ein zweites unabhängiges Reportersystem (LacZ) ermöglicht gegebenenfalls eine weitere Überprüfung positiver Klone. Analysiert wurde eine *library* mit ca. 5640 *prey*-Plasmiden. Davon entstammen 3589 nicht-redundante Klone einer Expressions-*library* aus humanem fötalen Hirn. Weitere 2051 *full-length* Klone wurden über einen „*GATEWAY recombinational approach*“ in die *prey*-Vektoren eingeführt (Stelzl *et al.*, 2005). Jeder einzelne Klon (*prey*-Vektoren) ist im 384-Well-Format direkt zuzuordnen und liegt zweifach vor. Transformation, Verpaarung und Ausplattierung erfolgen vollautomatisiert.

2.3.16 Klonierung der MCPH1-Fragmente in die Y2H-Vektoren

Die Bildung der Fusionsproteine [ProteinX-BD] sowie [ProteinY-AD] findet beim Y2H direkt in der Hefe statt. Die Fusionsprotein-kodierenden Vektoren [ProteinX-BD] sowie [ProteinY-AD] wurden durch Klonierung von MCPH1-Fragmenten in die von der AG Wanker zur Verfügung gestellten Vektoren hergestellt: pBTM117c (*bait*-Vektor inkl. BD) und pGAD426 (*prey*-Vektor inkl. AD). Die Vektoren sind in Abbildung 8 dargestellt, die ausgewählten MCPH1-Fragmente in Abbildung 25. Als Template wurde ein von Dr. Andrew Jackson (Leeds) zur Verfügung gestellter IMAGE cDNA-Klon des MCPH1-Gens verwendet.. Für die Durchführung des Screens wäre die Klonierung der MCPH1-Sequenzen in den *bait*-Vektor ausreichend gewesen. Die

zusätzliche Klonierung in den *prey*-Vektor ist Bedingung der Kooperationspartner und erfolgt, um deren cDNA-Bibliothek um MCPH1 bzw. dessen Fragmente zu erweitern.

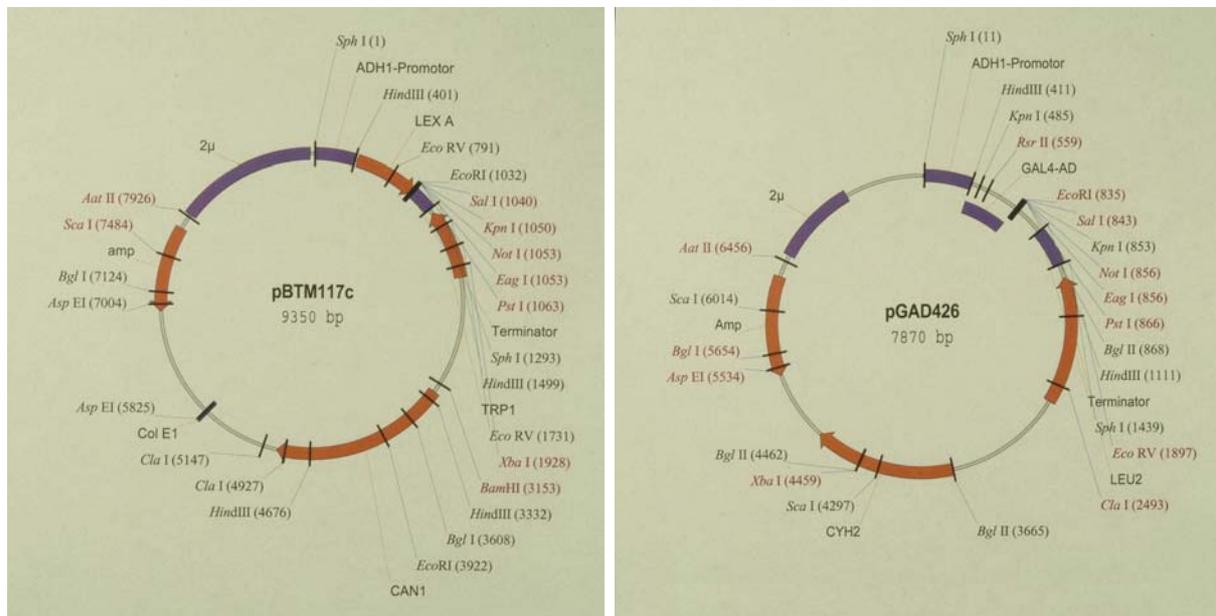


Abbildung 8 **Y2H Vektoren.** Der als Bait-Vektor fungierende pBTM117c (links) enthält als funktionelle Y2H-Elemente die Kodierungen für den konstitutiv aktiven ADH1-Promotor, die LexA-DNA-Bindungsdomäne sowie TRP1 für die Tryptophansynthese. Über eine *multiple cloning site* (MCS) hinter LexA kann die für das zu untersuchende Protein kodierende DNA-Sequenz kloniert werden. pGAD426 (rechts) kodiert als Prey-Vektor für den ADH1-Promotor, die GAL4-Aktivierungsdomäne sowie für LEU2 (Leucinsynthese). Die MCS folgt hier auf GAL4.

Die Klonierung der Genfragmente in die Y2H-Vektoren umfasste mehrere Schritte. Die MCPH1-Fragmente wurden mittels PCR amplifiziert und durch TA-Klonierung (siehe 2.3.10) in einen Zwischenvektor (pGEM-T Easy, Promega) eingefügt. Die zu den *multiple cloning sites* der Y2H-Vektoren passenden Schnittstellen (SalI, NotI) wurden über dementsprechend gewählte Primerüberhänge eingeführt. Nach dem Herausschneiden der Fragmente aus dem Zwischenvektor konnten diese dann in die Zielvektoren (pBTM117c, pGAD426) eingefügt werden. Die Fragmente wurden sowohl nach erfolgreicher PCR-Klonierung als auch nach der Umklonierung in die Y2H-Vektoren sequenziert, um Klone mit Sequenzfehlern auszuschließen. Die Durchführung von Umklonierung nach Restriktionsverdau wird in den Abschnitten 2.3.11 – 2.3.13 dargestellt.

2.4 Proteinanalysen

2.4.1 Herstellung der Proteinlysate

Die gewünschte Anzahl Zellen wurde abzentrifugiert und mit PBS gewaschen. Dann wurden die Zellen in einer Konzentration von 1000 Zellen / μ l (Fibroblasten), bzw 5000 Zellen / μ l (LCLs) in 1 x SDS Probenpuffer (60 mM Tris, pH 6.8, 1 % SDS, 10 % Glycerol, 0.01 %

Bromophenolblau und 0.1 M DTT) aufgenommen und durch Vortexen sowie pipettieren lysiert. Im Anschluss daran wurden die Lysate mit einem Ultraschallstab behandelt (10 Intervalle, mittlere Stärke).

2.4.2 SDS-Gelelektrophorese und Westernblot

Zur Probenvorbereitung wurden die Proteinlysate für 2 min bei 98°C denaturiert. Die Proteine wurden durch SDS-PAGE auf NuPage Novex 4-2% Bis-Tris-Gelen (Invitrogen) aufgetrennt. Der Laufpuffer enthielt 50mM MOPS, 50 mM Tris-Base, 0,1 % SDS, 1mM EDTA, pH 7,7. Die Proteine wurden für eine Stunde bei 100 V auf Hybond-P PVDF Membranen (Amersham) übertragen. Der Transferpuffer enthielt 25 mM Bicine, 25 mM Bis Tris, 1mM EDTA, pH 7,2. Die Membran wurde mit 5 % (w/v) Trockenmilch in TBS-T (20 mM Tris, pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.05 % Tween 20) geblockt. Die Inkubationen mit den ersten Antikörpern in den erforderlichen Konzentrationen erfolgten meist bei Raumtemperatur für eine Stunde in 1% BSA und 0.05 % Natriumazid in TBS-T. Gelegentlich wurde auch bei 4°C über Nacht inkubiert. α -Tubulin wurde als Ladekontrolle verwendet. Die Inkubation mit dem zweiten Antikörper erfolgte in der Blocking-Lösung für eine Stunde bei Raumtemperatur in den erforderlichen Konzentrationen. Die Blots wurden mit dem ECL Detection System (Amersham) entwickelt.

2.5 Zellbiologische Methoden

2.5.1 Zellkultur

2.5.1.1 Aktivierung von T-Lymphozyten

Zur Kultivierung von T-Lymphozyten wurden 0,5 ml heparinisiertes Vollblut zu 4,5 ml RPMI 1640 (PAA) inklusive 16 % FKS (fötales Kälberserum, Biochrom), 100 μ g/ml Penicillin und 3 μ g/ml Streptomycin und 2,4 mg Phytohemagglutinin-L gegeben und die Zellen vor Verwendung 72h bei 37°C, 5% CO₂ kultiviert.

2.5.1.2 Suspensionskulturen (LCLs)

Die Suspensionskulturen der LCLs (*lymphoblastoid cell lines*) wurden alle 7 Tage im Verhältnis 1:4 mit frischem RPMI (PAA) versetzt, das 15% FKS, 100 μ g/ml Penicillin und 3 μ g/ml Streptomycin enthielt. Um die Kulturen in die logarithmische Wachstumsphase zu bringen, wurden die Zellen 3 Tage vor dem durchzuführenden Experiment gefüttert und 24 Stunden vor dem Versuch in einer Konzentration von $3 \cdot 10^5$ Zellen / ml ausgesät.

2.5.1.3 Adhäsionskulturen (Fibroblasten)

Die Fibroblastenkulturen wurden in Dulbecco's MEM, welches 10 % FKS, 100µg/ml Penicillin und 3µg/ml Streptomycin enthielt, kultiviert. In einem Abstand von 3 Tagen wurde das Nährmedium gewechselt. Nach Erreichen der Konfluenz wurde das Medium vollständig abgesaugt, die Kulturen mit 2 ml Trypsin (Trypsin-EDTA in PBS) gespült und nach erneuter Zugabe von 2 ml Trypsin (37°C) 1 min im Brutschrank (37°C) inkubiert. Anschließend wurde das Ablösen der Zellen unter dem Invertmikroskop beurteilt. Die Trypsinierung wurde durch Zugabe von 8 ml Medium gestoppt und die Zellsuspension in neue Kulturflaschen aufgeteilt. Nach Zugabe von frischem Medium erfolgte zur Einstellung des pH-Wertes eine Inkubation für 2 h bei geöffneter Kulturflasche.

2.5.1.4 Anlage und Präparation von Chorionzottenkulturen

Für die Chorionzottenkurzzeitkultur wurden die Zotten über Nacht in Minimal Essential Medium mit Earle's Salzen und 20% FKS bei 37°C inkubiert. 1,5 Stunden vor der Aufarbeitung wurde die Kultur mit Colcemid versetzt. Dann wurde das Medium abgesaugt und für 15 min durch 1 % Na-Citrat-Lösung ersetzt. Daraufhin wurde zweimal für 10 min mit Carnoy's Fixativ (Methanol/Eisessig 3:1, v:v) fixiert. Danach wurde zu Rehydrierung eine absteigende Alkoholreihe durchlaufen (100%, 70%, 50% je 30s und H₂O für 30 s und 2min). Die rehydrierten Zotten wurden für drei Minuten in 60 % Essigsäure aufgenommen und dann mit einem Ausstreichgerät (Toulemonde) auf Objektträgern ausgestrichen.

Für die Anlage der Langzeitkultur wurden die Zotten in 2ml Trypsinlösung überführt und unter regelmäßigem Schütteln 60 min bei 37°C inkubiert. Danach wurden die Zellen abzentrifugiert, der Überstand verworfen und durch 2 ml Collagenase (40 U/ml) in Amniomed (Biochrom) ersetzt, gut gemischt und unter gelegentlichem Schütteln für 90 min bei 37°C inkubiert. Danach wurde zweimal in Minimal Essential Medium mit Earle's Salzen gewaschen und die Zellen schließlich in zwei Kulturen in Amniomed-Medium angelegt.

2.5.1.5 Transformation von B-Lymphozyten durch B95-8 EBV

Das zu den Herpesviren gehörende Epstein-Barr-Virus (EBV) hat die besondere Eigenschaft, menschliche B-Lymphozyten zu transformieren. Das Virus kann von der lymphoiden Krallenaffen-Zelllinie B95-8 isoliert und zur Transformation menschlicher Lymphozyten in vitro verwendet werden (Neitzel, 1986).

2.5.1.6 Kultivierung der lymphoiden Starterzelllinie B95-8 und Aufreinigung des Epstein-Barr-Virus-haltigen Mediums

Die B95-8 Zelllinie wurde in RPMI 1640 mit einem Zusatz von 20% FKS, 100 µg/ml Streptomycin und 100 I.E./ml Penicillin kultiviert. Die aus dem Überstand entnommene Suspension wurde 10 min bei 300 g zentrifugiert und zweimal durch einen 0,45 µm-Filter (Millipore) filtriert, um eventuell vorhandene Krallenaffenzellen zu entfernen. Das Filtrat ist bei 4°C mehrere Monate haltbar. Vor dem Gebrauch wurde das Filtrat im Verhältnis 1:1 (v:v) mit RPMI 1640 Medium versetzt.

2.5.1.7 Ficollseparation mononucleärer Lymphozyten aus einer Vollblutprobe

Eine heparinisierte Vollblutprobe wurde im Verhältnis 1:1 (v:v) mit RPMI 1640 ohne Zusätze verdünnt und auf ein Volumen Ficoll (Dichte 1,077, Seromed) überschichtet. Nach 40 min Zentrifugation bei 250 x g konnte der sichtbare Lymphozytenring isoliert und 3 x mit RPMI gewaschen werden.

2.5.1.8 Etablierung der lymphoblastoiden Zellkulturen (LCLs)

Die isolierten Lymphozyten wurden in 2-4 ml EBV/RPMI-Gemisch inklusive 1 µg/ml Cyclosporin A (Novartis) resuspendiert. Die Kulturen wurden in 25 cm² Zellkulturflaschen bei pH 6,8 und 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Einmal wöchentlich wurde die Hälfte des Überstands durch frisches RPMI/FKS/Cyclosporin ersetzt. Cyclosporin A inhibiert selektiv die T-Zell-Proliferation, die als Antwort auf die EBV-infizierten autologen B-Zellen entsteht. Nach 3-4 Wochen Kulturdauer wurde die Cyclosporinbehandlung abgesetzt.

2.5.1.9 Bestimmung der Zellzahl

Die Zellzahl wurde mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer unter dem Mikroskop bestimmt.

2.5.2 Chromosomenanalyse

2.5.2.1 Chromosomenpräparation

Zu Zellen, die sich in der logarithmischen Wachstumsphase befanden, wurde je nach Fragestellung für 30 bis 120 Minuten (Endkonzentration: 0,2µg/ml) gegeben, um somit eine Anreicherung von Mitosezellen im Metaphasestadium zu erhalten. Die Zellsuspension wurde bei ca. 200 x g für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen wurden in hypotoner KCl-Lösung (0,4%) resuspendiert und für 10 Minuten bei 37°C inkubiert. Im Anschluss an die folgende Zentrifugation wurde der Überstand erneut zum Großteil entfernt, das

Zellpellet wurde resuspendiert und 4 ml eiskaltes Fixativ (Methanol / Eisessig; 3:1; v:v) tropfenweise unter leichtem Schwenken zum Sediment gegeben.

Das Fixativ wurde zweimal gewechselt. Die Zellsuspension wurde bei Raumtemperatur auf eiskalte, feuchte und fettfreie Objektträger aufgetropft und getrocknet. Bis zur Färbung wurden die Präparate staubfrei, trocken und dunkel gelagert.

2.5.2.2 Hochauflösende Chromosomenpräparationen

20h - 21h vor der Chromosomenpräparation wurden 4 Tropfen Methotrexat (10 μ M, MTX) zu 5 ml Kultur gegeben. 4,5h vor der Aufarbeitung wurde mit 5ml RPMI gewaschen und durch 5 ml Medium inklusive 33 μ M Thymidin ersetzt, um den MTX induzierten Zellzyklusblock aufzuheben. Nach weiten 4h Inkubation bei 37°C wurde Colcemid (0,2 μ g) zugegeben und eine halbe Stunde später eine normale Chromosomenpräparation durchgeführt. GTG-Banden wurden wie in 2.5.2.4 beschrieben erzeugt.

2.5.2.3 Giemsa-Färbung

Die Präparate wurden ca. 15 min in 4 %iger Giemsa-Färbelösung (Azur-Eosin-Methylenblau, Merck) in Phosphatpuffer pH 6,8 (0,025 M) gefärbt. Anschließend wurden die Objektträger in H₂O_d gewaschen und luftgetrocknet. Nach erfolgter Beurteilung der Färbintensität unter dem Mikroskop wurden die Präparate mit Vitro-Clud (Langenbrink) und darüber mit Deckgläsern (76 X 26 mm) eingedeckt. Die Mikrophotographie erfolgte an einem AxioPhot (Zeiss) mit Durchlicht und Grünfilter auf Agfaortho 25 Professional Film.

2.5.2.4 GTG-Bänderung

Die Objektträger mit den Chromosomenpräparationen wurden über Nacht bei 60°C im Trockenschrank gealtert. Die Präparate wurden kurz bei 37°C mit 2,5 % phosphatgepufferter (pH 6,88) Trypsinlösung behandelt, gut mit H₂O_d gespült und mit 1,5 % Giemsa gefärbt. Die Zeiten für Trypsinierung und Färbung müssen jedes Mal neu bestimmt werden. Die Metaphasen wurden an einem Axioskop (Zeiss) mit CCD Kamera aufgenommen. Karyotypisierung erfolgte mit IKAROS Software (Metasystems).

2.5.2.5 Silberbanden (AgNOR-Färbung)

Chromosomenpräparate wurden mit einem Tropfen AgNO₃ Lösung (0,5g/ml) bestrichen und diese Lösung mit 2 Tropfen erwärmter (37°C) Gelatine (2 %) vermischt. Die Objektträger wurden für 2 min bei 60°C auf einer Wärmeplatte inkubiert, mit Aqua dest gespült, luftgetrocknet und kurz mit 2 % Giemsa in Phosphatpuffer (pH 6,8) gefärbt.

2.5.2.6 Bestrahlung und Bestimmung der Chromosomenbrüchigkeit

Ionisierende Bestrahlung wurde mit einer Röntgenstrahlenquelle (Muller MG 150, $U_a = 100$ kV, $I = 10$ mA, Filter 0,3 mm Ni, Dosisrate: 2,1 Gy/min) durchgeführt. Zum Ausschluss eines Nijmegen-Breakage-Syndroms wurden die Kulturen 6h vor Aufarbeitung verschiedenen Dosen ionisierender Strahlung ausgesetzt (0; 0,5; 1,0; 2,0 Gy). Es wurden jeweils 50 Metaphasen analysiert und die Anzahl der Brüche pro Zelle bestimmt.

2.5.2.7 Replikationsfärbung: Schwesterchromatidaustausche

Die Zellen wurden für 72h mit 50 μ M BrdU kultiviert. Nach zweistündiger Inkubation mit Colcemid erfolgte eine normale Chromosomenpräparation. Die luftgetrockneten Präparate wurden für 20 min mit Hoechst 33258 (1 μ g/ml) gefärbt und danach mit Wasser gespült. Danach wurden die Präparate unter PBS für 10 min bei 60°C und 15 cm Abstand mit UV-Licht bestrahlt (Philips 20/W08F20T 12BLB). Daraufhin wurden die Präparate unter fließendem Wasser gespült und für 4 min mit 2% Giemsa gefärbt.

2.5.2.8 Messung der Chromosomenlängen

Es wurden Giemsa-gefärbte Chromosomenpräparationen aus aktivierten T-Lymphozyten nach zweistündiger Inkubation mit Colcemid verwendet. Die Metaphasen wurden mit einer gekühlten CCD-Kamera aufgenommen und die Längen der Chromosomen 2 und 3 wurden mit dem Längenmesswerkzeug aus der ISIS Software (Metasystems) bestimmt.

2.5.2.9 Kernpräparationen für PLC Assay

Hierzu wurden Standard-Chromosomenpräparationen ohne Colcemidbehandlung hergestellt. Die Präparate wurden mit Giemsa oder Orcein-Essigsäure gefärbt und der Anteil der Prophase-ähnlichen Zellen unter dem Mikroskop bestimmt. In einigen Fällen wurden Paraformaldehyd-fixierte, DAPI-gefärbte Präparate mit dem Fluoreszenzmikroskop ausgewertet. Die Präparate wurden zur Auswertung grundsätzlich verschlüsselt.

2.5.2.10 Herstellung binukleärer Zellen durch Cytochalasin B Behandlung

Zellkulturen wurden für die gewünschte Zeit mit 6 μ g/ml Cytochalasin B im entsprechenden Zellkulturmedium kultiviert. Nach zweiminütiger Inkubation in 60mM KCl wurden die Zellen fixiert und es erfolgte eine Standardchromosomenpräparation. Beim Auftropfen der Präparate wurde der Methanolanteil im Fixativ variiert, um das Zytoplasma zu erhalten und somit die Identifikation der binukleären Zellen zu erleichtern.

2.5.2.11 Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH)

Aus 44h mit Cytochalasin B behandelten Lymphozytenkulturen wurden zytogenetische Präparate hergestellt, wie in 2.5.2.1 beschrieben. Die Präparate wurden zunächst über eine absteigende Alkoholreihe (100%, 70%, 50%, 30% Ethanol, je eine Minute) rehydriert. Daraufhin eine Minute in 0,1X SSC-Puffer (150 mM NaCl, 15mM Na-Citrat-Dihydrat) bei Raumtemperatur inkubiert, 30 min bei 70°C in 2X SSC denaturiert: Die Präparate wurden auf 37°C abgekühlt, eine Minute mit 0,1X SSC behandelt und mit 0,07 N NaOH eine weitere Minute denaturiert. Daraufhin wurden die Objektträger je eine Minute bei 4°C mit 0,1X SSC und 2X SSC inkubiert. Danach wurden die Präparate über eine aufsteigende Alkoholreihe (s.o) entwässert und 10 Minuten auf der Wärmeplatte getrocknet.

Die Sonden wurden nach den Angaben des Herstellers präpariert und über Nacht bei 37°C unter verschlossenen Deckgläschen hybridisiert. Gewaschen wurde für zwei Minuten bei 73°C in 0.4X SSC/0.3%NP-40 und eine Minute in 2X SSC/0.1% NP-40 bei Raumtemperatur. Die Zellkerne wurden mit 1µg/ml DAPI für 10 min gefärbt, zweimal mit Aqua dest gespült und luftgetrocknet. Daraufhin wurden die Objektträger mit Vectashield Mounting Medium (Vector Laboratories) eingedeckelt und unter dem Fluoreszenzmikroskop (Axioskop, Zeiss) analysiert. Dokumentation erfolgte mit ISIS Software (Metasystems) mit einer gekühlten CCD-Kamera.

2.5.2.12 Immunfluoreszenz

Fibroblasten wurden auf sterilen Deckgläschen kultiviert. Die Zellen wurden nach den Erfordernissen des jeweiligen Antikörpers entweder mit 100% eiskaltem Methanol für 10 min oder mit 2 % Paraformaldehyd (PFA) in PBS fixiert. Wenn möglich, wurde eine Fixierung in PFA vorgezogen, da diese Chromatinstrukturen besser erhält als Methanol. Falls für die Antigen-Erreichbarkeit erforderlich (axiale Färbung mit Condensin- und Topoisomerase IIa-Antikörpern) wurden die Zellen vor Fixierung für 30 min mit hypotoner KCl-Lösung (60mM) behandelt. Wenn dies nicht notwendig war, wurde auf die Behandlung verzichtet, da sich auch die hypotone Behandlung nachteilig auf die Chromatinstruktur auswirkt. Nach der Fixierung wurden die Präparate zweimal mit PBS gespült und für fünf Minuten mit 0,5 % Triton-X100/PBS auf Eis permeabilisiert. Für Condensin II Antikörper wurden die fixierten Zellen für 10 min mit 0,5 % Triton-X100/PBS behandelt, um nukleare nicht an das Chromatin gebundene Proteine zu extrahieren. In einigen Fällen wurde eine Extraktion mit 0,1 % Triton-X100/PBS für ein bis zwei Minuten vor der Fixierung durchgeführt. Nach der Permeabilisierung wurden die Präparate zweimal mit PBS gespült und bei Raumtemperatur mit 3 % BSA/PBS (*bovine serum albumin*) geblockt. Nach einer Stunde wurde der gewünschte Antikörper in der entsprechenden

Konzentration in 3 % BSA/PBS zugegeben und für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde fünfmal mit PBS gespült und der entsprechende zweite Antikörper für eine Stunde in Blockinglösung auf das Präparat gegeben. Schließlich wurde dreimal mit PBS gespült, die DNA für 5 min mit DAPI (1µg/ml) gegengefärbt und noch dreimal gespült. Die Deckgläschen wurden mit einem Tropfen Vectashield auf Objektträger aufgebracht und mit Nagellack verschlossen. Die Analyse erfolgte an einem Axioskop (Zeiss) unter Verwendung von ISIS-Software (Metasystems) oder Openlab (Improvision).

Bei Doppelinkubationen wurden die Antikörper falls sie aus verschiedenen Spezies stammten gemeinsam aufgetragen. Für Doppelinkubationen von Condensin II Antikörpern mit anderen Antikörpern aus Kaninchen wurde biotinylierter hCAP-H2 Antikörper verwendet. Die Inkubation erfolgte in diesem Fall sequentiell. Zunächst wurde der gewöhnliche Antikörper aufgetragen und mit dem entsprechenden zweiten Antikörper detektiert. Danach wurde für eine Stunde mit 1mg/ml Rabbit-IgG geblockt. Daraufhin erfolgte die Inkubation mit dem biotinylierten hCAP-H2 und Detektion mit an Avidin konjugierten Fluoreszenzfarbstoffen.

Die Detektion der chromosomalen Achsen an Metaphase-Spreitungen wurde zusätzlich auch an Cytospin-Präparaten durchgeführt. Dazu wurden die Zellen trypsiniert und für 10 min bei 1000 rpm in einer Zytozentrifuge (Shandon Southern) auf Deckgläschen zentrifugiert. Danach wurde sofort fixiert und die weitere Behandlung entsprach der oben dargestellten Methode.

2.5.3 RNA Interferenz (RNAi)

Diese Technologie nutzt einen natürlich vorkommenden Prozess posttranskriptionaler Genregulation (*post-transcriptional gene silencing*). Dabei sorgt doppelsträngige RNA für eine Suppression ihrer homologen Gene durch die Erkennung der entsprechenden mRNA. Dies führt schließlich zum Schneiden dieser mRNA oder translationaler Repression. Erstmals im Bereich der Pflanzenzüchtung beobachtet und als Co-Suppression beschrieben, folgten Veröffentlichungen über diesen Prozess in einer großen Anzahl an Spezies (z.B. (Fire *et al*, 1998; Elbashir *et al*, 2001; Ullu *et al*, 2004)). RNA Silencing wurde zunächst als antiviraler Mechanismus erkannt (Waterhouse *et al*, 2001). Es zeigte sich aber schon bald, dass dieser Prozess ein generelles Konzept bei der Genregulation darstellt, auch über translationale Kontrolle und Chromatinmodifikationen. Die genauen Mechanismen sind in den Arbeiten von Meister und Tuschl, 2004 und Ambros, 2004 zusammengefasst. Die RNA Interferenz hat in den letzten Jahren eine große Bedeutung für die Analyse von Genfunktionen erlangt, da mit Hilfe dieser Technik eine spezifische, zelluläre Dezimierung bestimmter Proteine sehr leicht möglich ist. Dazu schleust man synthetisch hergestellte, für eine bestimmte mRNA spezifische siRNAs

(*small interfering RNAs*) in kultivierte Zellen ein. Dies führt zu einem Abbau (*knockdown*) dieser mRNA und folglich zur Reduzierung der Menge des entsprechenden Proteins. Die Validierung der auf diese Weise gewonnenen Daten sollte jedoch sehr sorgfältig vorgenommen werden, um „off-target“- , Sequenzvariations- und Konzentrationseffekte auszuschließen. Eine Zusammenfassung möglicher Fehlerquellen bei Experimenten mit RNAi und Vorschläge für gute Laborpraxis in dieser Hinsicht findet sich bei Huppi *et al*, 2005.

Für Experimente, die mit einem Fluoreszenzmikroskop ausgewertet wurden, wurden 24h vor der Transfektion je nach Zelllinie 25.000 – 60.000 Zellen/Well auf Poly-L-Lysin beschichteten Deckgläschen in 24-Wellplatten ausgesät. Für Experimente, die eine klassische Chromosomenaufarbeitung, eine Zellzyklusanalyse mittels Durchflusszytometrie, bzw. die Herstellung von Proteinlysaten oder RNA erforderten, wurde der 4-fache Ansatz in 6-Well-Platten durchgeführt. Die Transfektion erfolgte für alle Zelltypen mit Oligofectamin (Invitrogen) nach den Vorgaben des Herstellers für HeLa-Zellen. In den meisten Fällen wurde jedoch 24h nach der ersten Transfektion eine zusätzliche zweite durchgeführt. Die Analysen erfolgten meist 24h nach dem zweiten Transfektionszyklus, folglich 48h nach der ersten Transfektion. Zur Kontrolle wurde ein Ansatz ohne siRNA-Duplexe sowie mit einer „non-silencing“-siRNA oder einer Vergleichs-siRNA durchgeführt. Der Erfolg des *knockdowns* wurde über den zellulären Phänotyp, quantitative PCR, bzw. Westernblot beurteilt.

2.5.4 Durchflusszytometrie

Zur Analyse der Zellzyklusverteilungen wurden lebende Zellen bei 37°C für 30 min mit Hoechst 33342 (20µg/ml) inkubiert und direkt vor der Analyse auf einem BD-LSR (BF Bioscience) mit Propidiumiodid gegengefärbt. Die Zellzyklusverteilungen wurden mit der MCYCLE Software (Phoenix Flow Systems) berechnet.

2.5.5 Retroviraler Gentransfer

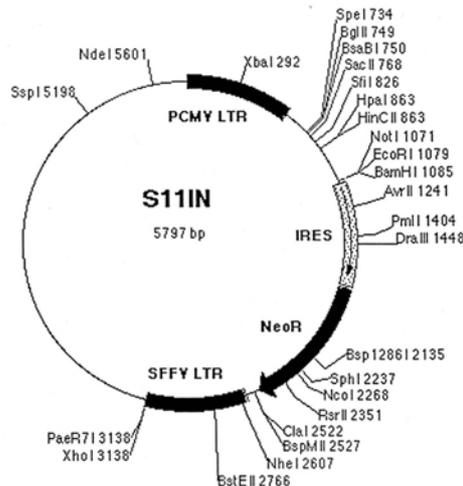


Abbildung 9 **Vektorkarte S11IN**. Der Vektor enthält ein IRES-Element, das die bicistronische Expression des in die Multiple Cloning Site eingeführten Gens mit der G418-Resistenz garantiert.

Die Klonierung in den von Prof. Dr. Schindler (Würzburg) zur Verfügung gestellten retroviralen Vektor S11IN erfolgte aus einem pGEM®-T easy Vektor (Promega), der die komplette cDNA des MCPH1-Gens enthielt. Das MCPH1-Insert wurde mit EcoRI ausgeschnitten und ungerichtet in den retroviralen Vektor (siehe Abbildung 9) kloniert. Positive Klone wurden über eine schnelle Lyse (2.3.13) identifiziert. Die Richtung wurde über Sequenzierung bestimmt. Das Insert jeweils eines Forward- und Reverse-Klons wurde durchgängig sequenziert. In den Forward-Klon wurde alternativ durch gerichtete Mutagenese (2.3.14) eine Verstärkung des Kozak-Signals eingeführt: -3T>A (Kozak, 1999). Diese Vektoren sowie der Vektor allein wurden durch Elektroporation (2.5.5.1) in die Verpackungszelllinie PT67 eingeführt. Schließlich wurden die Zielzellen mit dem viralen Überstand transduziert (2.5.5.2). Die Selektion erfolgte mit 0,5 mg/ml G418 (Roche).

2.5.5.1 Elektroporation der Verpackungszelllinie PT67

Die amphotrope Verpackungszelllinie Retropack™ PT67 (Clontech) wurde mit den retroviralen Vektoren für die funktionelle Komplementation transfektiert. Dabei wurden je 10^6 Zellen zweimal mit 10 ml DMEM ohne Serum und ohne Antibiotika gewaschen. Das Pellet wurde in 800 µl DMEM resuspendiert und nach 10 minütiger Inkubation auf Eis mit 10 µg Vektor in einer eisgekühlten 4 mm Elektroporationsküvette (BTX) versetzt. Die Transfektion erfolgte bei 280 V und bei 500 µF. Die Zellen wurden in Antibiotika-freiem Medium (DMEM, 10 % FKS) ausplattiert. Nach 48 h begann die Selektion mit 0,5 mg/ml G418 (Roche). Zur Kontrolle wurde

eine weitere Kultur von PT67 ohne die entsprechenden Vektoren selektioniert. Nach ca. einer Woche gab es keine überlebenden Zellen in dieser Kontrolle.

2.5.5.2 Retrovirale Transduktion

Der Überstand der Verpackungszelllinie wurde zweimal für 10 min bei 200 g zentrifugiert. Danach wurde der Überstand jeweils in ein neues steriles Zentrifugenröhrchen überführt. Dieser gesäuberte Virusüberstand wurde schließlich noch durch einen 0,45 µm Filter filtriert. Die Transduktion erfolgte in 6-Well-Platten. Für die Transduktion von Suspensionskulturen (LCLs) waren diese zuvor über Nacht bei 4°C mit dem Fibronektinfragment (Retronektin, TaKaRa) beschichtet worden (2µg/ml in PBS). Es erfolgte dann ein *Preloading* mit dem Virusüberstand. Das Retronektin wurde durch das gleiche Volumen Virusüberstand ersetzt und eine halbe Stunde bei 37°C inkubiert, dieser Vorgang wurde viermal wiederholt. Dann wurden die Zielzellen in einem möglichst kleinen Volumen (ca. 100 µl) in einer Konzentration von 100.000 Zellen/cm² (LCLs), bzw. 100.000 Zellen/Well (Fibroblasten, ohne Retronektinbeschichtung) in einem möglichst großen Volumen Virusüberstand (10ml) ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Nach 12h wurde der Überstand durch frisches Medium ersetzt und nach weiteren 12h wieder mit Virusüberstand versetzt. Nach 12h wurde der Überstand noch einmal gegen frisches Medium ausgetauscht und 48h später begann die Selektion mit 0,5 mg/ml G418. Die Fibroblasten wurden gegebenenfalls vor der Konfluenz geteilt.