

## 5 Zusammenfassung

### 5.1 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde der Nachweis geführt, dass die erste beim Menschen beschriebene Chromosomenkondensationsstörung auf Mutationen im MCPH1-Gen beruht. Die Patienten sind klinisch durch ausgeprägte Mikrozephalie und mentale Retardierung charakterisiert. Proliferierende Gewebe der Patienten weisen einen zellulären Phänotyp mit einem erhöhten Anteil Prophase-ähnlicher Zellen von bis zu 20% auf. Dieser Defekt beruht auf einer vorzeitigen Chromosomenkondensation in der G2 Phase des Zellzyklus und, wie im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden konnte, auf einer verzögerten postmitotischen Dekondensation in der G1 Phase. Das MCPH1-Gen kodiert für das Protein Microcephalin. Dieses enthält drei BRCT (BRCA1 C-terminus)-Domänen und ein nukleares Lokalisationssignal. Durch RNA Interferenz gegen Microcephalin-mRNA in humanen Kontrollfibroblasten, HeLa-Zellen und Mausfibroblasten konnte der für die Patienten beschriebene zelluläre Phänotyp imitiert und somit gezeigt werden, dass der Funktionsverlust von Microcephalin auch ursächlich für die Chromosomenkondensationsstörung ist. Die Analysen des Verhaltens lymphoblastoider Zellkulturen der Patienten nach ionisierender Bestrahlung zeigten, dass es bei diesen nicht zum Verlust des DNA-Schadenskontrollpunktes kommt, sondern der Zellzyklus am G2/M-Übergang vor dem Eintritt in die Mitose arretiert wird. Der Metaphaseindex fällt bei Patienten und Kontrollen bereits nach einer Stunde gleichermaßen auf annähernd null. Dies steht im Widerspruch zu Veröffentlichungen, die berichten, dass RNA Interferenz gegen Microcephalin zu einem Verlust eben dieses Kontrollpunktes führt. Die physiologisch normale Reaktion nach DNA-Schädigung, nämlich eine Akkumulation von Zellen am G2/M-Übergang, spiegelt sich bei den Patientenzellen auch in einer deutlichen Erhöhung des Anteils Prophase-ähnlicher Zellen nach Bestrahlung wieder. Dieser Effekt kann zur Differenzialdiagnose bei Patienten mit Mikrozephalie eingesetzt werden. Die Beschreibung des einzigartigen zellulären Phänotyps in Kombination mit der Aufklärung des Basisdefektes ermöglichte auch die Diagnosestellung bei einem Patienten mit sehr mildem klinischen und zellulären Phänotyp. Dieser Patient weist im Gegensatz zu allen anderen bisher diagnostizierten Patienten keine trunkierende Mutationen sondern eine *missense*-Mutation (Thr27Arg) in der ersten BRCT-Domäne von Microcephalin auf. Die klinische Symptomatik dieses Patienten entspricht nicht den Einschlusskriterien für die klinische Diagnose von autosomal rezessiver primärer Mikrozephalie (MCPH). Daher erfordert dieser Befund eine Überarbeitung und Erweiterung der Definition der klinischen Symptomatik für MCPH.

Der durch MCPH1-Defizienz ausgelöste Chromosomenkondensationsdefekt wird durch eine Fehlregulation des Condensin II Komplexes vermittelt und ist unabhängig von Condensin I. Es wurde nachgewiesen, dass der Anteil Prophase-ähnlicher Zellen durch RNA Interferenz gegen Untereinheiten des Condensin II Komplexes - jedoch nicht gegen Condensin I-spezifische Untereinheiten - in Patientenzellen deutlich reduziert wird. Da dies, wie mit Zellzyklusphasenspezifischen Markern gezeigt wurde, sowohl aus einer Abnahme von Zellen mit kondensiertem Chromatin in der G2-Phase als auch der G1-Phase des Zellzyklus resultiert, wurde damit außerdem zum ersten Mal eine Funktion von Condensin II in der Chromosomendekondensation demonstriert. Die Ergebnisse der RNAi-Experimente sind im Einklang mit den Resultaten aus Immunfluoreszenzanalysen mit Antikörpern gegen die Condensinkomplexe. Condensin II ist im Gegensatz zu Condensin I zum Zeitpunkt der fehlregulierten Chromosomenkondensation nuklear und bindet vorzeitig an die zentrale Chromatidachse.

## 5.2 Summary

In the presented dissertation it was demonstrated that the first chromosome condensation disorder described in human is caused by mutations in the MCPH1 gene. Patients are characterized by pronounced microcephaly and mental retardation. Proliferating tissues of the patients display a cellular phenotype with an enhanced fraction of prophase-like cells of up to 20 %. The defect is due to premature chromosome condensation in the G2 phase of the cell cycle and, as shown here, due to a delayed decondensation in G1 phase. MCPH1 encodes microcephalin, a protein containing three BRCT (BRCA1 C-terminus)-domains and a nuclear localization signal. The specific cellular phenotype can be reproduced by RNA interference against microcephalin-mRNA in human control fibroblasts, HeLa cells, and mouse fibroblasts, demonstrating that the functional loss of microcephalin is the underlying defect causing the misregulation of chromosome condensation. Analyses of the cell cycle behaviour of lymphoblastoid cell lines of the patients after ionizing irradiation revealed that DNA damage checkpoint control is not disturbed, but rather the cell cycle is arrested at the G2/M transition preceding mitosis. One hour after irradiation the metaphase index drops to nearly zero in both patient and control cell lines. This is in contrast to publications reporting a loss of this particular checkpoint control after RNA interference against microcephalin. The observed normal physiologic reaction of accumulation of cells at G2/M transition following DNA damage is reflected in the patient cells by a distinct increase of the proportion of prophase-like cells - an effect that can be used for differential diagnosis of patients with microcephaly. The description of the unique cellular phenotype in combination with the definition of the underlying mutation

lead to the diagnosis of a patient with an extraordinarily mild clinical and cellular phenotype. This patient has a missense mutation (Thr27Arg) in the first BRCT domain of microcephalin, in contrast to the truncating mutations in all other patients published so far. The clinical symptoms of this patient do not correspond to the criteria hitherto used for diagnosis of autosomal recessive microcephaly (MCPH). Therefore, these findings demand a revision and extension of the definition of the symptomatic complex of MCPH.

The condensation defect provoked by microcephalin deficiency is mediated by misregulation of the condensin II complex but is independent of condensin I. It could be demonstrated that the fraction of prophase-like cells can be markedly reduced by RNA interference against condensin II subunits, but not by silencing of condensin I specific subunits. As shown using cell cycle phase specific markers, this is due to a decrease of cells displaying condensed chromatin in both G2- and G1-phase of the cell cycle, demonstrating for the first time a function of condensin II in the decondensation process. The results of the RNAi experiments are in accordance with the findings of immunofluorescence analyses with antibodies against the condensin complexes. Unlike condensin I, condensin II stays in the nucleus of the prophase-like cells and binds prematurely to the central chromatid axis.