

1 Einleitung

Die vorliegende Dissertation befasst sich mit der ersten kongenitalen Zellzyklusstörung beim Menschen, die in das elementare Geschehen der Chromosomenkondensation eingreift. Die Zellen der Patienten sind durch eine auffällige Fehlregulation der Chromosomenkondensation in proliferierenden Zellen gekennzeichnet. Logarithmisch wachsende Kulturen weisen einen Anteil von 10-15% Prophase-ähnlicher Zellen auf, im Gegensatz zu ca. 1-2% bei unauffälligen Kontrollpersonen. Klinisch liegt eine deutliche Mikrozephalie und mentale Retardierung vor. Diese Zellzyklusmutante und der klinische Phänotyp wurden erstmals im Jahr 2002 von uns beschrieben und als PCC Syndrom bezeichnet, weil die Zellen vorzeitig in die Chromosomenkondensation in der frühen G₂-Phase eintreten (PCC = premature chromosome condensation) (Neitzel *et al.*, 2002). Im folgenden soll zunächst eine Übersicht über die fundamentalen Prozesse des Zellzyklus und der Zellzyklusregulation gegeben werden, da dies Voraussetzung für das Verständnis der aberranten Chromosomenkondensation bei der untersuchten Zellzyklusmutante ist. Außerdem soll auf die derzeit bekannten Komponenten, die in die Chromosomenkondensation einbezogen sind, eingegangen werden, wobei diese Übersicht keineswegs vollständig sein kann, da dies den Rahmen der Arbeit sprengen würde.

1.1 Der Zellzyklus und Zellzykluskontrolle

"Um (...) eine genaue Teilung bis in die kleinsten Einheiten zu ermöglichen, hat sich die Fortpflanzung der Zelle im Lauf der Entwicklung zu einem Naturschauspiel herausgebildet, von dem man ohne Übertreibung sagen kann, dass es in der ganzen uns bekannten Welt nicht seinesgleichen hat. Vergebens wird man das All nach Raum und Zeit durchschweifen, um eine Naturerscheinung zu entdecken, die in ähnlicher Art Schönheit und Geheimnis, Gesetzmäßigkeit und bewegte Dramatik vereinigt."

aus Dr. Fritz Kahn: "Die Zelle"

Charakteristisches Kennzeichen proliferierender Zellen ist das Zellwachstum und die Zellteilung. Der gesamte Zellzyklus setzt sich aus der Interphase sowie der Kern- und der Zellteilung (Mitose, bzw. Zytokinese) zusammen. Der gesamte Ablauf der Mitose dauert etwa eine Stunde. Die Interphase hingegen ist sehr viel länger und variiert in dieser Hinsicht auch erheblich zwischen verschiedenen Geweben. Sie wird in drei Phasen unterteilt: die S Phase (S von Synthese), in der die Verdoppelung des genetischen Materials stattfindet, die G₁ Phase (G vom engl. "gap", Lücke), dem Zeitabschnitt vom Ende der Mitose bis zu Beginn der S-Phase, sowie der G₂-Phase, dem Abschnitt zwischen Ende der S-Phase und Beginn der Mitose.

In G1 findet die Replikation der Zellorganellen und die Histonsynthese statt. Am Restriktionspunkt wird entschieden, ob die Zelle den Zellzyklus fortsetzt oder in die Ruhephase (G0) eintritt. In G2 werden die notwendigen Mitose-spezifischen Proteine synthetisiert.

Der Ablauf des Zellzyklus kann in jeder Phase verlangsamt oder ganz blockiert werden, wenn beispielsweise eine Schädigung der DNA vorliegt. Auch wenn die Spindelfasern nicht korrekt an den Kinetochoren der Chromosomen befestigt sind kann die Zelle in der Metapase arretiert werden. Hierfür sind genetisch gesteuerte Kontrollprozesse verantwortlich, die die Integrität des Erbgutes "checken". 1988 wurde hierfür der etwas missverständliche Begriff der "Checkpoint-Kontrolle" eingeführt. Tatsächlich handelt sich um komplexe Signalwege, die die Arretierung des Zellzyklus bewirken, bis der Schaden behoben ist und eng mit den molekularen Prozessen gekoppelt sind, die für die Regulation des Zellzyklus und die der DNA-Reparatur verantwortlich sind, Übersicht bei Nurse, 1997 und Shackelford *et al*, 1999.

Das Fortschreiten des Zellzyklus von einer Phase zur nächsten wird von einer konservierten Familie von Serin/Threonin Kinasen kontrolliert, den *cyclin dependent kinases* (CDKs). Die CDKs sind als Monomere inaktiv und benötigen einen Cyclin-Partner für ihre Aktivierung. Dies sind zyklisch exprimierte Proteine, die in bestimmten Phasen des Zellzyklus synthetisiert bzw. proteolysiert werden, erstmals beschrieben von Timothy Hunts Arbeitsgruppe im Jahr 1983 (Evans *et al*, 1983). Unterschiedliche Cyclin-CDK Komplexe kontrollieren verschiedene Zellzyklusphasen: Cyclin D/CDK4/6 Komplexe kontrollieren die G1 Phase, Cyclin A/E/CDK2 sind notwendig für die Regulation des G1/S Übergangs und die Progression durch die S Phase, während Cyclin A/CDK1/2 und Cyclin B/CDK1 für den G2/M Übergang von entscheidender Bedeutung sind (zusammengefasst in Pines, 1999; Nigg, 2001b; Murray, 2004; Sanchez & Dynlacht, 2005). Die Aktivität der CDKs wird weiterhin auch durch reversible Phosphorylierung reguliert (Kinoshita *et al*, 1990; Lee *et al*, 1991; Lee *et al*, 1994; Takizawa & Morgan, 2000). Viel weniger ist bekannt über die den CDKs antagonistisch wirkenden Phosphatasen (Cohen, 1997; Nigg, 2001b;a).

Neben der transkriptionellen Kontrolle über die zeitlich regulierte Expression durch z.B. die Cycline tragen also Ubiquitin-abhängige Degradation und reversible Phosphorylierung zur Kontrolle der Zellzyklusprogression bei. Es findet eine vierdimensionale Kontrolle in Raum und Zeit statt. Die zeitliche Kontrolle wird, wie bereits dargestellt, durch die zyklische Synthese und Proteolyse bestimmter Proteine gewährleistet. Die räumliche Kontrolle geschieht durch Kompartimentierung, d.h. die Lokalisation zyklisch regulierter Elemente in bestimmten zellulären Kompartimenten (Ohi & Gould, 1999; Pines, 1999; Takizawa & Morgan, 2000). Am genauesten werden die Übergänge zu den herausragenden Ereignissen der Zellzyklusprogression

(DNA-Replikation und Chromosomensegregation) d.h. die Übergänge zwischen G1/S, G2/M und der Beginn der Anaphase kontrolliert. Schon kleine Ungenauigkeiten in diesen Prozessen können zum (ungeplanten) Zelltod oder zur unkontrollierten Zellteilung und daraus erfolgend zur Tumorbildung führen. An diesen Stellen laufen daher die Kontrollsignalwege, die z.B. die Unversehrtheit der DNA, die vollständige Replikation des Genoms oder die korrekte Positionierung der Spindel überprüfen, in den Checkpoints zusammen, um den Zellzyklus, falls nötig, zu arretieren oder den programmierten Zelltod einzuleiten (Hartwell & Weinert, 1989; O'Farrell, 2001; Kastan & Bartek, 2004; Taylor *et al*, 2004). Keiner der bekannten Zellzykluskontrollpunkte ist bis heute vollständig verstanden. Der Einfachheit halber werden Checkpoint-Signalwege häufig in drei Komponenten aufgeteilt: Sensoren (*sensor/signal initiator*), Vermittler (*transducer/mediator*) und Ziele (*target/effector*). Beispielfhaft soll hier der *DNA damage checkpoint* etwas genauer dargestellt werden (zusammengefasst in Lee, 2002; Kastan & Bartek, 2004; Sancar *et al*, 2004; Li & Zou, 2005), da im Rahmen der vorliegenden Dissertation Experimente zur Charakterisierung des *DNA damage checkpoints* nach ionisierender Bestrahlung durchgeführt wurden.

Zwei Proteinkinasen aus der *PI-3-kinase-like* Familie, ATM und ATR, haben eine zentrale Bedeutung bei der Erkennung von DNA Schäden (Sensoren), wobei ATM durch DNA-Doppelstrangbrüche und ATR durch UV-induzierte und replikationsspezifische DNA-Schäden aktiviert wird. ATR-Aktivierung erfordert außerdem die Assoziation mit dem Protein ATRIP und zwei zusätzlichen Proteinkomplexen RAD17 und 9-1-1. Bei der ATM-vermittelten Antwort auf DNA-Doppelstrangbrüche spielt der MRE11-NBS1-RAD50-Komplex (MNR) eine entscheidende Rolle. Kritisch für die Signalübertragung ist eine große Anzahl von Vermittlern, darunter TOPBP1 und BRCA1. Fast alle Vermittler enthalten BRCT (BRCA1 C-Terminus) Domänen. Mit Hilfe dieser Vermittler und der übertragenden Kinasen CHK1 und CHK2 wird das Signal vom DNA-Schaden an die Zielproteine wie CDC25 Phosphatasen, SMC1 und p53 weitergeleitet. Diese regulieren unter anderem die Aktivitäten der Cyclin-abhängigen Kinasen, worüber dann der Zellzyklus arretiert werden kann. Eine schematische Darstellung des *DNA damage checkpoints* findet sich in Abbildung 1.

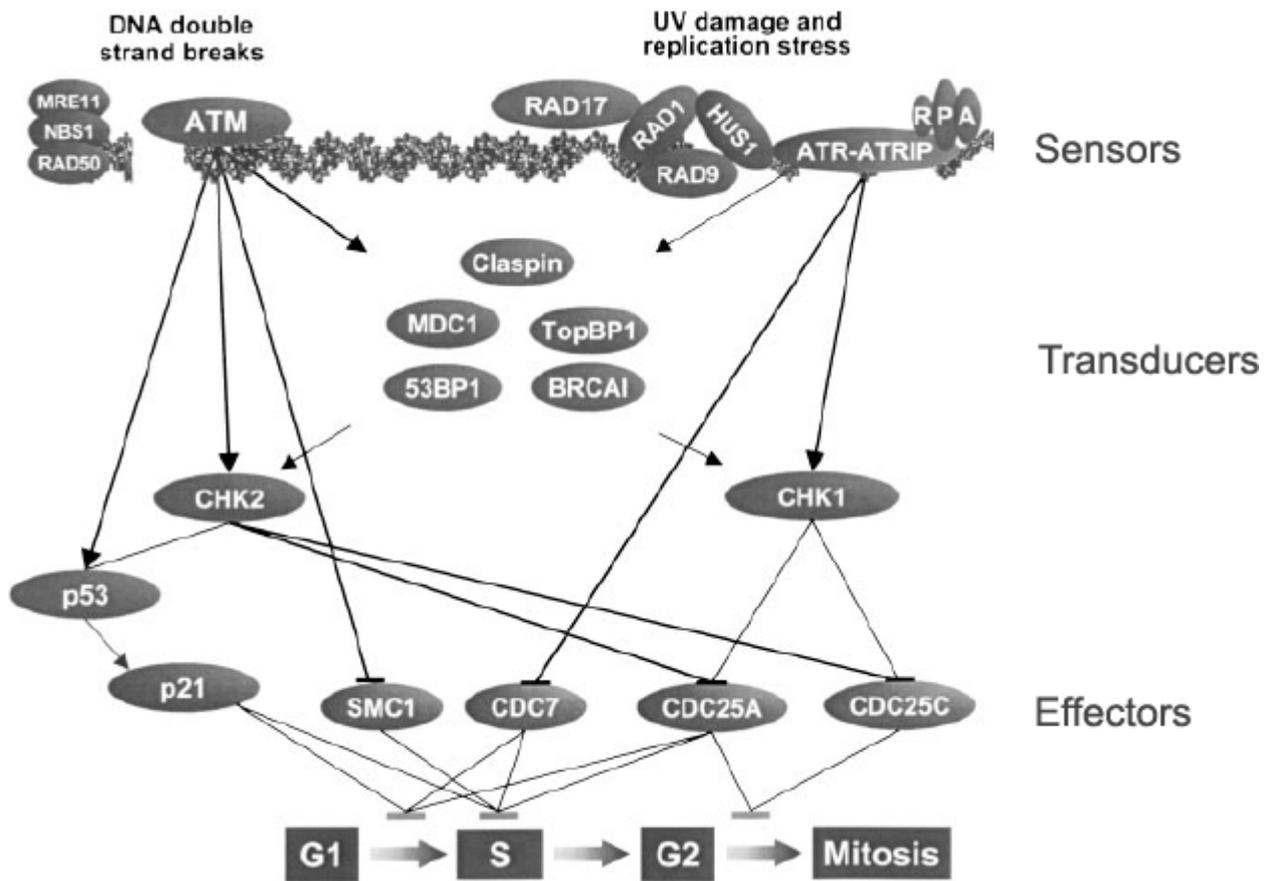


Abbildung 1 Modell des DNA Schadens- und Replikationskontrollpunktes bei Säugetieren. Linien, die mit einer Pfeilspitze enden, bedeuten Aktivierung. Linien, die mit einem Querstrich enden, bedeuten Inhibierung. Leicht modifiziert aus (Li & Zou, 2005).

1.2 Die mitotischen Phasen

Einer der fundamentalen Abschnitte im Generationszyklus aller eukaryotischer Zellen ist die Mitose, durch welche die reguläre Segregation der replizierten Chromatiden auf die Tochterzellen sichergestellt wird. Voraussetzung für den Eintritt in die Mitose ist die Chromosomenkondensation und die korrekte Ausbildung sowie Positionierung des Spindelapparates. In der traditionellen Betrachtungsweise wird die Mitose in 5 Phasen unterteilt (1. Prophase, 2. Prometaphase, 3. Metaphase, 4. Anaphase, 5. Telophase), die durch lichtmikroskopisch sichtbare, morphologische Veränderungen definiert werden. Der Beginn der Mitose ist durch die sichtbare Kondensation der Chromosomen in der Prophase gekennzeichnet. Gleichzeitig beginnen sich die gereiften Centrosomen zu separieren und zu den Polen zu wandern. Des weiteren beginnt die progressive Auflösung der Nukleoli. In der Prometaphase wird die Kernmembran abgebaut, die Centrosomen haben die Polbildung abgeschlossen und die Spindel wird ausgebildet, d.h. die von den Centrosomen ausgehenden Mikrotubuli werden über die Kinetochoren an den Zentromeren der Chromosomen befestigt. In der Metaphase ist die Chromosomenkondensation schließlich abgeschlossen und die Chromosomen sind in der

Äquatorialebene angeordnet. In der Anaphase werden die Kinetochore getrennt und die Schwesterchromatiden zu den Spindelpolen gezogen. In der Telophase beginnen die segregierten Chromosomen zu dekondensieren, die Nukleoli werden wieder ausgebildet und ein unter anderem auf Mikrotubuli basierender Midbody wird in der Nähe der ehemaligen Äquatorialebene gebildet und nimmt an der Zytokinese teil (zusammengefasst in McIntosh & Koonce, 1989; Pines & Rieder, 2001; Alberts *et al*, 2002; Hagstrom & Meyer, 2003). Die geschilderten Abläufe der Mitose sind für die meisten, aber nicht alle Organismen zutreffend. So gibt es Zellen, in denen die Chromosomen nicht lichtmikroskopisch kondensieren (Mazia, 1961), Zellen bei denen die Kernmembran während der Mitose nicht aufgelöst wird (z.B. *Saccharomyces cerevisiae*, *Aspergillus nidulans*, *Syndinium sp*) (Ris & Kubai, 1974; Kubai, 1975). Auch die Formierung der Metaphaseplatte ist kein gänzlich universelles Phänomen (Nicklas & Arana, 1992). Aufgrund dieser Tatsache und der unterdessen vorhandenen Kenntnisse über molekulare Ereignisse im Verlauf der Zellteilung sollten die klassischen Definitionen durch die zeitliche Abfolge molekularer Aktivitäten ergänzt werden. Pines und Rieder schlugen 2001 eine Unterteilung in 5 Übergangsphasen vor (siehe Abbildung 2).

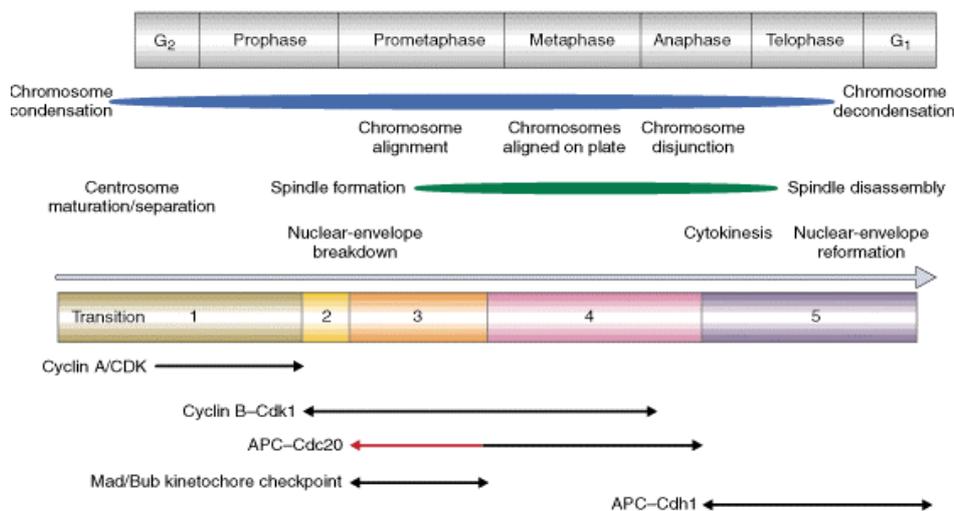


Abbildung 2 Gegenüberstellung der morphologischen Einteilung der Mitose bei Vertebraten (oben) mit den von Pines und Rieder vorgeschlagenen Transitionen (unten) (Leicht modifiziert aus Pines & Rieder, 2001). Oberhalb der Zeitlinie sind die klassischen, durch die mikroskopisch sichtbaren morphologischen Veränderungen der Chromosomen, der Spindel und der Kernmembran definierten Phasen der Mitose bei Vertebraten dargestellt. Unterhalb der Zeitlinie finden sich die fünf Transitionsphasen, die sich durch die Aktivitäten bestimmter Zellzyklusregulatoren definieren.

Cyclin A/Cdk, Plk und Aurora B bereiten dabei die Zelle auf die Mitose vor (Phase 1); durch Aktivierung von Cyclin B/Cdk1 erfolgt der endgültige und nicht wieder rückgängig zu machende Eintritt in die Mitose (Phase 2); der Mad/Bub Kinetochorcheckpoint überwacht die korrekte Befestigung der Spindel, während APC-Cdc20 (APC=Anaphase promoting Komplex) beginnt Cyclin A abzubauen (Phase 3); sobald alle Kinetochoren an Mikrotubuli gebunden sind, baut APC-Cdc20 Cyclin B und Securin ab, dadurch werden die Kinetochore getrennt und die

Anaphase beginnt (Phase 4). Schließlich wird die Zytokinese beendet und die Zelle kehrt in die Interphase zurück, dabei wird Cdc20 abgebaut und durch Cdh1 ersetzt (Phase 5).

1.3 Chromosomenkondensation

“Chromosomes have attracted many microscopists not only because these sausage-like bodies represent vehicles of genetic material (and hence, are biologically important) but also because they are hypnotically beautiful objects.“ (Hsu, 1979)

Die enorme Verdichtung des Interphasechromatins zu Metaphasechromosomen, hat Wissenschaftler seit der Erstbeschreibung der Chromosomen durch Walter Flemming 1882 fasziniert (Flemming, 1882). Jedes Mal, wenn sich eine Zelle teilt, muss sie, um eine akkurate Verteilung der Schwesterchromatiden auf die Tochterzellen zu ermöglichen, radikale Veränderungen hinsichtlich der Form und Dichte der Chromatiden vornehmen. Die Chromosomenkondensation ist ein aktiver, hochgradig komplex und koordiniert ablaufender Prozess, durch den das Interphase-Chromatin in das Mitosechromosom überführt wird. Durchschnittlich muss für jedes Chromosom ein ca. 4 cm langer DNA-Faden in eine 10 µm lange und 1 µm durchmessende Struktur verpackt werden (Murray, 1998). In der allgemein üblichen, durch lichtmikroskopische, zytologische Beobachtungen entwickelten Definition liegt das Chromatin während der Interphase als scheinbar amorphe Masse im Zellkern vor, wobei die einzelnen DNA-Moleküle in somatischen Zellen in bestimmten nuklearen Territorien individualisiert sind (Lemke *et al*, 2002; Hirano, 2004). In der Prophase, also in der späten G2 Phase des Zellzyklus (siehe 1.1), beginnt ein Prozess, der rasch zu einer merklichen Veränderung der Chromatinstrukturen führt - der Kondensation der Chromosomen und deren Auflösung in Schwesterchromatiden. Die Formgebung (*shaping*) und Auflösung der beiden replizierten DNA-Stränge in die Schwesterchromatiden (*resolution*) (siehe Abbildung 3) können nicht als isolierte Ereignisse betrachtet werden. Die einzelnen Schritte sind mechanistisch gekoppelt. Zum Beginn der Metaphase ist dieser Prozess schließlich abgeschlossen, die Chromosomen sind vollständig kondensiert und die Schwesterchromatiden wurden voneinander abgegrenzt. Nach der Aufteilung der Schwesterchromatiden im Laufe der Anaphase, beginnt während der Telophase die Dekondensation der Chromosomen. Diese ist mit Erreichen der Interphase in G1 abgeschlossen.

Einige elektronenmikroskopische Untersuchungen (el-Alfy *et al*, 1994) deuten jedoch einen Beginn der Chromosomenkondensation schon in der S Phase an, also während der Replikation der Chromosomen, und ebenso eine Verlängerung der Dekondensationsphase über die frühe G1 Phase hinaus. Diese Beobachtung wird durch *DNA protection assays* und Messung von Actinomycin-Bindung an synchronisierten Hela-Zellen unterstützt (Pederson, 1972; Pederson & Robbins, 1972). Diese Versuche zeigten, dass der Kondensationsgrad des Chromatins schon im Verlauf der Interphase zunimmt.

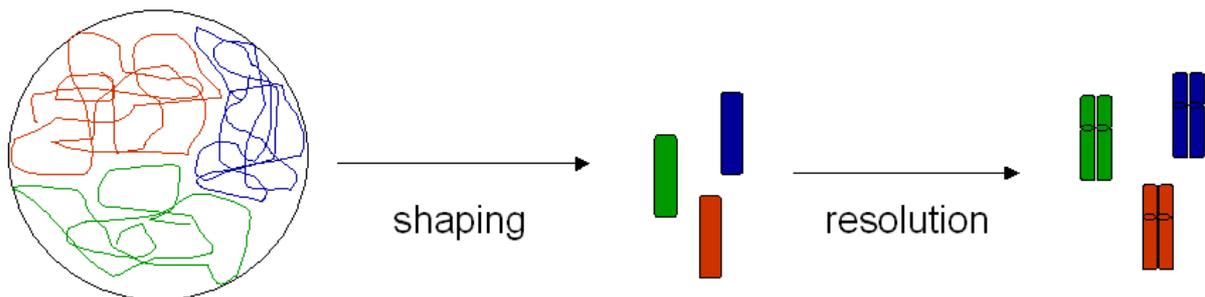


Abbildung 3 **Schematische Darstellung des Chromosomenkondensationsprozesses.** Die amorphe Masse des Interphasechromatins, die aber außer in den frühen embryonalen Stadien bereits in chromosomale Domänen aufgeteilt ist, muss verpackt (*shaping*) und in die Schwesterchromatiden aufgelöst werden (*resolution*).

Die chromosomale DNA ist in mehrstufigen Organisationseinheiten verpackt. Die Grundbausteine der Chromatinstruktur sind die Nukleosomen. Biochemische und elektronenmikroskopische Erkenntnisse (Hewish & Burgoyne, 1973; Kornberg, 1974; Oudet *et al*, 1975) demonstrierten die Existenz sich wiederholender, gleichförmiger, struktureller Partikel, aus der das eukaryotische Genom aufgebaut ist. Ein Partikel besteht aus ca. zweifach um ein Oktamer aus den Histonen H2A, H2B, H3 und H4 gewickelter DNA (146 bp). Zwei benachbarte Partikel werden durch ca. 50 Basenpaare *Linker*-DNA verbunden. Dies führt zu einer etwa 6- bis 7-fachen Verdichtung der DNA. In der lebenden Zelle ist diese perlenkettenartige Struktur fast immer zu einer dichteren Struktur, der 30nm-Faser, verpackt. Diese 30nm-Faser wird nach heute bevorzugter Ansicht nicht durch ein helicales *supercoiling* sondern durch eine *zigzag*-Anordnung unter Einbeziehung des *Linker*-Histons H1 gebildet (Bednar *et al*, 1998), dabei wird eine weitere Verdichtung des Genoms um das 6-7-fache erreicht. Zur Bildung der Metaphasechromosomen muss die 30-nm-Faser jedoch noch mindestens 200-500-fach verdichtet werden (Swedlow & Hirano, 2003).

Das Verständnis der strukturellen und molekularen Basis der mitotischen Chromosomenkondensation bleibt jedoch eine grundsätzliche Herausforderung in der Zellbiologie, da die molekularen Elemente und Mechanismen hinter diesen Vorgängen zu einem großen Teil noch unbekannt sind. In der letzten Dekade wurden jedoch durch die genetische

Charakterisierung von Kondensationsmutanten und die biochemische Isolierung Chromatin-assoziiierter Proteinkomplexe einige Erkenntnisse über molekulare *keyplayer* dieser Prozesse gewonnen. Einige dieser vermutlich in die Vorgänge der Chromosomenkondensation einbezogenen Schlüsselproteine werden in 1.3.2 vorgestellt. Verschiedene Modelle wurden entwickelt, um mikroskopische Erkenntnisse über die Chromatinstruktur mit biochemischen und genetischen Daten zu vereinen. Keiner dieser Erklärungsansätze kann jedoch bisher den Anspruch erheben, alle erhobenen Daten in einem einzigen gültigen Modell zu integrieren. Besonders wenig ist bisher über die Vorgänge zu Beginn der Chromosomenkondensation in der frühen Prophase und ihrer Regulation bekannt. Die wichtigsten Modelle der molekular-strukturellen Organisation von Metaphasechromosomen werden im folgenden kurz vorgestellt.

1.3.1 Strukturelle Modelle der Metaphasechromosomen

Verschiedene experimentelle Annäherungen führten zu unterschiedlichen und teilweise widersprüchlichen Modellen der Chromosomenkondensation und Metaphasechromosomen-Architektur. Eine Serie von Studien, welche die Erkenntnisse aus Elektronenmikroskopie und verschiedenen Extraktionsexperimenten interpretierten - dabei wurden verschiedene Proteinanteile der Chromosomen wie z.B. Histon H1 selektiv entfernt - führte zum *Scaffolding (Radial) Loop* Modell der Chromosomenorganisation (Paulson & Laemmli, 1977; Laemmli *et al*, 1978). Nach diesem Modell sind radial organisierte Schleifen der 30nm-Faser an einer axialen chromosomalen Struktur (*scaffold*) befestigt (Adolphs *et al*, 1977; Marsden & Laemmli, 1979). Dieses Gerüst wird durch spezielle Proteine, im Besonderen Topoisomerase II α (Earnshaw & Heck, 1985) und *structural maintenance of chromosomes 2* (SMC2, Untereinheit des Condensin I-Komplex) aufgebaut und enthält AT-reiche DNA Sequenzen (Saitoh & Laemmli, 1994).

In hierarchischen Modellen chromosomaler Faltung wird die 30nm-Faser progressiv in größere Fasern gefaltet, die sich wiederum zum fertigen Metaphasechromosom aufwickeln. So konnten Belmont und Bruce in synchronisierten CHO (*chinese hamster ovary*)-Zellen 100-130 nm „chromonema“ Domänen nachweisen, die in der späten G1 Phase in 60-80 nm Domänen auffalten (Belmont & Bruce, 1994). Lokale Regionen zeigen wiederum Umwandlung dieser Fasern in die bekannte 30-nm-Faser. Dies und vorausgehende Arbeiten (Belmont *et al*, 1987) führte zur Entwicklung eines Modells, welches die hierarchische Faltung der 30-nm-Faser in mehreren Stufen postuliert.

Mikromanipulationsexperimente durch kurze Nuklease-Behandlung mit verschiedenen Enzymen in Kombination mit mechanischem Zug haben einige Voraussagen beider Modelle in Frage gestellt (Poirier & Marko, 2002). Aus diesen Beobachtungen entwickelte sich der Vorschlag

eines Chromatin-Netzwerk-Modells, nachdem die 30-nm-Faser durch intrachromosomale Linkerproteine gefaltet wird. Diese *crosslinks* sollen demnach etwa alle 15 kb vorkommen.

Kireeva und Mitarbeiter versuchten mit einer Studie, die Immunfluoreszenz und Elektronenmikroskopie vereint, die Widersprüche der verschiedenen Modelle in einem Arbeitsmodell zu vereinen (Kireeva *et al.*, 2004). Demnach würde in der frühen bis mittleren Prophase zunächst eine hierarchische Faltung des Chromatins beginnen. In der späten Prophase würden diese Chromatiden ein weiteres Mal gefaltet werden, um die endgültigen Metaphasechromosomen zu bilden. Dabei beginnt sich die axiale Struktur der Condensine und Topoisomerase II α zu bilden, welche dann das Chromatin vernetzen. Dies würde erklären, warum in mechanischen Stretchingexperimenten von Metaphasechromosomen keine Zwischenformen zu beobachten sind (Poirier *et al.*, 2000). Die radialen Schleifen, die bei isolierten, mit Nidrigsalzpuffern behandelten Chromosomen beobachtet wurden und zum *scaffolding loop* Modell führten, wären demnach eine Manifestation des spät auftretenden *crosslinkings*, hätten aber keine funktionelle Relevanz für den tatsächlichen Prozess der Chromosomenkondensation.

1.3.2 Molekulare Regulatoren und Elemente der Chromosomenkondensation

Eine übliche und oft erfolgreiche Annäherung an biologische Strukturen ist ihre biochemische Zusammensetzung zu katalogisieren. Ebendies wurde durch die Isolierung mitotischer Chromosomen und anschließende Analyse ihrer Bestandteile begonnen und durch den Einsatz zellfreier Ei-Extrakte von *Xenopus laevis* fortgesetzt. Die auf diese Art und Weise definierten Komponenten von Metaphasechromosomen wurden anschließend durch biochemische und genetische Analysen weiter funktionell charakterisiert. Dadurch wurden unter anderem die beiden Condensinkomplexe (Condensin I und Condensin II), Topoisomerase II α , Cohesin und Aurora B Kinase als entscheidende Akteure postuliert. Als Schlüsselereignisse bei der Formgebung der Metaphasechromosomen werden Phosphorylierungen von Histon H3, die Bindung der Condensine und von Topoisomerase II an die zentrale chromosomale Achse sowie die Freisetzung des Hauptteils chromosomal gebundenen Cohesins zu Beginn der Prophase angesehen.

1.3.2.1 Topoisomerase II (TopoII)

Dabei handelt es sich um ATP-abhängiges Enzyme, welche topologische Probleme, die während der Replikation sowie der Chromosomenkondensation entstehen, lösen, indem sie einen Strang der doppelsträngigen DNA schneiden, den ungeschnittenen Teil der DNA durch die beiden Schnittenden hindurchführen und anschließend die Enden wieder zusammenfügen (Wang, 2002).

Die Menge an TopoII ändert sich im Laufe des Zellzyklus. Das Maximum wird in der Prometaphase erreicht und die Konzentration wird minimal nach der Telophase (Swedlow *et al*, 1993). Im Gegensatz zu seiner Isoform TopoII β ist TopoII α auf den Metaphasechromosomen konzentriert (Christensen *et al*, 2002). TopoII spielt bei vielen Schritten der Chromosomendynamik eine Rolle. Das Enzym katalysiert die Dekatenierung nicht homologer Chromosomen und der Schwesterchromatiden (Gimenez-Abian *et al*, 2000; Wang, 2002), außerdem ist es für die Chromosomenkondensation erforderlich, da die Ausschaltung des Enzyms durch Mutation oder Inhibitoren zu Veränderungen in der Chromosomenmorphologie führt. Die genaue Rolle bei diesem Prozess ist jedoch nicht endgültig geklärt, da die funktionelle Ausschaltung durch verschiedene Techniken in verschiedenen Organismen zu unterschiedlichen Phänotypen führt (Uemura & Yanagida, 1984; Hirano & Mitchison, 1993; Gimenez-Abian *et al*, 1995; Lavoie *et al*, 2002). Topoisomerase II wird auch eine herausragende strukturelle Rolle zugeschrieben, da sie an der zentralen Chromatidachse von Metaphasechromosomen lokalisiert (Earnshaw & Heck, 1985) und somit Teil des postulierten chromosomalen *scaffolds* ist (siehe 1.3.1).

1.3.2.2 Die Condensinkomplexe

Der kanonische Condensin-Komplex, unterdessen Condensin I genannt, wurde in zellfreiem *Xenopus* Ei-Extrakt identifiziert und charakterisiert (Hirano & Mitchison, 1994; Hirano *et al*, 1997). Zur gleichen Zeit wurde eine Condensin-Untereinheit als Komponente des chromosomalen *scaffolds* identifiziert (Saitoh & Laemmli, 1994). Aufgereinigtes Condensin hat die Fähigkeit durch einen ATP-Hydrolyse-abhängigen Prozess positive superhelicale Spannung in DNA einzubringen (Kimura & Hirano, 1997; Kimura *et al*, 1999; Bazett-Jones *et al*, 2002). Diese Aktivität wird nach Mitose-spezifischer Phosphorylierung durch *cdc2* ausgelöst (Kimura *et al*, 1998). Kürzlich wurde ein zweiter Condensin-Komplex (Condensin II) in Vertebraten entdeckt (Ono *et al*, 2003). Condensin I und II besitzen das gleiche Paar von Kernuntereinheiten, aber verschiedene Sets regulatorischer Untereinheiten.

Die zwei Kernuntereinheiten, CAP-E (oder SMC2) und CAP-C (oder SMC4), gehören zu einer Familie chromosomaler ATPasen, die „*structural maintenance of chromosomes*“ (SMC) Familie genannt wird. Das SMC2-SMC4-Heterodimer nimmt eine V-förmige Gestalt an mit einer ATP-Bindungskassette am distalen Ende jeden Armes (*head*-Domäne, Abbildung 4A) (Melby *et al*, 1998). Es handelt sich um ein großes Molekül; jeder aus einer antiparallelen *coiled-coil*-Formation bestehende Arm ist ca. 50 nm lang, dies entspricht in etwa 150 bp doppelsträngiger DNA (Hirano, 2005).

Die beiden unterschiedlichen Condensin-Komplexe können durch distinkte Gruppen regulatorischer Untereinheiten unterschieden werden. Jeder Komplex besitzt drei regulatorische Untereinheiten: CAP-D2, CAP-G, CAP-H gehören zu Condensin I, während die Condensin II-spezifischen Untereinheiten CAP-D3, CAP-G2 und CAP-H2 genannt werden. CAP-D2, -D3, -G, und -G2 enthalten HEAT *repeats* (Neuwald & Hirano, 2000), während CAP-H und -H2 zur Kleisin-Familie gehören (Schleiffer *et al*, 2003). Diese Nicht-SMC-Untereinheiten formen einen Unterkomplex der an die *head*-Domänen der SMC-Dimere bindet (Yoshimura *et al*, 2002) (Abbildung 4A).

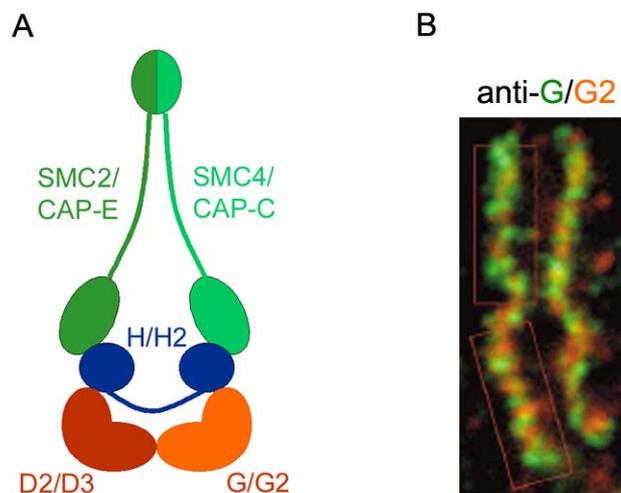


Abbildung 4 **Architektur der Condensinkomplexe.** (A) Der Kern beider Komplexe besteht aus einem Heterodimer aus SMC2/CAP-E und SMC4/CAP-C. Daran binden die Komplex-spezifischen regulatorischen Untereinheiten CAP-H/H2 (Kleisinfamilie), CAP-D2/D3 und CAP-G/G2 (enthalten HEAT *repeats*) (B) Alternierende Bindung der beiden Condensin-Komplexe an die zentrale Chromatidachse (Condensin I = CAP-G = grün und Condensin II = CAP-G2 = rot, aus (Ono *et al*, 2003)).

Die räumliche und zeitliche Verteilung der beiden Condensinkomplexe wird differentiell reguliert (Hirota *et al*, 2004; Ono *et al*, 2004). Condensin II befindet sich während der Interphase im Nukleus, während Condensin I bis zum Abbau der Kernmembran im Zytoplasma lokalisiert. Möglicherweise initiiert Condensin II die frühen Stadien der Chromosomenkondensation. Beide Komplexe binden ab der Prometaphase in alternierender Form an die zentrale chromosomale Achse (Abbildung 4B). Es wurde vorgeschlagen, dass Cyclin A-Cdk2 und Cyclin B-Cdk1 für die aufeinanderfolgende Beladung der Chromosomen mit Condensin II respektive Condensin I verantwortlich sind (Hirano, 2005).

1.3.2.3 Cohesin und weitere Kohäsionsfaktoren

Cohesin gehört wie Condensin zu den SMC ATPasen. Ein SMC1/SMC3 Heterodimer bildet den Kern, an den zwei Nicht-SMC-Untereinheiten, SCC1 aus der Kleisin-Proteinfamilie und SCC3, binden. Gemeinsam bilden sie eine ringförmige Struktur (Losada & Hirano, 2005). Die Funktion

von Cohesin ist essentiell für die Bildung von Metaphasechromosomen mit korrekt aufgelösten Schwesterchromatiden. Cohesin etabliert die Schwesterchromatidkohäsion zwischen duplizierender DNA in der S Phase. Es koppelt also Replikation und Mitose. Es ist eine naheliegende Vorstellung, dass Schwesterchromatiden durch die ringförmige Struktur des Cohesinkomplexes zusammengehalten werden (Gruber *et al*, 2003) und kürzlich konnte eine topologische Interaktion zwischen Cohesin-Ringen und Minichromosomen nachgewiesen werden (Ivanov & Nasmyth, 2005). Die Rekrutierung von Cohesin an das Chromatin ist von vielen Faktoren abhängig, darunter SCC2 (Ciosk *et al*, 2000) und ISWI (Hakimi *et al*, 2002). Pds5 spielt vermutlich eine Rolle bei der Modulierung der Cohesin-Bindung an Chromatin (Losada *et al*, 2005). Bei Vertebraten dissoziiert zu Beginn der strukturellen Reorganisation der Chromosomen in der Prophase ein Großteil des Cohesins (Losada *et al*, 1998; Waizenegger *et al*, 2000) von den Chromosomenarmen (*bulk-release*). Diese Dissoziation wird reguliert durch die Polo- und Aurora B-Kinasen (Sumara *et al*, 2002; Gimenez-Abian *et al*, 2004). Der genaue Mechanismus ist jedoch noch nicht vollständig verstanden. Lediglich ein kleiner Teil des Cohesins, besonders angereichert in den pericentromerischen Regionen, bleibt an die Chromosomen gebunden. Dieser verbliebene Anteil dissoziiert zu Beginn der Anaphase nach dem Schneiden von SCC1 durch die Protease Separase (Uhlmann *et al*, 1999), welche nach dem Abbau ihres Inhibitors Securin durch den *Anaphase Promoting Complex* (APC) aktiviert wird (Shirayama *et al*, 1999). Neues Cohesin bindet jedoch bereits in der frühen G1 Phase wieder an das Chromatin (Losada & Hirano, 2005).

1.3.2.4 Weitere potentielle Regulatoren der Chromosomenkondensation

In G2 beginnt eine Mitose-spezifische Phosphorylierung von Histon H3 an Serin 10, die in pericentromerischen Foci beginnt und sich mit zunehmender Chromosomenkondensation über die Chromosomenarme ausbreitet (Hendzel *et al*, 1997). In *Tetrahymena* ist diese Phosphorylierung Voraussetzung für eine regelgerechte Mitose und Chromosomenkondensation (Wei *et al*, 1999). Mikroinjektion von Serin 10 Peptiden und damit die Saturierung der entsprechenden Kinase führt zu einem G2 Arrest und verhindert die Chromosomenkondensation (Van Hooser *et al*, 1998). Weitere Studien sehen einen Zusammenhang zwischen Condensin-Targeting und H3P-Ser10 (Schmiesing *et al*, 2000; Giet & Glover, 2001). Andere genetische Daten legen jedoch nahe, dass Histon H3-Ser10 Phosphorylierung nicht für die Chromosomenkondensation erforderlich ist. Hefemutanten, denen dieser Residue fehlt (Ser10Ala) zeigen ein normales Zellzyklusverhalten (Hsu *et al*, 2000). Auch in vivo Experimente in *Drosophila* zeigen nur eine schwache Korrelation zwischen dieser Phosphorylierung und der Chromosomenkondensation (Adams *et al*, 2001). Aurora B ist die für

diese Phosphorylierung verantwortliche Kinase (Hsu *et al*, 2000; Adams *et al*, 2001; Crosio *et al*, 2002). Dieses Enzym ist ein sogenannter *chromosomal passenger*. Dies sind Proteine, die im Laufe der Mitose vom Zentromer zum Midbody wandern (Earnshaw & Bernat, 1991). Diese Funktion der Aurora B Kinase ist eng mit zwei anderen *chromosomal passengers* assoziiert, INCENP (*INner CENtromeric Protein*) und Survivin (Adams *et al*, 2000; Bolton *et al*, 2002). Die korrespondierende Phosphatase ist vermutlich PP1 (Hsu *et al*, 2000; Prigent & Dimitrov, 2003).

Goto und Mitarbeiter wiesen 1999 eine weitere an die Chromosomenkondensation gekoppelte Phosphorylierungsstelle an Histon H3, Ser28 (H3P-Ser28), nach (Goto *et al*, 1999). Auch diese Phosphorylierung wird von Aurora B vermittelt.

Ein weiteres in den Prozess der Chromosomenkondensation einbezogenes Protein, AKAP95 (*A-kinase anchoring protein*) wurde von Collas *et al*, 1999 identifiziert. Kurz darauf wurde eine Rolle beim Targeting von Condensin an Chromatin nachgewiesen (Steen *et al*, 2000; Eide *et al*, 2002).

Es wird vermutet, dass die Initiation der Chromosomenkondensation bei Vertebraten nicht durch Cyclin B-Cdk sondern durch Cyclin A-Cdk reguliert wird. Dieser Enzymkomplex erreicht sein Aktivitätsmaximum am Ende der G2 Phase und lokalisiert permanent im Nukleus (Pines, 1999). Die Mikroinjektion von Cyclin A-Cdk2 in G2, nicht jedoch in der S Phase, führt zu vorzeitiger Chromosomenkondensation. Die Mikroinjektion von Cyclin A-Cdk2 Inhibitoren in Prophasezellen induziert Dekondensation solange die Kernmembran noch nicht aufgelöst ist (Furuno *et al*, 1999).

1.4 PCC Syndrom

Beim PCC Syndrom (Neitzel *et al*, 2002), (OMIM *606858) handelt es sich um die erste kongenitale Zellzyklusstörung des Menschen, die in das elementare Geschehen der Chromosomenkondensation eingreift. Charakteristisch für die Erkrankung ist ein erhöhter Anteil von ca. 10-20% Prophase-ähnlicher Zellen (PLC, *prophase-like cell*) und eine schlechte chromosomale Bandenauflösung in zytogenetischen Routinepräparaten (Abbildung 5A und B). Die Prophase-ähnlichen Zellen erinnern an artifiziell induzierte vorzeitige Chromosomenkondensation durch mitotische Zellfusion (Sperling & Rao, 1974) oder spezifische Phosphataseinhibitoren wie Okadeinsäure oder Calyculin A (Kanda *et al*, 1999).

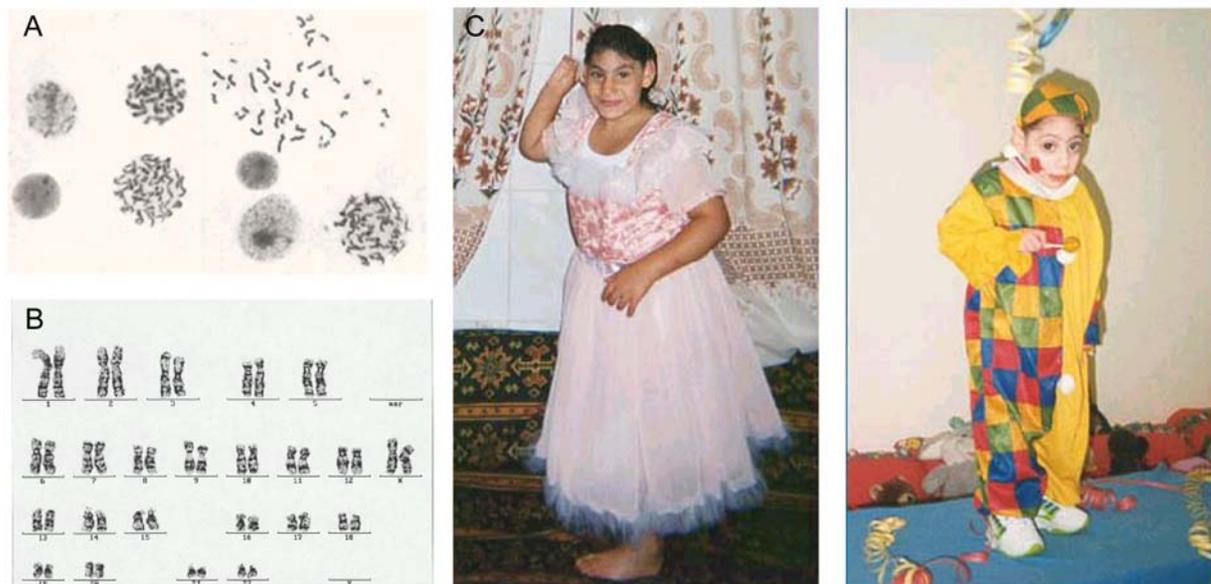


Abbildung 5 **PCC Syndrom.** (A) Überblick über ein T-Lymphozyten-Präparat von Patienten mit PCC Syndrom. Drei Prophase-ähnliche Zellen sind deutlich zu erkennen. (B) GTG-gebänderter HR Karyotyp von PCC Patienten. Die Bandenauflösung beträgt maximal 250 Banden pro haploiden Chromosomensatz. Im Allgemeinen werden durchschnittlich etwa 500 Banden erreicht. (C) Zwei Patienten mit PCC Syndrom.

Thymidin-Pulsmarkierungen zeigten, dass es in den Zellen der Betroffenen zu vorzeitiger Chromosomenkondensation in der frühen G2-Phase kurz nach der Beendigung der S-Phase kommt, daher PCC Syndrom (*premature chromosome condensation*, vorzeitige Chromosomenkondensation) (Neitzel *et al*, 2002). Zellzyklusanalysen konnten keinerlei Verzögerung des Zellzyklus nachweisen und die Patientenzellen zeigten keine Anfälligkeit gegenüber ionisierenden Strahlen oder den Clastogenen Mitomycin C und Bleomycin (Neitzel *et al*, 2002). Die Erkrankung wird autosomal rezessiv vererbt, die betroffenen Kinder (Abbildung 5C) weisen eine primäre Mikrozephalie (-8 bis -12 SD) mit geringfügiger Pachygyrie (abnorm breite Hirnwindungen) und eine mentale Retardierung auf.

Bei autosomal rezessiver primärer Mikrozephalie liegt ein um mehr als drei Standardabweichungen reduzierter occipitofrontaler Kopfumfang vor (Abbildung 6).

Die Reduktion des Kopfumfanges resultiert vermutlich aus einer reduzierten Anzahl neuraler Zellen als Konsequenz aus entweder verringerter Proliferation oder vermehrtem Zelltod (Mochida & Walsh, 2001). Mikrozephalie kann in primäre Mikrozephalie, welche schon bei Geburt manifest ist und sekundäre, sich erst postnatal entwickelnde Mikrozephalie unterschieden werden (Woods, 2004). Die Ätiologie der Mikrozephalie ist heterogen. Sie reicht von erworbener Mikrozephalie durch exogene Faktoren, wie z.B. Alkoholmissbrauch während der Schwangerschaft, zu kongenitaler, genetisch heterogener Mikrozephalie. Syndromale Mikrozephalie findet sich als ein Symptom in vielen klinischen Entitäten und genetischen Syndromen.

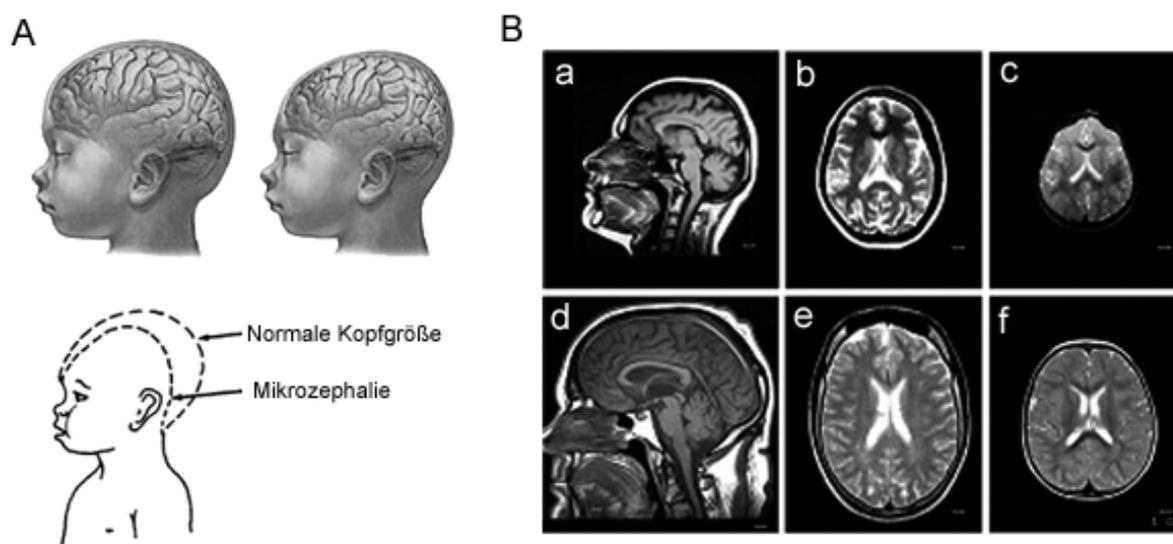


Abbildung 6 **Mikrozephalie** (A) Mikrozephalie ist durch einen reduzierten occipitofrontalen Kopfumfang gekennzeichnet, welcher durch einen deutlich verkleinerten Cortex zustande kommt. Typisch ist auch eine fliehende Stirn. Graphiken aus D. Werner, *Disabled Village Children*, (1987), Hesperian Foundation, Berkeley, CA und der Medical Encyclopedia at NCBI (B) MRT-Scans (Magnetische Resonanztomographie) von Patienten mit primärer Mikrozephalie (a,b): Diese demonstrieren ein kleines aber strukturell normales Gehirn. Beim PCC Syndrom (c) ist eine gyrale Simplifizierung, die an Pachygyrie erinnert, zu beobachten. (d,e,f) Altersabgleich normaler Individuen.

Autosomal rezessive primäre Mikrozephalie (MCPH) oder auch „echte Mikrozephalie“ wird hingegen durch die Abwesenheit weiterer schwerwiegender kongenitaler Fehlbildungen oder neurologischer Defizite - abgesehen von mentaler Retardierung - definiert (Woods *et al*, 2005).

Ein weiteres klinisches Einschlusskriterium ist eine angeborene Mikrozephalie von mindestens vier Standardabweichungen unter dem entsprechenden Alter- und Geschlechtsdurchschnitt. Das Hirn ist klein, aber strukturell normal. Typisch für Patienten mit dieser Form der Mikrozephalie ist ihre sehr freundliche und zufriedene Wesensart. Bisher wurden sieben Loci für autosomal rezessive Mikrozephalie kartiert. (Jackson *et al*, 1998; Jamieson *et al*, 1999; Roberts *et al*, 1999; Jamieson *et al*, 2000; Moynihan *et al*, 2000; Pattison *et al*, 2000; Leal *et al*, 2003; Wallerman *et*

al, 2003; Woods *et al*, 2005). Die Gene für MCPH1, MCPH3, MCPH5 und MCPH6, und wurden während der Durchführung der vorliegenden Arbeit identifiziert. Drei der Proteine, MCPH3/CDK5RAP2 (Bond *et al*, 2005), MCPH5/ASPM (Bond *et al*, 2002) und MCPH6/CENPJ (Bond *et al*, 2005), sind mit den Centrosomen bzw. der Spindel assoziiert.

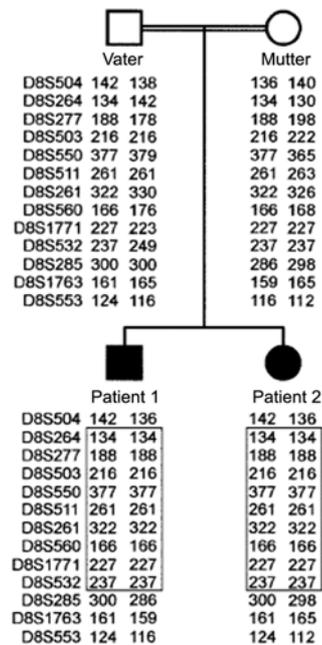


Abbildung 7 Ergebnis des *homozygosity mappings* für einen Ausschnitt von Chromosom 8. Die homozygote Kandidatenregion ist gerahmt.

Durch ein *homozygosity mapping* in der libanesischen Kernfamilie bestehend aus zwei konsanguinen Eltern und zwei betroffenen Kindern (5C) wurde als Kandidatenregion ein genomischer Bereich auf Chromosom 8 in der Größe von 64 cM (Centimorgan) zwischen den Markern D8S504 und D8S285 definiert (Abbildung 7). Das gesamte übrige Genom konnte durch die Kartierung ausgeschlossen werden.

1.5 Zielsetzung der Arbeit

Ziel der vorliegenden Dissertation war die Aufklärung der genetischen Ursache für das PCC Syndrom und der damit verbundenen Chromosomenkondensationsstörung. Dies sollte durch einen Kandidatengen-Ansatz, der auf den vorliegenden Daten des *homozygosity mappings* basierte, erfolgen. Als Kandidaten für die Chromosomenkondensationsstörung kamen grundsätzlich Proteinphosphatasen, Kinasen, Mitglieder der RAN-Familie und Cycline in Frage, aber auch Gene, die sich durch Protein-Domänen, wie z.B. BRCT-Domänen, auszeichnen, die eine Beteiligung an Zellzyklusabläufen wahrscheinlich machen.

Weiterhin sollte die Chromosomenkondensationsstörung mit zellbiologischen Methoden genauer charakterisiert werden, auch um eventuelle klinische Konsequenzen für die Patienten aufgrund möglicher Störungen wie z.B. bei der DNA-Reparatur oder aufgrund erhöhter chromosomaler Fehlverteilungsraten abschätzen zu können.

Schließlich sollten die Zelllinien dieser einzigartigen Zellzyklusmutante verwendet werden, um Vorgänge der Chromosomenkondensation - im Besonderen bei deren Initiation - zu untersuchen. Dafür wurden Schlüsselproteine der Chromosomenkondensation mittels Immunfluoreszenz hinsichtlich ihrer zyklischen Lokalisation in den Patientenzellen untersucht und mit Kontrollzellen sowie Literaturangaben verglichen. Außerdem wurden bestimmte Proteine, denen eine entscheidende Bedeutung bei der Organisation der mitotischen Chromosomen zukommt, wie z.B. die Condensine, selektiv durch RNA Interferenz ausgeschaltet, um die Effekte dieser *knockdowns* aus den zellulären Phänotyp zu untersuchen.