

**Aus dem Institut für Humangenetik
der Universität zu Lübeck
Direktorin: Prof. Dr. Gabriele Gillessen-Kaesbach**

Der Transkriptionsfaktor THAP1

Molekulare Schnittstelle zwischen der DYT6- und DYT1-Dystonie

**Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der Universität zu Lübeck
-Aus der Sektion Medizin-**

**vorgelegt von
Alma Osmanovic
aus Tuzla
Lübeck 2014**

1. Berichtstatter: Herr Prof. Dr. rer. nat. Frank Kaiser

2. Berichtstatterin: Frau Prof. Dr. rer. nat. Jeanette Erdmann

Tag der mündlichen Prüfung: 01.12.2014

Zum Druck genehmigt. Lübeck, den 01.12.2014

-Promotionskommission der Sektion Medizin-

Mojoj neni Adili

Vorwort

Die in der vorliegenden Dissertation aufgeführten und diskutierten Ergebnisse wurden in vier Publikationen und mehreren Kongress- und Tagungsbeiträgen veröffentlicht. Zusätzlich bestand eine Promotionsförderung im Rahmen der Lübecker Exzellenzmedizin „*Molekulare Untersuchung des THAP1-(DYT6-)Gens und seine Funktion bei Dystonien*“ (01.07.2010-31.03.2011).

Publikationen:

Kaiser FJ*, **Osmanovic A***, Rakovic A, Erogullari A, Uflacker N, Braunholz D, Lohnau T, Orolicki S, Albrecht M, Gillessen-Kaesbach G, Klein C, Lohmann K. The dystonia gene DYT1 is repressed by the transcription factor THAP1 (DYT6). *Ann Neuro* 2010 Oct; 68(4):554-9.

Schneider SA, Ramirez A, Shafiee K, Kaiser FJ, Erogullari A, Brüggemann N, Winkler S, Bahman I, **Osmanovic A**, Shafa MA, Bhatia KP, Najmabadi H, Klein C, Lohmann K. Homozygous THAP1 mutations as cause of early-onset generalized dystonia. *Mov Disord*. 2011 Apr;26(5):858-61.

Osmanovic A*, Dendorfer A*, Erogullari A*, Uflacker N, Braunholz D, Rakovic A, Vierke G, Gil-Rodríguez C, Münchau A, Albrecht M, Brüggemann N, Gillessen-Kaesbach G, Klein C, Lohmann K, Kaiser FJ. Truncating mutations in THAP1 define the nuclear localization signal. *Mov Disord*. 2011 Jul;26(8):1565-7.

Lohmann K, Uflacker N, Erogullari A, Lohnau T, Winkler S, Dendorfer A, Schneider SA, **Osmanovic A**, Svetel M, Ferbert A, Zittel S, Kühn AA, Schmidt A, Altenmüller E, Münchau A, Kamm C, Wittstock M, Kupsch A, Moro E, Volkmann J, Kostic V, Kaiser FJ, Klein C, Brüggemann N. Identification and functional analysis of novel *THAP1* mutations *Eur J Hum Genet*. 2012 Feb; 20(2):171-5.

* geteilte Erst-Autorenschaft

Tagungsbeiträge:

Eigene Vorträge:

21. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Humangenetik, Hamburg 2010
Osmanovic A, Braunholz D, Orolicki S, Albrecht M, Gillessen-Kaesbach G, Klein C, Lohmann K, Kaiser FJ. A functional link between DYT1 and DYT6 dystonia: Regulation of

DYT1 gene expression by the transcription factor activity of THAP1 (DYT6). Medizinische Genetik 22 (1). 2010

Treffen der Norddeutschen Humangenetiker, Greifswald, 2009

Osmanovic A, Lohmann K, Schneider S, Braunholz D, Klein C, Kaiser FJ. Mutationen im THAP1 (DYT6)-Gen und die Funktion von THAP1 als Transkriptionsfaktor

Poster:

Jahrestagung der Europäischen Gesellschaft für Humangenetik, Amsterdam 2011

Erogullari A, **Osmanovic A**, Dendorfer A, Rakovic A, Uflacker N, Braunholz D, Albrecht M, Gil-Rodríguez M, Gillessen-Kaesbach G, Klein C, Lohmann K, Kaiser FJ. Functional characterization of mutations in THAP1 causing dystonia 6

Jahrestagung der Amerikanischen Gesellschaft für Humangenetik, Washington 2010

Osmanovic A, Erogullari A, Rakovic A, Braunholz D, Uflacker N, Lohnau T, Albrecht M, Gillessen-Kaesbach G, Klein C, Lohmann K, Kaiser FJ. A functional link between DYT1 and DYT6 gene expression by the transcription factor activity of THAP1 (DYT6)

Jahrestagung der Society of Movement Disorder, Buenos Aires 2010

Osmanovic A, Orolicki S, Braunholz D, Rakovic A, Lohnau T, Albrecht M, Gillessen-Kaesbach G, Lohmann K, Klein C, Kaiser F.J. Linking DYT1 and DYT6 dystonia on the molecular level: Repression of DYT1 gene expression by the transcription factor activity of THAP1 (DYT6)

Jahrestagung der Europäischen Gesellschaft für Humangenetik, Göteborg 2010

Erogullari A., **Osmanovic A.**, Rakovic A, Orolicki S, Braunholz D, Lohnau T, Albrecht M, Gillessen-Kaesbach G, Klein C, Lohmann K, Kaiser FJ. A functional link of DYT1 and DYT6 dystonia. Repression of TOR1A (DYT1) gene expression by the transcription factor activity of THAP1 (DYT6)

Stipendien

Reisestipendium für “The Movement Disorder Society's 14th International Congress of Parkinson's Disease and Movement Disorders” in Buenos Aires, Argentinien 2010

Promotionsstipendium “Lübecker Exzellenzmedizin” Molekulare Untersuchung des THAP1- (DYT6-) Gens und seine Funktion bei Dystonien (01.07.2010-31.03.2011). mit monatlicher Förderung über 500 € sowie Reisekostenerstattung für Kongress- oder Tagungsteilnahmen

Abkürzungsverzeichnis

Aa	Aminosäure
Abb.	Abbildung
APS	Ammoniumperoxidsulfat
AD	autosomal dominant
AR	autosomal rezessiv
BSA	<i>bovin serum albumin</i> , Rinderserumalbumin
bzw.	Beziehungsweise
ca.	circa
CLSM	confokale Laserscanning Mikroskopie
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dsDNA	doppelsträngige DNA
DBS	<i>Deep Brain Stimulation</i> , Tiefe Hirnstimulation
DYT	Dystonie
DYT1	Dystonie 1
DYT6	Dystonie 6
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ENCODE	The <i>Encyclopedia of DNA Elements</i>
et al.	und andere
FBS	<i>fetal bovine serum</i> ; fötales bovines Serum
GFP	<i>green-fluorescent protein</i> ; grün fluoreszierendes Protein
GPi	Globus Pallidus internus
HBM	HCF-1 <i>binding motif</i> , HCF-1 Bindemotiv
HeLa	humane Zervixkarzinom-Epithel-Zelllinie
HGNC	HUGO (Human Genome Organisation) Gene Nomenclature Committee
mRNA	<i>messenger ribonucleic acid</i> ; Boten-Ribonukleinsäure
Mut	Mutation
NLS	<i>nuclear localization signal</i> ; Kernlokalisationsignal
ORF	<i>open reading frame</i> ; offener Leserahmen
OVCAR	<i>Human ovarian carcinoma cell line</i>
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Abkürzungsverzeichnis

PBS	phosphat- buffered saline, Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> ; Polymerasekettenreaktion
pH	-log [H ⁺]
PIC	P roteinase I nhibitor C ocktail
PolyPhen	<i>Polymorphism Phenotyping</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RRM1	ribonucleotide reductase M1
SDS	Natrium (engl. <i>sodium</i>) dodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SH-SY5Y	Neuroblastomazellen
SIFT	<i>Sorting Intoleranz From Toleranz</i>
siRNA	engl. <i>small interfering RNA</i>
THAP	Thanatos (griechischer Gott des Todes) assoziiertes Protein
THAP1	<i>THAP domain containing, apoptosis-associated protein 1</i>
THABS	THAP domain binding site
TOR1A	<i>Torsion family 1, Member A</i>
u.a.	unter anderen; unter anderem

Einheiten

μ	mikro (10 ⁻⁶)
bp	Basenpaare
g	Gramm
h	Stunde
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
l	Liter
M	molar
m	milli (10 ⁻³)
ml	Milliliter
n	nano (10 ⁻⁹)
sec.	Sekunden
U	Unit
λ	lambda, Wellenlänge

Abkürzungsverzeichnis

Aminosäuren

Alanin	Ala	A
Arginin	Arg	R
Asparagin	Asn	N
Asparaginsäure	Asp	D
Cystein	Cys	C
Glutamin	Gln	Q
Glutaminsäure	Glu	E
Glycin	Gly	G
Histidin	His	H
Isoleucin	Ile	I
Leucin	Leu	L
Lysin	Lys	K
Methionin	Met	M
Phenylalanin	Phe	F
Prolin	Pro	P
Serin	Ser	S
Threonin	Thr	T
Tryptophan	Trp	W
Tyrosin	Tyr	Y
Valin	Val	V

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Dystonien	1
1.2	DYT6-Dystonie	4
1.2.1	Das <i>THAP1</i> -(<i>DYT6</i> -)Gen	5
1.3	Differentialdiagnose: DYT1-Dystonie.....	8
1.4	Transkriptionsregulation: Die genetische Grundlage.....	9
1.5	Zielsetzung.....	10
2	Material und Methoden	12
2.1	Materialien	12
2.1.1	Geräte.....	12
2.1.2	Programme und Datenbanken.....	13
2.1.3	Verbrauchsmaterialien.....	13
2.1.4	Reagenzien und Chemikalien	14
2.1.5	Kits.....	15
2.1.6	Enzyme	15
2.1.7	Größenmarker	15
2.1.8	Antikörper	16
2.1.9	Vektoren.....	16
2.1.10	Oligonukleotide	16
2.1.11	Bakterienstämme.....	17
2.1.12	Zelllinien.....	17
2.1.13	Medien und Puffer	17
2.2	Methoden.....	18
2.2.1	Methoden der DNA-Klonierung	18
2.2.1.1	Polymerasekettenreaktion (PCR).....	18
2.2.1.2	<i>In-vitro</i> Synthese von spezifischen Mutationen	18
2.2.1.3	Agarose Gelelektrophorese	18
2.2.1.4	DNA-Extraktion	19
2.2.1.5	Restriktionsendonukleaseverdau	19
2.2.1.6	Ligation	19
2.2.1.7	Transformation kompetenter Bakterien	19

Inhaltsverzeichnis

2.2.1.8	Analytische Plasmid-Isolierung (Mini-Präparation)	20
2.2.1.9	Präparative Plasmid-Isolierung (Midi-Präparation) und Konzentrationsbestimmung	20
2.2.1.10	DNA-Sequenzierung	20
2.2.2	Zellbiologische Grundlagen	21
2.2.2.1	Kultivierung von Zellen	21
2.2.2.2	Passagieren von Zellen	21
2.2.2.3	Transiente Transfektion von Zellen	21
2.2.3	Reporter-Gen-Assay (Luciferase-Reporter-Assay)	22
2.2.4	Chromatin Immunopräzipitation (ChIP)	23
2.2.5	Proteinanalytische Methoden: SDS-PAGE/ Immunoblot	25
3	Ergebnisse	27
3.1	Der Transkriptionsfaktor THAP1, ein Schlüsselprotein der TOR1A-Genregulation?	27
3.1.1	Charakterisierung des TOR1A-Kernpromotors	27
3.1.2	THAP1 reguliert die TOR1A-Kernpromotoraktivität	29
3.1.3	THAP1 bindet <i>in-vivo</i> an den TOR1A-Kernpromotor	30
3.1.4	THAP1-Mutationen reduzieren die THAP1-Repressionsaktivität auf den TOR1A-Kernpromotor	32
3.2	Intrazelluläre Lokalisation des THAP1-Genprodukts	33
3.3	Funktionelle Analyse einer homozygoten THAP1-Mutation	35
4	Diskussion	39
5	Zusammenfassung	49
6	Literaturverzeichnis	50
7	Danksagung	55
8	Lebenslauf	56

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung des THAP1-Proteins.....	6
Abbildung 2: Charakterisierung des <i>TORIA</i> -Kernpromotors.....	29
Abbildung 3: wtTHAP1-Expression und sein Effekt auf den <i>TORIA</i> -Kernpromotor.....	30
Abbildung 4: Chromatin Immunopräzipitation mit THAP1	31
Abbildung 5: <i>THAP1</i> -Mutationen und ihr Effekt auf die <i>TORIA</i> -Promotoraktivität.....	32
Abbildung 6: Subzelluläre Verteilung von wtTHAP1 und mutTHAP1.	35
Abbildung 7: Charakterisierung der homozygoten Mutationsträger.....	36
Abbildung 8: Effekt der homozygoten L32H Mutation auf die THAP1-Aktivität.....	38
Abbildung 9: Funktionelle Bereiche im THAP1 C-Terminus..	45

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: DYT-Subtypen modifiziert nach Marras <i>et al.</i> , 2012	3
Tabelle 2: Schema zur Herstellung zweier SDS-Polyacrylgele	26

1 Einleitung

1.1 Dystonien

Als Dystonien (griechisch „*dys*“ miss/fehlerhaft, „*tonos*“ Spannung) werden eine heterogene Gruppe von Bewegungsstörungen zusammengefasst, die gekennzeichnet sind durch anhaltende oder intermittierende unwillkürliche Muskelkontraktionen und daraus resultierenden abnormen Haltungen (Muller, 2009). Der Begriff Dystonie wurde 1911 von dem deutschen Neurologen Hermann Oppenheim als „*Dystonia musculorum deformans*“ eingeführt. Oppenheim beschrieb mit diesem Ausdruck das klinische Bild von vier Patienten im Alter zwischen acht und vierzehn Jahren, mit fluktuierend hypo- und hypertonen Muskelspannungen, die zu Fehlhaltungen und abnormen repetitiven Bewegungen führten (Klein and Fahn, 2013). Heutzutage kennzeichnet der Begriff „Dystonie“ ein komplexes neurologisches Krankheitsbild mit einer differenzierten, mehrfach revidierten, Klassifikation. Die während dieser Promotionsarbeit gängige Einteilung erfolgte nach ätiologischen und phänomenologischen Kriterien.

(1) **Ätiologie:** Unterschieden werden hierbei in erster Linie die primären von den sekundären Dystonien. Die primären Dystonien bezeichnen eine eigenständige Krankheitsentität, mit genetischer (familiär oder sporadisch) oder idiopathischer Genese. Die dystone Bewegungsstörung ist, abgesehen von einem Tremor, das einzige Symptom der primären Dystonie. Bei der sekundären Form handelt es sich um ein klinisches Syndrom im Rahmen anderer Grunderkrankungen. Die Dystonie steht hier im Zusammenhang mit weiteren neurologischen Auffälligkeiten, beispielsweise kognitiven oder parkinsonoiden Störungen. Deren Ursache ist bekannt und kann auf diverse Umweltbedingungen (z.B. cerebrale Hypoxie), Medikamente (z.B. klassische Neuroleptika), angeborene (z.B. Morbus Huntington, Morbus Wilson) und erworbene Erkrankungen (z.B. Traumata) zurückgeführt werden.

(2) **Das Verteilungsmuster:** Es umfasst die Merkmale fokale-, segmentale-, multifokale-, generalisierte- und hemi-Dystonie. Fokale Dystonien sind streng auf die Muskelgruppen einer umschriebenen Körperregion beschränkt. Zu den klassischen fokalen Dystonien gehören der Tortikollis (Schiefhals), der Blepharospasmus (Lidkrampf), die spaßmodischen Dysphonie (Stimmbandkrampf), der Graphospasmus (Schreibkrampf /*writer's cramp*) und der Mund-, Zungen-, oder Schlundkrampf, die sogenannte oromandibuläre Dystonie. Segmentale Formen

betreffen zwei oder mehr benachbarte Bereiche, multifokale Formen hingegen zwei oder mehr nicht-benachbarte Körperregionen. Die Hemidystonie beschreibt den ipsilateralen Befall der Extremitäten. Zu den generalisierten Formen wird die Torsionsdystonie gezählt, die zu einer Verdrehung des ganzen Rumpfes sowie der rumpfnahen Extremitätenregionen führt und meist eine Bewegungsunfähigkeit hervorruft.

(3) Das Manifestationsalter: Hierbei lassen sich Dystonien unterscheiden, die im Kleinkindalter (infantile Dystonien), im Jugendalter (juvenile Dystonien) oder erst im Erwachsenenalter (adulte Dystonien) auftreten.

Weitere Unterscheidungen liegen in dem paroxysmalen vs. persistierenden Auftreten der dystonen Symptome und der therapeutischen Wirksamkeit von L-Dopa (Bruggemann and Klein, 2010).

Trotz dieser detaillierten Einteilung zeigen sich die klinische Diagnose und die epidemiologische Datenerhebung, durch die heterogene Ausprägung der Dystonien, mühsam und anspruchsvoll. Analysen zu Prävalenzen und Inzidenzen der Dystonien liegen somit nur unter Vorbehalt vor. Aus Meta-Analysen wurde für die primäre Dystonie eine Prävalenz von circa 16,43 pro 100.000 und eine Inzidenz von 1,07 pro 100.000 Einwohnern ermittelt (Steeves et al., 2012). Des Weiteren zeigte sich, dass die Mehrzahl der Patienten eine fokaliopathische Dystonie ausbildet und erst im Erwachsenenalter erkrankt. Kommt es zur selteneren Manifestation der Dystonie im frühen Lebensalter, steigt die Wahrscheinlichkeit einer genetischen Ursache sowie einer generalisierten Dystonie (Fahn, 1986).

Angesichts der zunehmenden genetischen Bedeutung in Diagnostik und Forschung der Dystonie wird ein separates Schema hinzugezogen, das basierend auf der „HGNC“-Nomenklatur (*Human Genome Organisation Gene Nomenclature Committee*) die monogenetischen Dystonie-Subtypen in *DYT1-DYT25* ordnet. „*DYT*“ ist die von der HGNC vergebene Bezeichnung für einen identifizierten Genlocus eines spezifischen dystonen Phänotyps, mit aufsteigender chronologischer Nummerierung nach Zeitpunkt der Erstbeschreibung. Fälschlicherweise, aber medizinisch geläufig und akzeptiert, wird „*DYT*“ für die Benennung der Dystonie (*DYT1*-Dystonie) und des identifizierten Gens (beispielsweise *DYT1*-Gen statt *TOR1A*-Gen) herangezogen (Marras et al., 2012). Als problematisch erweisen sich hierbei solche primären Dystonien (z.B. Sepiapterin reductase vermittelte dopa-responsive Dystonie), dessen Gene (*SRP*) direkt und ohne Umwege über Genlocus-Analysen identifiziert wurden, sodass diese Dystonien nicht in dem klinisch geläufigen *DYT*-Schema genannt werden (Marras et al., 2012). Die in der *DYT*-Serie gelisteten Dystonie-Subtypen können anhand phänotypischer Kriterien in isolierte Dystonien,

den Dystonie-plus-Syndromen und den paroxysmalen Dyskinesien zusammengefasst werden (Bragg et al., 2011). Durch noch lückenhafte genetische und pathomorphologische Daten, sowie der vielfältigen klinischen Überlappung, ist eine klare Phänotyp-Genotyp Korrelation bis heute nicht möglich. Im Jahr 2009 konnten für lediglich zwei (DYT1 und DYT6) der zu dem Zeitpunkt insgesamt acht bekannten isolierten Torsionsdystonien im DYT-System (DYT1, DYT2, DYT4, DYT6, DYT7, DYT13, DYT17) die genetische Ursache identifiziert werden. Mutationen im *THAPI*-Gen wurden als Ursache für die DYT6-Dystonie beschrieben. Das *TORIA*-Gen konnte mit der DYT1-Dystonie assoziiert werden. Beide Dystonien zeigen ein phänotypisch ähnliches Bild, sodass hier oftmals nur durch die genetische Analyse eine entsprechende Einteilung vorgenommen werden kann (Bruggemann and Klein, 2010).

Tabelle 1: Übersicht der monogenen Dystonie Subtypen modifiziert nach Marras et al., 2012

Symbol	Beschreibung	Modus	Gen	Lokus
DYT1	TD beinbetont mit früher Manifestation	AD	<i>TORIA</i>	9q
DYT2	Kraniozervikale TD mit früher Manifestation	AR	Unbekannt	Unbekannt
DYT3	DPS XR-Erbgang „lubag“	XR	<i>TAF1</i>	Xq
DYT4	„Nicht-DYT1“ TD, Dysphonie	AD	<i>TUBB4</i>	19p
DYT5a	Dopa-responsive Dystonie : Segawa Syndrom	AD	<i>GCHI</i>	14q
DYT5b	Dopa-responsive Dystonie : Segawa Syndrome	AR	<i>TH</i>	11p
/DYT14				
DYT6	Kraniozervikale generalisierte TD	AD	<i>THAPI</i>	8p
DYT7	Fokale TD mit später Manifestation	AD	Unbekannt	18p
DYT8	PNKD 1	AD	<i>MR-1</i>	2q
DYT10	Paroxysmale kinesio gene choreoathetose	AD	<i>PRRT2</i>	16p-q
DYT11	Myoklonus-Dystonie	AD	<i>SGCE</i>	7q
DYT12	DPS mit rascher Manifestation	AD	<i>ATPIA3</i>	19q
DYT13	Multifokale/segmentale TD	AD	Unbekannt	1p
DYT15	Myoklonus Dystonie	AD	Unbekannt	18p
DYT16	DPS mit früher Manifestation	AR	<i>PRKRA</i>	2p
DYT17	TD mit Dysphonie	AR	Unbekannt	20pq
DYT18	Belastungsinduzierte Dystonie	AD	<i>SLC2A1</i>	1p
/DYT9				
DYT19	EKD 2	AD	Unbekannt	16q
DYT20	PNKD 2	AD	Unbekannt	2q
DYT21	Dystonie mit spätem Beginn	AD	unbekannt	2q
DYT23	Zervikale Dystonie	AD	<i>CIZ1</i>	9q
DYT24	Kraniozervikale Dystonie mit später Manifestation	AD	<i>ANO3</i>	11p
DYT25	Zervikale Dystonie mit später Manifestation	AD	<i>GNAL</i>	18p

AD: autosomal dominant, AR: autosomal rezessiv, XR: X-chromosomal rezessiv, TD: Torsionsdystonie, DPS: *Dystonia parkinson syndrome*, PNKD: *Paroxysmal nonkinesigenic dyskinesia* EKD: episodische kinesio gene Dyskinesie

Trotz des stetigen wissenschaftlichen Interesses an den Dystonien und den zunehmenden Bemühungen zur Aufklärung der pathologischen Ursachen, bleibt der zugrundeliegende pathophysiologische Mechanismus nahezu vollständig unklar. Angenommen wird eine Störung der zentralen Bewegungsmodulation, die über ein Ungleichgewicht zwischen der neuronalen Transmission in den Basalganglien und den sekundären motorischen Zentren verursacht wird. Durch Fehlinformation kommt es zu einer zeitweise oder anhaltenden simultanen Kontraktion der quergestreiften agonistischen und antagonistischen Muskelfasern und so zu den charakteristischen Haltungsanomalien, die durch sensorische Tricks beispielsweise der „geste antegoniste“ (u.a. Berühren des Kinns bei Tortikollis) gemindert werden können. Anders als der Morbus Parkinson, gehören die Dystonien nicht zu den für Bewegungsstörungen typischen neurodegenerativen Erkrankungen. Angenommen wird eine chronische Dysfunktion mit möglichem entwicklungsneurologischem Ursprung (Bragg et al., 2011). Mangels Wissen über diese molekularen und physiologischen Abläufe gibt es bis heute lediglich symptomatische therapeutische Ansätze. Pharmakologisch kann derzeit mit Spasmolytika wie Baclofen (GABA_B-Rezeptor-Agonist) eine leichte Linderung erzielt werden. Auch die regelmäßige gezielte intramuskuläre Injektion des Nervengiftes Botulinumtoxin führt durch Relaxation der behandelten Muskelpartien zur kurzzeitigen Besserungen der dystonen Symptomatik. Dopamin-Agonisten zeigen bei den meisten Dystonien keine klinische Besserung. Eine neue erfolgversprechende therapeutische Möglichkeit ergibt sich aus der „Tiefen Hirnstimulation“, die bei schwerer generalisierter Dystonie gezielt, überwiegend im GPi (Globus Pallidus internus), einem wichtigen Teil der Basalganglien und damit der Bewegungsmodulation angewandt wird. Die ersten Versuche zeigen einen positiven Effekt auf die peripheren, dystonen Muskelkontraktionen, jedoch nur wenig auf Sprech- und Schluckstörung (Groen et al., 2010). Für die notwendige Entwicklung von effektiveren Therapien ist ein detaillierteres Verständnis der zugrundeliegenden Pathophysiologie unumgänglich.

1.2 DYT6-Dystonie

Dystonie 6 bezeichnet eine autosomal dominant vererbte primäre Torsionsdystonie, mit einer reduzierten geschlechtsunabhängigen Penetranz von 60 %. Erstmalig beschrieben und lokalisiert wurde die DYT6-Dystonie 1997 durch Analysen an Amish-Mennoniten Familien auf dem Chromosoms 8 (Almasy et al., 1997). Zwölf Jahre später gelang die Identifizierung von Mutationen im *THAPI*-Gen als genetische Ursache (Fuchs et al., 2009). Klinisch manifestiert sich die DYT6-Dystonie überwiegend im jungen Alter als segmentale oder

generalisierte Dystonie. Charakteristisch zeigt sich die Beteiligung der oberen Extremitäten und der kraniozervikalen Muskulatur mit Sprechstörungen in Form von Dysarthrien und spaßmodischen Dysphonien. Im Krankheitsverlauf breiten sich die häufig initial fokalen Symptome auf angrenzende Körperbereiche aus und enden in einer generalisierten Dystonie unter Beteiligung des Achsenskeletts und der unteren Extremitäten. Trotz des überwiegend jungen Alters bei Krankheitsbeginn wurden vereinzelt späte Manifestationen im Erwachsenenalter zwischen 20 und 80 Jahren beschrieben. Auch die phänotypische Ausprägung der Dystonie 6 ist sehr variabel und erschwert die Diagnosefindung beträchtlich. Bereits innerhalb einer Familie lässt sich ein weites Spektrum der beschriebenen klinischen Symptomatik finden, von gesunden Mutationsträgern bis hin zu schwer betroffenen generalisierten Dystonien (Djarmati et al., 2009; Muller, 2009).

Die Dystonie 6 ist nach der Dystonie 1 die zweithäufigste primäre Torsionsdystonie. Mutationen in *THAPI* lassen sich in 0,5 % - 1 % der Patienten mit einer primären Dystonie nachweisen (Xiao et al., 2010). Bei Eingrenzung des Kollektivs auf nicht DYT1-betroffene Familien, in denen mindestens ein Mitglied eine nicht-fokale Dystonie und ein Manifestationsalter unter 22 Jahren aufweist, beträgt die Mutationsfrequenz in *THAPI* circa 25 % (Bressman et al., 2009). Durch die schwierige klinische Abgrenzung und der fehlenden Phänotyp-Genotyp Korrelation sind weitere Analysen zur Erleichterung der Diagnose und der Therapie, die derzeit aus einer ungenügenden pharmakologischen Basis und der neuen vielversprechenden Hirnstimulation besteht, nötig.

1.2.1 Das *THAPI*-(*DYT6*-)Gen

Mittels Kopplungsanalysen an Amish-Mennoniten Familien und anschließenden DNA-Sequenzierungen konnte im Februar 2009 das *THAPI*-Gen mit der Dystonie 6 assoziiert werden (Fuchs et al., 2009). *THAPI* liegt auf dem Chromosom 8p11.21, enthält 3 Exone mit hoch konservierten Bereichen und kodiert ein offenes Leseraster (ORF, *open reading frame*) von 642 Basenpaar Länge.

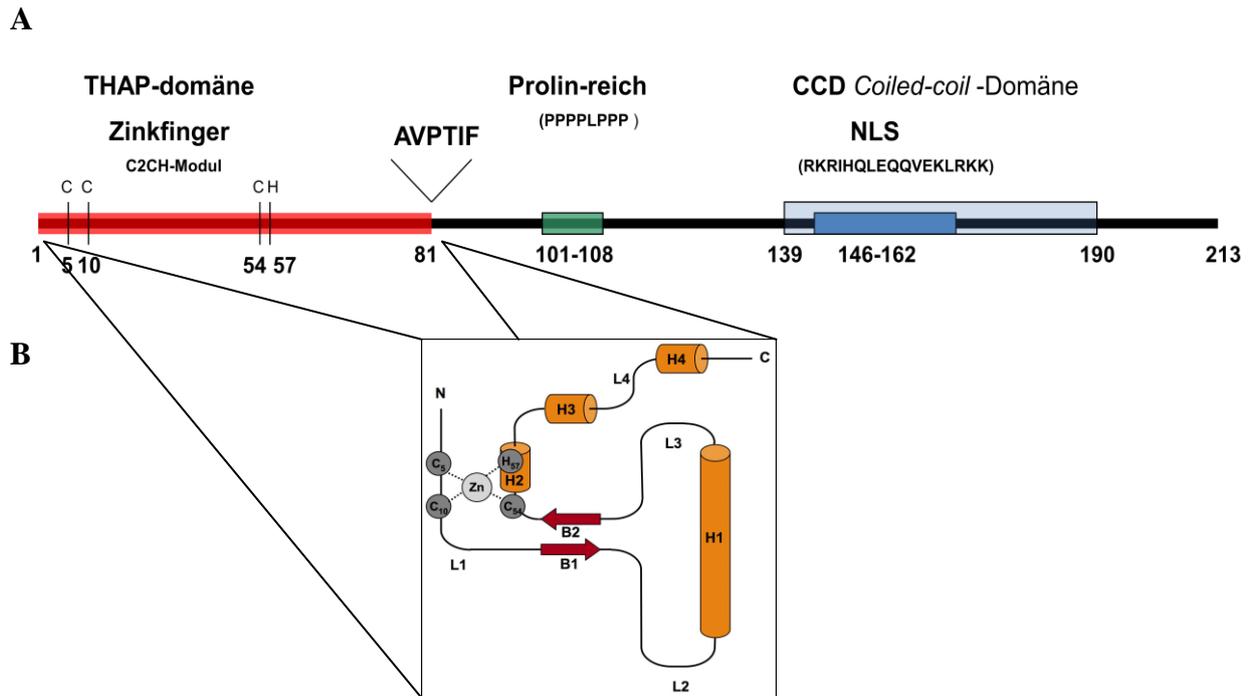


Abbildung 1: Schematische Darstellung des THAP1-Proteins mit Fokus auf seinen C₂CH Zinkfinger. (A) Die funktionellen Bereiche wurden farblich hervorgehoben und ihre Lokalisation unterhalb der farblichen Markierungen mit der entsprechenden Aminosäureposition beziffert. X₁₋₈₁ THAP-Domäne mit dem C₂CH Zinkfinger und dem konservierten AVPTIF-Motiv, X₁₀₁₋₁₀₈ Prolin-reiche Region und X₁₃₉₋₁₉₀ coiled-coil-Domäne ermöglichen Protein-Protein Interaktionen, X₁₄₆₋₁₆₂ putatives Kernlokalisierungssignal (NLS) **(B)** C₂CH Zinkfinger loop-helix-loop Struktur innerhalb eines β -Faltblattrahmens, entnommen aus Bassiere et al, 2008. L1-4: “loop“ Schleife, H1: α -Helix, H2-4: 310Helix, B: β -Faltblatt, Zn: Zink.

Der ORF kodiert für das aus 213 Aminosäuren bestehende THAP1-Protein (*THAP-domain containing, apoptosis associated protein 1*) mit einer kalkulierten molekularen Masse von 24,8 kDa. Namensgebend ist die N-terminal lokalisierte THAP-Domäne X₁-X₈₁, die einen atypischen C₂CH Zinkfinger bildet (Bessiere et al., 2008). Charakteristisches Merkmal dieses atypischen Zinkfingers ist eine bis zu 53 Aminosäuren lange Zwischensequenz, welche die Zink koordinierenden Aminosäuren Cystein (C) und Histidin (H) trennt und ein langes *loop-helix-loop*-Motiv mit einem antiparallelen β -sheet zeigt. Die THAP-Domäne definiert eine Familie von über 100 Proteinen in diversen Spezies. Hierzu zählen zwölf humane THAP-Proteine mit verschiedenen Funktionen unter anderem auch als Transkriptionsfaktoren (THAP11, THAP7) (Roussigne et al., 2003b). Zinkfinger-Motive ermöglichen die Bindung an eine spezifische DNA-Zielsequenz, üblicherweise als Proteinkomplex in Kombination mit anderen Co-Faktoren. Neben den für die Zinkkoordination wichtigen Aminosäuren Cys₅, Cys₁₀, Cys₅₄, His₅₇ und dem hoch konservierten AVPTIF-Motiv am C-terminalen Ende der THAP-Domäne, konnten mittels direkter Mutationsanalysen weitere für die Struktur relevante Aminosäuren in der THAP-Domäne (Pro₂₆, Trp₃₆, Phe₅₈, Pro₇₈) identifiziert werden (Clouaire et al., 2005). Struktur- und funktionelle Analysen der humanen THAP-Proteine postulierten durch Detektion von schwachen Bindungen des monomeren THAP1-Proteins an die DNA,

eine paarweise Bindung als Homodimer, welche für THAP1 bestätigt werden konnte (Bessiere et al., 2008; Sengel et al., 2011). Die korrespondierende DNA-Bindesequenz des atypischen THAP-Zinkfingers wird als THABS (THAP domain binding site) bezeichnet und wurde spezifisch für THAP1 als $5' \text{TxxxGGCA} 3'$ -Motiv identifiziert und gemeinsam für mehrere THAP-Proteine als $5' \text{TxxGGx(A/T)} 3'$ beschrieben (Clouaire et al., 2005; Sabogal et al., 2010). Der THAP-Domäne folgt eine Prolin-reiche Sequenz $\text{X}_{96}\text{-X}_{108}$ (Pro- X_4 -Pro $_4$ - X_1 -Pro $_3$) dessen Funktion noch überwiegend unbekannt ist. Verschiedene Studien zeigen, dass Prolin-reiche Regionen komplexe Proteininteraktionen ermöglichen, die eine Bedeutung in der Genregulation haben können (Williamson, 1994). Im C-terminalen Bereich von THAP1 ($\text{X}_{146}\text{-X}_{164}$) lässt sich, innerhalb der *Coiled-coil*-Domäne, ein vorhergesagtes Kernlokalisierungssignal (*nuclear localization Signal, NLS*) abgrenzen. Aufgeteilt in zwei, durch neun Aminosäuren getrennte Cluster überwiegend basischer Aminosäuren $^{146}\text{RKR}^{148}$ und $^{158}\text{KLRKCLK}^{164}$, vermittelt es den aktiven Transport des THAP1-Proteins in den Zellkern (Roussigne et al., 2003a). Das *Coiled-coil*-Motiv beschreibt eine Sekundärstruktur, die aus mindestens zwei alpha Helices besteht, welche spezifische rechts oder links-gedrehte Schleifen ausbilden. In einer kürzlich erschienen Studie wurde ein Bereich von 13 Aminosäuren innerhalb der *Coiled-coil*-Domäne ($\text{X}_{154}\text{-X}_{166}$) als mögliche Domäne zur Ausbildung von THAP1-Homodimeren eingegrenzt (Sengel et al., 2011).

Trotz einer zunehmenden Anzahl wissenschaftlicher Analysen sind die (patho)physiologisch relevanten Funktionen des THAP1-Proteins nur unzureichend verstanden. Bisherige Studien zeigen seine Bedeutung in der Endothelproliferation (Cayrol et al., 2007) und als proapoptotischer Faktor (Roussigne et al., 2003a). THAP1 interagiert im C-terminalen Ende mit PAR-4, *prostata apoptosis response-4*, einem pro-apoptotischen Protein, das in Verbindung zum Prostatakarzinom steht. Zusätzlich gibt es Schnittstellen zu neurodegenerativen Erkrankungen, wie Morbus Parkinson. PAR-4 interagiert mit dem Dopamin-2-Rezeptor und zeigt somit eine funktionelle Assoziation mit in dem für Bewegungsstörungen bedeutsamen Dopamin-Stoffwechsel (Bragg et al., 2011). Einen Einfluss auf die Zellproliferation nimmt das THAP1-Protein durch die Regulation von circa 40 pRB/E2F-relevanten Zielgenen ein. Hierbei konnte in DNA-Microarray Untersuchungen eine überwiegende THAP1-vermittelte Repression der Zielgenexpression detektiert werden. Anhand von *in-vitro* Analysen wurde die Bindung des endogenen THAP1-Proteins an den *RRM1* (ribonucleotide reductase M1)-Promotor dargestellt und damit die Funktion von THAP1 als Transkriptionsfaktor aufgezeigt.

Bisher konnten circa 70 hauptsächlich heterozygote Mutationen im *THAP1*-Gen mit der Dystonie 6 assoziiert werden. Dazu zählen neben *Missense*-, *Nonsense*-, und *frameshift*-Mutationen innerhalb des codierenden Bereichs, auch Mutationen in der nicht-codierenden Regionen von *THAP1* (Blanchard et al., 2011). Die überwiegende Mehrheit der Mutationen findet sich in der namensgebenden THAP-Domäne. Diese Anhäufung in der DNA-bindenden Region gibt einen Hinweis auf Transkriptionsdysregulationsmechanismen als pathophysiologische Ursache der Dystonie 6.

1.3 Differentialdiagnose: DYT1-Dystonie

Die DYT1-Dystonie ist die häufigste erbliche Dystonie, die äquivalent zur Dystonie 6 zu den Torsionsdystonien gezählt wird. Sie folgt einem autosomal dominanten Erbgang mit reduzierter Penetranz von 30-40 % und ausgeprägter phänotypischer Variabilität. Gehäuft wurde die Dystonie 1 bei Aschkenasim Juden (1/9000 versus 1/160000 bei Nicht-Aschkenasim) beobachtet und ist auf eine Gründermutation im *TOR1A*-Gen zurückzuführen (Bressman et al., 1988; Ozelius et al., 1997). Typischerweise manifestiert sich die DYT1-Dystonie im Kindes- oder Jugendalter, vereinzelt auch im Erwachsenenalter, sodass ein Erkrankungsbeginn zwischen 4 und 80 Jahren beschrieben werden konnte (Fahn, 1986). Die dystonen Verkrampfungen breiten sich ausgehend von den distalen Extremitäten, mehrheitlich von den Beinen, progredient über angrenzende Körperteile aus und neigen zur Generalisierung. Die kraniozervikale Muskulatur bleibt dabei überwiegend ausgespart. Manifestiert sich die DYT1-Dystonie im Erwachsenenalter betrifft sie seltener die unteren Extremitäten. Zudem zeigt sich die Symptomausprägung leichter und die -verteilung verbleibt oft fokal. Spontanremissionen sind -wie bei der Dystonie 6- untypisch (Edwards et al., 2003).

Das Dystonie 1 assoziierte *TOR1A*-Gen (*Torsion family 1, Member A*) wurde 1997 auf dem langen Arm von Chromosom 9q34 identifiziert und umfasst fünf Exone, die ein offenes Leseraster von 996 bp codieren (Ozelius et al., 1997). Die häufigste krankheitsrelevante Mutation im *TOR1A*-Gen ist eine heterozygote Trinukleotid GAG-Deletion im Exon 5, die zu einem Verlust einer Glutaminsäure am Carboxylende des TorsinA-Proteins führt. In den letzten Jahren konnten vier weitere potentiell krankheitsursächliche Mutationen identifiziert werden, deren pathologische Bedeutungen in der Dystonie 1 noch umstritten sind (Leung et al., 2001; Kabakci et al., 2004; Zirn et al., 2008; Calakos et al., 2010).

Das *TOR1A*-Gen kodiert für das 332 Aminosäuren umfassende TorsinA-Protein, das mit seiner ATP-Bindedomäne zur „AAA+-Superfamilie“ der ATPasen gezählt wird. *TOR1A* wird nahezu ubiquitär exprimiert, so auch im ZNS mit besonders hohem mRNA-Anteil in

dopaminergen nigrostrialen Neuronen (Augood et al., 1998). Es liegt im Lumen des endoplasmatischen Retikulums (ER) und hat als *Chaperon* Bedeutung in zellulären Transportvorgängen (Bragg et al., 2011). So konnte natives TorsinA mit der Regulation der Prozession und dem intrazellulären Transport der Dopamin-2-Rezeptoren in Verbindung gebracht werden (Bragg et al., 2011). Überexpression des mutierten TorsinA führt in Zellmodellen zur Bildung von Einschlusskörperchen, die funktionelle Störungen nach sich ziehen (Breakefield et al., 2001). Folglich wäre ein möglicher neuropathologischer Mechanismus der Dystonie 1 eine fehlerhafte Regulation des intrazellulären Transportes der Dopamin-2-Rezeptoren, wodurch auch die Unwirksamkeit der L-Dopa-Therapie erklärt werden könnte (Bragg et al., 2011). Insgesamt verbleibt der zugrundeliegende pathophysiologische Vorgang der Dystonie 1 weitestgehend unverstanden.

1.4 Transkriptionsregulation: Die genetische Grundlage

Das haploide menschliche Genom umfasst mehr als drei Milliarden Basenpaare. Weniger als 2 % dieser Information beinhaltet Proteincodierende Elemente. Der deutlich größere Teil sind nicht-codierende Basensequenzen, denen über viele Jahre wenig Bedeutung und Relevanz beigemessen wurde. In Rahmen des ENCODE-Projektes (*Encyclopedia of DNA Elements*) konnte diese Annahme widerlegt werden. Als multizentrisches Projekt konnte das ENCODE-Projekt-Konsortium eine Aktivität in circa 80 % des menschlichen Genoms identifizieren, ein Großteil davon zur Herstellung von RNA sowie Elemente mit regulatorischer Bestimmung, darunter 399,124 Enhancer-Elemente und etwa 70.292 Promotoren (Bernstein et al., 2012). Solche regulatorischen DNA-Motive finden sich im variablen Abstand sowohl proximal als auch distal zur Transkriptionsstartstelle (TSS) und steuern sehr spezifisch, über die Bindung sogenannter Transkriptionsfaktoren, die Expression der codierenden DNA. Transkriptionsfaktoren sind Proteine die positiv (Aktivatoren) oder negativ (Repressoren) in Form von Multi-Protein-Komplexen die Aktivität des jeweiligen Gens beeinflussen. Durch die kombinatorische Wirkung verschiedener Transkriptionsfaktoren und das gezielte An- und Abschalten von Genen wird ein spezifisches Expressionsmuster in Geweben und einzelnen Zelltypen erreicht. Dieser differentielle Genexpressionsmechanismus benötigt neben den spezifischen Transkriptionsfaktoren einen Präinitiationskomplex (PIC *pre-initiation complex*), der die Transkription der DNA startet, des Weiteren einen Zugang zur Chromatinstruktur des Zielgens, welcher vor allem über die spezifische post-translationale Modifizierung der N-Termini der Histon-Proteine aber auch über die differenzielle Methylierung von DNA-Elementen reguliert wird (Ranish and Hahn, 1996). In der Region um die Transkriptionsstartstelle befindet sich der Kern-Promotor, an welchem die Bindung des

PICs erfolgt und üblicherweise gekennzeichnet wird durch eine Trimethylierung des Lysin 4 im Histon 3 (H3K4me3), einer TATA-Box und ein DPE-Element. Der Präinitiationskomplex besteht bei Protein-kodierenden Genen aus der RNA-Polymerase II, den generellen Transkriptionsfaktoren (GTFs) und spezifischen Co-Faktoren (Orphanides et al., 1996). Transkriptionsfaktoren besitzen für ihre regulativen Eigenschaften wichtige funktionelle Domänen. Mit einer DNA-bindenden Domäne wird eine direkte Bindung an eine charakteristische DNA-Konsensussequenz ermöglicht. Bestimmte Motive der Sekundärstrukturen erlauben eine spezifische Interaktion mit Co-Faktoren. Über diese verschiedenen funktionellen Domänen der Transkriptionsfaktoren ergibt sich eine Vielzahl von Regulationsmöglichkeiten. Kommt es zum mutationsbedingten Austausch einer Aminosäure innerhalb einer solchen funktionellen Domäne, kann sich die Funktion des entsprechenden Transkriptionsfaktors verändern oder ganz aufheben. Tritt eine Mutation im nicht-codierenden regulativen DNA-Abschnitt oder in den Co-Faktoren auf, kann dies die Bindung des Transkriptionsfaktors beeinflussen, was sich ebenfalls auf die Transkriptionsfaktor-vermittelte Regulation der Gen-Expression auswirken kann. Somit können Mutationen in regulativen Elementen, wie beispielsweise in Genen die für Transkriptionsfaktoren codieren oder deren Bindungsstellen, durch den veränderten regulativen Mechanismus ebenso krankheitsursächlich sein, wie Mutationen die zu einer Funktionseinschränkung von zellphysiologisch relevanten Proteinen führen. Dieser Mechanismus bildet somit die molekulargenetische Grundlage für Transkriptionsdysregulations-assoziierte Erkrankungen.

1.5 Zielsetzung

Im Februar 2009 wurden von Fuchs *et al.* zwei Mutationen im *THAP1*-Gen als Ursache für die primäre Torsionsdystonie Dystonie 6 identifiziert. Bis zu diesem Zeitpunkt konnte lediglich das *TOR1A*-Gen einer primären Torsionsdystonie, der DYT1-Dystonie, zugeordnet werden. Beide Torsionsdystonien zeigen ein phänotypisch ähnliches Bild, was die klinische Unterscheidung stark erschwert und die genetische Untersuchung zum wichtigen Instrument der Diagnostik macht. Strukturanalysen des THAP1-Proteins ergaben neben dem im N-Terminus lokalisierten DNA-bindenden Zinkfinger-Motiv, eine Region die als zweigeteiltes Kernlokalisationsignal (NLS) vorhergesagt wurde. Innerhalb kürzester Zeit identifizierten Forschergruppen weltweit zahlreiche Mutationen im *THAP1*-Gen, die interessanterweise meist zu Veränderungen innerhalb der DNA-bindenden Region führten. Zusätzlich konnten weitere Dystonie 6 verursachende Mutationen nachgewiesen werden, welche den C-

terminalen Bereich des THAP1-Proteins betrafen. Aufgrund der überlappenden klinischen Ausprägung der DYT6- und DYT1-Dystonien stellten wir die Annahme gemeinsamer bzw. sich beeinflussender krankheitsursächlicher physiologischer Mechanismen. Die von der Arbeitsgruppe von Frau Prof. Dr. Klein und Frau PD. Dr. Lohmann identifizierten DYT6-assoziierten Mutationen im *THAP1*-Gen wurden im Rahmen meiner Promotionsarbeit *in vitro* rekonstruiert, und deren funktionelle Auswirkungen in zahlreichen molekularbiologischen, genetischen und zellbiologischen Verfahren untersucht.

Der Schwerpunkt dieser Arbeit lag dabei auf Untersuchungen hinsichtlich einer möglichen molekulargenetischen Verknüpfung der DYT6- mit der DYT1-Dystonie über Transkriptionsregulationsmechanismen.

2 Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Geräte

Geräte	Hersteller
Abzüge	Köttermann
Agarosegel-Kammer HE 99x submarine	Amersham Bioscience
Autoklav-CS/VFKT	Webeco
Digital Graphic printer UP-D895	SONY
Eismaschine	Ziegra
Elektroporationssystem Gene pulser X Cell CE und PC Module	BioRad
Fluoreszenzlampe ebq 100 isolated	Kübler
Fluoreszenzmikroskop Axioskop 2 plus HBO100	Kübler
Gefrierschrank Sanyo Ultra Low -80°C	Sanyo
Gefrierschränke Bosch electronic -20°C	Bosch
Gefrierschränke Siemens GS34VV20 -20°C	Siemens
Geldokumentationssystem	Herolab
Inkubator Certomat-H und U	Braun / Sartorius
Inkubator Galaxy 170S	New Brunswick / Eppendorf
Inkubator Heraeus-Typ B5028	Heraeus
Inkubator Innova 4300 Incubator Shaker	New Brunswick/Eppendorf
Inkubator Köttermann-Typ 2735	Köttermann
Kamera CCD Black and White Video Camera	SONY
Kammer für SDS-Gele Mini ProteanTetra	BioRad
Konfokales Laser Scanning Mikroskop	Zeiss
Kühlschrank Kirsch/Liebherr	Kirsch/Liebherr
Luminometer LB 942 TriStar ²	Berthold Technologies
Magnetrührer KAMAG RH	Jahnke und Kunkel
Mikroskop Laborlux 12	Leitz
Mikroskop Zeiss	Carl Zeiss AG
Mini Trans-Blot Module (Wet Blot)	BioRad
pH-Meter PCE-BPH 1	PCE Deutschland GmbH
Pipetten Eppendorf	Eppendorf
Pipetten Gilson	Gilson
Pipettierhilfe Easypet-Pipetboy 9V DC	Eppendorf
Plattenzentrifuge 5804	Eppendorf
Schüttler/Schwenker Polymax 1040	Heidolph
Sequenziergerät 3130X/Genetic Analyzer	Applied Biosystems
Speed Vac Plus Sc110 A	Savant
Spektrophotometer Helios Omega UV-Vis	Thermo Scientific
Sterilbank Hera Safe + Heraeus LaminAir HLB 2448GS	Heraeu
Thermocycler Thermal Cycler 2720	Applied Biosystems
Tischzentrifuge Centrifuge 5415C, 5415R	Eppendorf

Tischzentrifuge Microfuge 22R	Eppendorf
Transblot SD SemiDry Transfer Cell	BioRad
Ultraschall Homogenisator SONOPULS	Bandelin electronic
Vakuumtrockner Slab Gel Dryer SGD 2000	Savant
Vortexer Top Mix 11118	Fisher Bioblock Scientific
Vortexer Vortex Genie	Bender & Hobein
Waage Typ 2254/ Typ 2492	Sartorius
Wasserbäder GFL Typ 1003	GFL
Zentrifuge Avanti J-30I Centrifuge	Beckman Coulter
Zentrifuge/Vortexer CombiSpin FVL-2400	PeqLab Biotechnologie GmbH

2.1.2 Programme und Datenbanken

Programme und Datenbanken	
AliBaba 2.1	http://www.gene-regulation.com/pub/programs/alibaba2/index.html
CorePromoter	http://rulai.cshl.org/tools/gene_finder/CPROMOTER/index.htm (Zhang lab)
Edit Seq	DNASStar Lasergene
ENCODE	http://genome.ucsc.edu/ENCODE/
Ensembl	http://www.ensembl.org/index.html
Seqman	DNASStar Lasergene
Sequencing analysis	Applied Biosystems
NebCutter V2.0	New England Biolabs
NCBI-Blast	http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi
Oligo calculator	http://mbcf.dfci.harvard.edu/docs/oligo.html
Polyphen-2	http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/
Promoter 2.0 Prediction Server	http://www.cbs.dtu.dk/services/Promoter/
SIFT	http://sift.jcvi.org/
UCSC Genome Browser	http://genome.ucsc.edu/

2.1.3 Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterialien	Hersteller
96-well Optical Reaction Plate	Applied Biosystems
Amicon ultra 0,5ml 100K	Millipore
Einmalküvetten (1,5 ml)	Kartell
Einmalreaktionsgefäße (0,2 ml, 0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml)	Sarstedt
Einmalreaktionsgefäße (15 ml, 50 ml)	Greiner/Sarstedt
Einmalspitzen (10 ml, 50 ml)	Beckton Dickinson
Glaspipetten (5 ml, 10 ml, 25 ml)	Hirschmann Laborgeräte
Glasplatten (0,75 mm Spacer)	BioRad
Illustra Sephadex G-50 Fine DNA Grade	GE Healthcare
Imaging Plate BAS-MP 2040S (20x40cm)	Fuji Photofilm CO., Ltd
Objektträger 26 x 76 mm / ca. 1mm	Heinz Heren Medizinalbedarf GmbH
Petrischalen (92 x 16 mm)	Sarstedt

PVDF western blotting membranes	Roche
Skalpelle	pfm medical AG
Surelock tubes	Starlab
Whatmanpaper	Whatman
Zellheber (Schaber)	Th. Geyer
Zellkulturflaschen (25 cm ² , 75 cm ²)	Biochrom
Zellkulturplatten 24 Well	Th. Geyer
Zellkulturschalen (100 mm, 150 mm)	Nunc, Biochrom

2.1.4 Reagenzien und Chemikalien

Reagenzien u. Chemikalien	Hersteller
Acrylamid 30 %	Roth
Agar	Fluka
Ammoniumpersulfat	Roth
Ammoniumsulfat	Fluka Biochem
Ampicillin	Roth
Antibiotic-Antimycotic Solution	PAA
Ascorbinsäure	Sigma-Aldrich
Bovine Serumalbumin (BSA)	Sigma-Aldrich
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich
Calbiochem® Protease Inhibitor Set V	Millipore
Calciumchlorid	Serva
Chloroform	Merck
Dithiothreitol (DTT)	Sigma-Aldrich
DMEM (High glucose)	PAA
Essigsäure	Merck
Ethanol 100 %	J.T Baker
Ethidiumbromid 0,025 %	Roth
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Merck
FBS	Gibco
FuGENE HD	Roche / Promega
Glucose	Merck
Glycerin	Calbiochem
Glycin	Sigma-Aldrich
HEPES	Sigma-Aldrich
HiDi-Formamid	Applied Biosystems
Kaliumacetat	Sigma-Aldrich
Kaliumchlorid	Fluka
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck
Kanamycin	Sigma-Aldrich
Lithiumchlorid	Sigma-Aldrich
Magermilchpulver	Merck
Methanol	J.T. Baker
N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Roth
Natriumcarbonat	Sigma-Aldrich
Natriumchlorid	Merck
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Sigma-Aldrich
Natriumhydroxid	Merck
Nonidet-P40 (NP-40)	Fluka
Opti-MEM®	Gibco
Penicillin / Streptomycin	Invitrogen
Pepton	Gibco

Phenol	AppliChem
Protease Inhibitor Cocktail	Roche
β -Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich
Tris-Base	MP Biomedicals
Triton-X-100	Sigma-Aldrich
Trypton	Beckton Dickinson

2.1.5 Kits

Kit-Bezeichnung	Hersteller
BigDye Terminator Cycle Ready Reaction Kit	Applied Biosystems
Dual-Luciferase Reporter Assay	Promega
DyeEx 2.0 Spin Kit	Qiagen
ECL Western Blotting Substrate	Pierce
pGEM-T-Easy-Vector System	Promega
Pure Yield Plasmid-Midiprep-System	Promega
QIAquick Gel extraction Kit	Qiagen
QuickChange Site directed Mutagenesis Kit	Stratagene
ReadyPrep™ 2-D Cleanup Kit	BioRad
SuperSignal West Femto Chemiluminescent Substrate	Thermo Scientific
Tag CORE kit 10	Q-Biogene

2.1.6 Enzyme

Enzym-Bezeichnung	Hersteller
Expand Long Range dNTPack	Roche
FastDigest® Restriktionsenzyme	Fermentas
GC Rich PCR-System	Roche
High Fidelity-Platinum PCR Enzyme Mix	Fermentas
<i>pfu</i> DNA Polymerase	Fermentas
PlatinumTaq DNA Polymerase High Fidelity	Invitrogen
RNase A	Qiagen
T4 Ligase	Roche
Trypsin	Serva

2.1.7 Größenmarker

Größenmarker	Hersteller
Hyperladder I (DNA)	Bioline
Low DNA Mass Ladder (DNA)	Invitrogen
PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder	Fermentas

2.1.8 Antikörper

Antikörper	Hersteller
Anti-c-Myc-HRP konjugiert	Roche
Anti-FLAG M2, monoklonal, Maus	Sigma-Aldrich
Anti-GFP, polyklonal, Kaninchen	Abcam
Anti-Maus IgG-HRP, Ziege	Thermo Scientific
Anti-THAP1, IgG, Kaninchen	ProteinTech

2.1.9 Vektoren

Vektor-Name	Hersteller
pcDNA3.1/myc-His B	Invitrogen
pGEM –T T Easy Vector System	Promega
pFLAG-N3 basierend auf pEGFP-N3	Clontech
pGL4.10 firefly Luciferase-Gen <i>luc2</i>	Promega
pGFP-N3 , <i>CMV-Promotor</i>	Clontech
pGL4.74 Renilla <i>hRluc</i> Luciferase-Gen	Promega

2.1.10 Oligonukleotide

Die hier aufgeführten Primer wurden von der Firma Biomers synthetisiert.

Primer-Name	Sequenz 5' - 3'	Sequenz 5' - 3'
THAP1-pFLAG	Aagcttaccatggtgcagtcctgc	Ggatcctgctgttacttcaactatttc
THAP1-pcDNA3.1	Aagcttaccatggtgcagtcctgc	Ggatcctgctgttacttcaactatttc
THAP1-pGFP	Aagcttaccatggtgcagtcctgc	Ggatcctgctgttacttcaactatttc
THAP1_38G>A	cctcgcctacggctgcaagaaccactacgacaaggacaagcc	ggcttgccttgcgtagtggttcttcagccgtaggcggagg
THAP1_68A>C	Gcccgtttcttcccagttcttactgacccag	ctgggtcagtaagaggaaacttgggaaagaacgggc
THAP1_77C>T	Gcccgtttcttcccagttcttactgacccag	ctgggtcagtaagaagaacttgggaaagaacgggc
THAP1_95T>A	Cttactcgaccagtcattgtaagaatgggaggcagctg	cagctgcctccattttacaatgactggctgagtaag
THAP1_241T>C	Getgtgccacaatactcttctgactgagccac	gtggctcagtacaagaagtattgtggcacagc
THAP1_474delA	Aagcttaccatggtgcagtcctgc	Ggatccttttcaactgctgttctagctg
THAP1_460delA	Aagcttaccatggtgcagtcctgc	Ggatcctttagctgatgaatc
THAP1_388_389del TC	Aagcttaccatggtgcagtcctgc	Ggatccgagattaacaggggtctg
TOR1A Promotor	gtagcgacactgtcattaacagtagtc	Ctcaggcactcggcgaagaggcagtag
TOR1A Promotor A	gtagcgacactgtcattaacagtagtc	Ctcaggctgaggcggcgatcacctg
TOR1A Promotor B	Gctagcgtctcccaggctggagtgc	Ctcagctcctctcgcggaggccatc
TOR1A Promotor C	Gctagccagtgatccgccgcctc	Ctcaggcactcggcgaagaggcagtag
TOR1A Promotor D	Gctagcgtctcccaggctggagtgc	Ctcaggcactcggcgaagaggcagtag
TOR1A Promotor E	Gctagccagtgatccgccgcctc	Ctcagctcctctcgcggaggccatc
TOR1A Promotor F	Gctagcggcctccgcgagaggag	Ctcaggcactcggcgaagaggcagtag

2.1.11 Bakterienstämme

Name	Genotyp
<i>E.coli</i> DH5 α	F'endA1 glnV44 thi-1 recA1 relA1 gyrA96 deoR nupG Φ 80d <i>lacZ</i> Δ M15 Δ (<i>lacZYA-argF</i>)U169, hsdR17($r_K^- m_K^+$), λ^-

2.1.12 Zelllinien

Zelllinie	
HeLa	humane Zervixkarzinom-Epithel-Zelllinie (ATCC CCL-2, adhärenent)
SH-SY5Y	humane Neuroblastoma-Zellen (ATCC CRL-2266, adhärenent)
OVCAR-3	humane Adenokarzinom-Epithel-Zelllinie (ATCC HTB-161, adhärenent)

2.1.13 Medien und Puffer

Bakteriennährmedien	Zusammensetzung
LB-Medium	20 g/l Trypton Pepton 10 g/l Hefeextrakt 20 g/l NaCl
Agarplatten	LB-Medium 16 g/l Agar +100 μ g/ml Ampicillin +40 μ g/ml X-Gal oder +35 μ g/ml Kanamycin

Zellnährmedium und Puffer	Zusammensetzung
DMEM 101	DMEM high glucose 10 % FBS 1 % Antibiotica-Antimycotica Solution
Trypsin/EDTA in PBS	40 g/l Trypsin 0,7 mM EDTA
PBS	137 mM NaCl 2,6 mM KCl 6,5 mM Na ₂ HPO ₄ 1,5mM KH ₂ PO ₄

2.2 Methoden

2.2.1 Methoden der DNA-Klonierung

2.2.1.1 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Grundlage der Klonierung bildete die Erzeugung definierter DNA-Fragmente unter Verwendung der Polymerasekettenreaktion, welche anhand einer Matrize den gewünschten DNA-Abschnitt vervielfältigt. Zur Eingrenzung dieses Abschnitts wurden 5' und 3' Oligonukleotide (siehe 2.1.10) mit spezifischen Schnittstell-Sequenzen für Restriktionsenzyme generiert. In einem 25 µl Ansatz wurden 50 ng Plasmid-DNA, 2,5 Units *AmpliTaq*-Polymerase, je 0,4 µM Primer, 200 µM dNTP-Mix und 2,5 µl Reaktionspuffer zusammengefügt und 3 min auf 96 °C erhitzt. Das PCR-Programm umfasste anschließend 25-35 Zyklen: Denaturierung 30 sec bei 96 °C, Primer-Anlagerung/Annealing 30 sec bei 50-70 °C (je nach Primer), Polymerase-Reaktion 60 sec bei 72 °C. Anschließend erfolgte eine terminale Inkubation für 7 min bei 72 °C.

Bei anspruchsvollen Amplifizierungen, beispielsweise DNA Fragmenten über 2 kb Länge, wurden bei Bedarf andere Polymerasen und Kits (Platinum Tag DNA Polymerase High Fidelity, Invitrogen; GC Rich PCR-System, Fermentas; *pfu*DNA Polymerase, Fermentas) verwendet und die Reaktionsbedingungen entsprechend der Herstellerangaben angepasst.

2.2.1.2 *In-vitro* Synthese von spezifischen Mutationen

Das QuikChange Site directed Mutagenesis Kit (Stratagene) wurde zur Rekonstruktion von Punktmutationen in doppelsträngige DNA verwendet. Spezifisch veränderte Primer für zielgerichtete Basensubstitutionen waren von 32-43 bp Länge, wobei die Substitution(en) zentral in den Primer eingefügt wurden. Für Deletionen wurden Primer verwendet, die an die zu deletierende Region angrenzten. Sowohl die Mutagenese-PCR als auch der Verdau der Matrizen-DNA mit *Dpn* I erfolgten nach Herstellerangaben. Zur Überprüfung auf das Vorhandensein der konstruierten Mutation wurden kompetente Bakterien (*E. coli* DH5α, siehe 2.1.11), mit der konstruierten Plasmid-DNA transformiert, anschließend das Plasmid isoliert und nach dem Sanger-Verfahren sequenziert.

2.2.1.3 Agarose Gelelektrophorese

Zur Auftrennung von DNA-Fragmenten nach erfolgter PCR-Reaktion und nach Einsatz von Restriktionsenzymen an Plasmiden wurden Agarosegele (1 % - 2 %) in 1xTBE-Puffer (445

mM Tris-Base, 445 mM Borsäure, 10 mM EDTA) angesetzt, 0,33 µg/ml Ethidiumbromid zugegeben und anschließend in Agarosegelkammern gehärtet. Die DNA-Proben wurden mit einem DNA-Probenpuffer (0,1 % Bromphenolblau, 0,1 % Xylen Cyanol, 25 % Glycerin, 10 mM EDTA) versetzt und nach Einsatz in die Agarosegeltaschen bei 100-130 V für 30-60 min, je nach DNA Fragmentlänge aufgetrennt. Als Laufpuffer wurde 1xTBE-Puffer verwendet. Zur Größenbestimmung diente ein passender DNA-Größenmarker, welcher zusammen mit dem DNA-Fragment unter einen UV-Tisch sichtbar und mit einer Kamera festgehalten werden konnte.

2.2.1.4 DNA-Extraktion

Die in der Agarose Gelelektrophorese (Abschnitt 2.2.1.3) unter UV-Licht visualisierte DNA wurde aus dem Gel mit einem Skalpell herausgeschnitten. Mit dem QIAquick Gel extraction Kit (Qiagen) wurde anschließend gezielt entsprechend dem Herstellerprotokoll die DNA extrahiert.

2.2.1.5 Restriktionsendonukleaseverdau

Zur Spaltung von DNA wurden Restriktionsendonukleasen der Firma Fermentas zusammen mit den mitgelieferten Puffern verwendet. Die zu spaltende Plasmid-DNA wurde im Verhältnis 1 µg DNA zu 20 Einheiten Restriktionsendonuklease in einem 20-50 µl Gesamtvolumen für 3-20 h, meist über Nacht, bei 37 °C verdaut. Dabei betrug die zugegebene Menge der Restriktionsendonuklease maximal 10 % des Reaktionsvolumens, um eine Hemmung der Enzymaktivität durch zu hohe Glycerinkonzentration zu verhindern.

2.2.1.6 Ligation

Die Ligation von DNA-Fragmenten mit der Vektor-DNA (siehe 2.1.9) wurde mit der T4-DNA-Ligase (Roche) in einem Gesamtvolumen von 10 µl durchgeführt. 10-20 ng Vektor-DNA wurden dafür mit einem dreifachen Überschuss an DNA-Fragment versetzt und mit 1µl T4-DNA-Ligase für 1 h bei RT inkubiert.

2.2.1.7 Transformation kompetenter Bakterien

Für die Transformation wurden 5 µl eines Ligationsansatzes mit 50 µl einer aufgetauten Suspension kompetenter *E.coli* DH5α -Bakterien gemischt und 20 min auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock von 2 min im Wasserbad bei 42 °C wurden 500 µl LB-Medium hinzugegeben und 1 h bei 37 °C unter schütteln inkubiert. Anschließend wurden die transformierten Bakterien entsprechend des Plasmid-Selektionsmarkers auf LB-Agar-Platten

mit dem jeweiligen Antibiotikum (+Ampicillin–Endkonzentration 100 µg/ml oder Kanamycin- Endkonzentration 35 µg/ml oder beides) ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

2.2.1.8 Analytische Plasmid-Isolierung (Mini-Präparation)

Je ein aus der Transformation erzeugter Bakterienklon von der Agarplatte wurde in 3 ml Antibiotikum versetztes LB-Medium über Nacht für ca. 16 h bei 37 °C und 250 rpm angeimpft. Für die analytische Plasmid-Isolierung wurden je 1,5 ml der Übernachtskulturen erst sedimentiert (5 min, 5000 rpm), anschließend das Pellet in 300 µl P1-Puffer (10 mM EDTA, 50 mM Tris-HCL- pH 8,0, 100 µg/ml RNase) resuspendiert und nach erneuter Sedimentation (1 min, 600 rpm) durch Zugabe von 300 µl P2-Puffer (0,2 M NaOH, 1 % SDS) lysiert. Anschließend wurden dem Sediment 300 µl eiskalter Puffer 3 (3 M Kaliumacetat) hinzugegeben, was zur Fällung der SDS-Protein-Komplexe führte. Nach Zentrifugation (15 min, 10000 rpm, 4 °C) wurde der Überstand in einem neuen Reaktionsgefäß mit 100 %igem Ethanol versetzt und anschließend die DNA gefällt (20 min, 13000 rpm, 4 °C) und in 300 µl 70 %igem Ethanol gewaschen, getrocknet und in 20-50 µl H₂O aufgenommen.

2.2.1.9 Präparative Plasmid-Isolierung (Midi-Präparation) und Konzentrationsbestimmung

Das „Pure Yield Plasmid-Midiprep-System“ (Promega) wurde zur Gewinnung größerer Mengen gereinigter Plasmid-DNA verwendet. 100 ml LB-Medium mit Antibiotikumzusatz wurden mit der als positiv identifizierten Übernachtskultur der Mini-Präparation über Nacht angeimpft. Die Bakteriensuspension wurde anschließend sedimentiert und die Plasmid-DNA nach Herstellerangaben über Ionenaustauscher-Säulen aufgereinigt. Die DNA wurden anschließend in H₂O aufgenommen. Für die funktionellen Analysen war eine genaue Konzentrationsbestimmung nötig. Diese wurde mit dem Spektralphotometer bei einer Wellenlänge von $\lambda = 260$ nm und 280 nm nach Verdünnung der DNA in Wasser bestimmt. Eine optische Dichte (OD) von 1 bei 260 nm entspricht 50 µg/ml doppelsträngiger DNA. Bei proteinfreier DNA beträgt der Quotient aus der OD bei 260 nm und der OD bei 280 nm 1,8.

2.2.1.10 DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierung der Plasmid-DNA erfolgte zum Ausschluss von im Klonierungsverlauf entstandenden Mutationen nach dem Prinzip des Kettenabbruchs bei Einbau von Didesoxyribonukleotiden (Sanger et al., 1977) mit dem BigdyeTerminatorCyle

ReadyReactionKit. 2 µl Sequenzier-Mix wurden zusammen mit 20 ng Plasmid-DNA und 5µM Sequenzierprimer in ein Reaktionsvolumen von 10 µl zugesetzt. Dieser Ansatz wurde nach folgenden Parametern einer Sequenzierreaktion unterworfen: Initiale Denaturierung bei 96 °C für 1 min, anschließend 25 Zyklen bestehend aus Denaturierung bei 96 °C 10 sec, Annealing 5 sec mit Primer-spezifischer Temperatur, Elongation 60 sec bei 60 °C.

Die Reaktionsprodukte wurden aufgereinigt (Qiagen „DyeEx 2.0 Spin Kit“) und 15 µl davon mit 5 µl Formamid (HiHi-Formamid-Applied Biosystems) zur Sequenzierung in eine Messplatte überführt. Die Sequenzieranalyse erfolgte an einem 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) mit den Programmen SeqMan und EditSeq (DNASStar).

2.2.2 Zellbiologische Grundlagen

2.2.2.1 Kultivierung von Zellen

Die Zelllinien wurden in Brutschränken bei 37 °C unter Begasung mit 5 % CO₂ in wassergesättigter Atmosphäre als subkonfluente Monolayer in DMEM 101 versetzt kultiviert. Die Untersuchungen wurden ausnahmslos unter der Sterilbank durchgeführt und sämtliche Geräte und Lösungen vor Benutzung sterilisiert.

2.2.2.2 Passagieren von Zellen

Für das Passagieren von Zellkulturen wurde das Kulturmedium von den adhärent wachsenden Zelllinien vollständig abgesaugt, anschließend die Zellen mit PBS gewaschen und die subkonfluenten Zell-Monolayer durch eine dreiminütige Inkubation bei 37 °C mit Trypsin/EDTA abgelöst. Im Kulturmedium wurde ein Teil der Zellen auf andere Zellkulturschalen verteilt. Sollte eine bestimmte Zelldichte für die Experimente benötigt werden, wurde diese mittels Neubauer-Zählkammer ermittelt.

2.2.2.3 Transiente Transfektion von Zellen

Je nach Zielsetzung des Experiments wurden für die Transfektion von Säugerzellen zwei Methoden angewendet.

2.2.2.3.1 Elektroporation

Für Expressionsstudien erfolgte die Transfektion von Säugerzellen mittels Elektroporation. Durch Anlegen eines elektrischen Feldes permeabilisiert die Zellmembran, so dass die Plasmid-DNA von den Zellen aufgenommen werden kann. Die Zellen wurden hierfür bei

circa 80 % Konfluenz nach Kultivierung von einer 15 Ø Zellkulturschale geerntet und in 2x 200 µl DMEM Medium (ohne FBS und Antibiotika) für 2 Transfektionsansätze zugeteilt und anschließend mit der gleichen DNA-Menge (1-5 µg) versetzt. Die Zellen wurden in Elektroporationsküvetten im Genepulser (BioRad) meist mit einer Spannung von 75 V für circa 10 ms behandelt, dann erneut resuspendiert und auf 10 Ø cm Platten (Nunclon Surface) überführt. 24 Stunden wurden die Zellen im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert und anschließend geerntet

2.2.2.3.2 Transfektion mittels FuGENE® (Roche)

Für Luciferase Reporter-Experimente wurden für eine höhere Transfektionseffizienz HeLa- bzw. SH-SY5Y- Zellen mittels Lipofektion unter Verwendung von kationischen Lipiden (FuGENE®) transfiziert. Vorab wurden die zu transfizierenden Zellen mit je 20 000 Zellen/Well in 24 Well Zellkulturplatten ausgesät und ein Tag bei 37 °C inkubiert. Der Transfektionsansatz bestand aus 100 µl serumfreies Medium (Opti-MEM®), 0,25-1 µg Plasmid und der dreifachen Menge an FuGENE® bezogen auf die Menge der eingesetzten Plasmide (w/v). Nach circa 20 minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde der Ansatz tröpfchenweise auf die für die Transfektion vorbereiteten Zellen (HeLA und SH-SY5Y-Zellen) nach erfolgten Mediumwechsel gegeben und für 24 h bei 37 °C inkubiert.

2.2.3 Reporter-Gen-Assay (Luciferase-Reporter-Assay)

Zur Untersuchung funktioneller Mechanismen und Faktoren der Gen-Expression, hier im speziellen der *TORIA*-Promotoraktivität (siehe 3.1) und der Eigenschaften des THAP1-Proteins auf den *TORIA*-Promotor (siehe 3.1, 3.3), wurden Luciferase-Reporter-Experimente angewendet. Hierzu wurden spezifische Reporterplasmide (pGL4-Serie, Promega), welche für das modifizierte *firefly* Luciferase-Gen *luc2* (*Photium pyralis*, pGL4.10) oder das *Renilla hRluc* Luciferase-Gen (*Renilla Reniformis* pGL4.74) kodieren, verwendet. Durch Insertion variabler DNA-Sequenzen (hier beispielsweise die *TORIA*-Promotorsequenz) konnte deren Einfluss auf die Expression des *LUC*-Reportergens analysiert werden. Um die regulative Eigenschaft von Proteinen, beispielsweise Transkriptionsfaktoren auf die Gen-Expression zu charakterisieren, wurden zusätzliche Expressionsvektoren benötigt (hier THAP1-FLAG/THAP1-myc und Varianten). Die transiente Transfektion entsprechender Zellen (circa 30 % Konfluenz) erfolgte mittels FuGENE® (siehe 2.2.2.3.2) für 24 Stunden bei 37 °C. Die transfizierten Zellen wurden bei ausreichender Konfluenz (ca. 70 %) am folgendem Tag 2 x mit PBS gewaschen und in 100 µl Lysepuffer (PROMEGA-Kit) für 15 min bei RT unter

leichtem schütteln inkubiert. 20 µl des Zellysats wurden anschließend in eine 96 Well-Microplatte überführt und die Substrat-Lösung des DUAL Luciferase Reporter Assay-Kits (Promega) hinzugefügt. Die Expressionsaktivität des jeweiligen Reportergens ist proportional zur Menge des Reporter-Genprodukts, welches die zugegebenen Substrate des DUAL Luciferase Reporter Assay-Kits entsprechend der gebildeten Enzymmenge umsetzte. Diese Enzymreaktion konnte luminometrisch erfasst werden (Luminometer LB 942 Tristar², Berthold Technologies) und ermöglichte durch ihre Proportionalität eine quantitative Analyse der *Luciferase*-Gen-Expression. Zur Normierung der firefly-Messwerte (pGL4.10) bzw. als Kontrolle der Transfektionseffizienz, wurde zu jeder Transfektion das pGL4.74-Plasmid zugesetzt, welches für die *Renilla hRluc* Luciferase kodiert. Mittels Microwin und Microsoft Excel wurden die Messwerte im Anschluss analysiert und die relative Luciferaseaktivität bestimmt. Jeder Versuch wurde als Triplet in mindestens drei unabhängigen Versuchsansätzen wiederholt und die ermittelten Daten gemittelt.

2.2.4 Chromatin Immunopräzipitation (ChIP)

Zur Analyse von *in-vivo* Protein-DNA-Bindungen wurden Chromatin Immunopräzipitationen nach den Maßgaben von *Current Protocols* (<http://www.currentprotocols.com>) durchgeführt. Das Prinzip der ChIP beruht auf einem temporären „crosslink“, der Verknüpfung von Proteinen an die DNA, die nach einer spezifischen Immunpräzipitation mit einer finalen PCR-Analyse nachgewiesen werden können. Für die ChIP wurden native SH-SY5Y Zellen und mit THAP1-FLAG bzw. als Negativkontrolle mit FLAG-Expressionsplasmid transfizierte SH-SY5Y Zellen (FuGene-HD®, Roche, siehe 2.2.2.3.2) untersucht. Bei ausreichender Konfluenz (ca. 70 %, ca. 10⁶ Zellen insgesamt) wurden die Zellen zweimal mit PBS bei RT gewaschen, in 40 ml DMEM 101 resuspendiert und 10 min mit je 4 ml einer „Crosslinking-Lösung“ (11 % Formaldehyd, 0,1 M NaCl, 2,7 mM KCL, 1 mM EDTA, 0,5 mM EGTA, 50 mM HERPES pH 8,0) auf Eis behandelt. Formaldehyd bewirkt die Ausbildung von reversiblen Quervernetzungen zwischen der DNA und den zu diesem Zeitpunkt daran bindenden Proteinen (*crosslink*) mit dem Resultat von fixierten Protein-DNA Komplexen. Gestoppt wurde die Vernetzungsreaktion durch Zugabe einer auf 2,5 M eingestellten Glycin-Lösung. Diese Lösung wurde pelletiert (2,000 RPM, 4 °C, 10 min) und erneut zweimal mit PBS gewaschen. Die folgende Zellyse erfolgte in drei Schritten mit drei verschiedenen Lysepuffern (I-III).

I) 10 min bei 4 °C mit 15 ml von Lysepuffer-1: 50 mM HEPES -KOH pH 7,5, 0,14 M NaCl, 1 µM EDTA, 10 % Glycin, 0,5 % NP40, 0,25 % TritonX-100 + 250:1 PIC (Proteinase Inhibitor Cocktail) mischen und anschließend 10 min zentrifugieren bei 4 °C mit 2,000 g und den Überstand verwerfen

II) Sediment 10 min bei RT in 12 ml Lysepuffer-2 lösen (0,2 M NaCl, 1 µM EDTA, 0,5 µM EGTA, 10 µM Tris pH 8,0 + 250:1 PIC) und anschließend zentrifugieren (2,000 g, 10 min, 4 °C) und den Überstand verwerfen

III) Sediment in 5 ml Lysepuffer-3: 1 µM EDTA, 0,5 µM EGTA, 10 µM Tris, pH8,0, Sarkosyl (N- lauroylsarcosin- 0,5%) + 250:1 PIC resuspendieren.

Nach Lyse der Zellen, folgte die Fragmentierung der DNA-Protein-Komplexe auf Längen von 500-1000 Basenpaaren. Diese wurde durch Ultraschall mit einer Stabsonde (13-15 Zyklen je 20 sec, Pulsieren: aus, Amplitude: 60%) in 15 ml Sarstedt Röhrchen mit je 5 ml der ChIP - Ansätze auf Eis erreicht. Nach anschließender 10 minütiger Zentrifugation bei 10000 g und Gewinnung des Überstandes wurde ein Teil des Lysats als „Input“ beiseitegelegt und die Fragmentierung des Chromatins nach Proteinauswaschung auf einem 1 % Agarosegel getestet. Um nun gezielt eine Protein-DNA Bindung -hier THAP1-DNA- aus den zahlreichen fixierten Komplexen der fragmentierten DNA zu selektieren und unspezifisch bindende Proteine zu entfernen wurden Antikörper gegen den FLAG-tag und THAP1 verwendet. Die Chromatin-Lösung wurde dafür mit anti-FLAG M2 Agarose (Calbiochem) nach Absättigung von unspezifischen Bindestellen mit Lachssperma DNA-Lösung (Ambion) und mit einer THAP1 Antikörper beladenen Agarose inkubiert. Die ChIP Ansätze wurden anschließend drei- bis fünfmal gewaschen (RIPA Puffer gekühlt), in jeweils 50µl Eluationspuffer (50 mM Tris, 10 mM EDTA, 1 % SDS) aufgenommen und die Interaktion zwischen Agarose-Matrix und Antikörpern sowie der Antikörper mit den spezifischen Proteinen bei 65 °C und 450 rpm 10 min getrennt. Nach Zentrifugation für 1 min bei 2000 g und 4 °C wurde der Überstand mit einem dreifachen Volumen an Revers-crosslink-Puffer (0,3 M NaCl, 50 mM NaHCO₃, 1 % SDS), zur Aufhebung der DNA-Proteinbindung, versetzt und über Nacht bei 65 °C inkubiert. Die Zugabe der 2,5-fachen Menge von 100 % Ethanol über Nacht bei -20 °C mit anschließender 30 minütiger Zentrifugation mit 14000 rpm bei 4 °C führte zur Fällung der THAP1-spezifischen DNA. Nach Abnahme des Überstands wurde einmalig mit 70 % Ethanol gewaschen, und nach erneutem pelletieren (14000 rpm, 5 min, 4 °C) die DNA im Vakuum getrocknet. Die überflüssigen Proteine wurden bei 37 °C 2 h mit 120 µl Proteinase K Lösung (2 % Glycogen, 5 % 20 mg/ml Proteinase in TE Puffer) und Phenol-Chloroform im 0,5:0,5

Volumenverhältnis mit anschließender Phasentrennung bei 14000 rpm, 30 sec-1 min entfernt. Die getrennte Phase wurde auf ein frisches 1,5 ml Eppi übertragen und diesem erst 200 mM NaCl zur Erhöhung der Präzipitationseffizienz dann das 2,5 fache Volumen 100 % Ethanol zugegeben. Abschließend erfolgten die Trocknung des gereinigten Präzipitats im Vakuum und die Aufnahme der DNA in 40 µl PCR-Wasser.

Um festzustellen ob eine Bindung zwischen der vermuteten Chromatin-Region (hier der *TORIA*-Kernpromotor) und dem untersuchten Protein (hier THAP1) bestand, wurden PCR-Analysen an den bei -80 °C gelagerten immunpräzipitierten DNA-Fragmenten durchgeführt. Dafür wurden Primer für den 221 bp *TORIA*-Kernpromotor (siehe 2.1.10) verwendet. Parallel liefen Negativkontrollen, mit Primer für einen 263 bp irrelevanten Promotor und Positivkontrollen mit eingesetzten Plasmid und dem erhaltenen Chromatin-Input. (siehe 3.1 Abbildung 4)

2.2.5 Proteinanalytische Methoden: SDS-PAGE/ Immunoblot

Den spezifischen Nachweis der THAP1-Expression in den verwendeten Zelllinien wurde durch die Lysierung der Zellen, gefolgt von der diskontinuierlichen elektrischen Proteinauftrennung mittels SDS-PAGE und dem anschließendem Immunoblot (Western-Blotting) erbracht. Dazu wurden vorab HeLa und SH-SY5Y Zellen mit THAP1-Expressionsplasmiden (FLAG, myc) transfiziert, nach 24 h Inkubation geerntet, mit PBS gewaschen und anschließend sedimentiert (1000 rpm, 5 min). Die Trennung der zellulären Proteine von Zellkernen und sonstigen Zellbestandteilen erfolgte dann durch die 10 minütige chemische Zellyse mit RIPA-Puffer (50 mM HEPES, pH 7,6, 1 mM EDTA, 1 % NP-40, 0,5 Lithiumchlorid), ca. 30-200 µl (je nach Zellzahl) und dem Proteinase-Inhibitor-Cocktail (PIC, 250:1) bei 4 °C und der nachfolgenden Zentrifugation (10000 rpm, 10 min, 4 °C). Überstand und Zellsediment wurden anschließend mit 50 µl bzw. 100 µl 4 % SDS Probenpuffer (62 mM Tris-HCL, pH 6,8, 10 % Glycin, 2 % SDS, 5 % DTT, 0,025 % Bromphenolblau + frisch 5 % β-Mercaptoethanol) bei 95 °C für 5 min denaturiert.

Im nächsten Schritt wurden die Lysate in diskontinuierlichen, denaturierenden Polyacrylamidgelen (10 - 16 %, je nach Größe der Proteine) elektrophoretisch nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Bei dieser SDS-PAGE (Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese) wurden Zweiphasen-Gele (siehe Tabelle 2), in einem 10x SDS-Laufpuffer (1,34 M Tris-OH, 2 M Glycin, 1 % SDS) verwendet. Als Größenstandard wurde PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder (Fermentas) mitgeführt.

Tabelle 2: Schema zur Herstellung von SDS- Polyacrylgele

	Sammelgel		Trenngel	
	4 %	10 %	12 %	16 %
Sammel/Trenn-Puffer	1,25 ml		2,5 ml	
AA/AB	0,65 ml	3,3 ml	4,2 ml	5,3 ml
Wasser	3,1 ml	4,0 ml	3,2 ml	2,0 ml
10 % APS	75 µl		150 µl	
TEMED	7,5 µl		15 µl	

Sammelpuffer: 0,5 M Tris-HCL, pH 6,8 + 0,4 % SDS Trennpuffer: 1,5 M Tris-HCL, pH 8,8 + 0,4 % SDS, APS: Ammoniumperoxidsulfat, AA/AB: 30 % Acrylamid/0,8 % Bisacrylamid, TEMED: N,N,N',N'Tetramethyldiamin

Zum Transfer der nach Molekulargewicht aufgetrennten Proteine auf eine Polyvinylidendifluorid (PVDF)-Membran (Roche) diente das Semi-Dry-Verfahren (Transfer-Apparatur, Transblot SD, BIO-RAD). Dazu wurde auf der (Graphit)-Anode ein Blot in folgender Reihenfolge aufgeschichtet: Zwei Whatman 3 mm-Papiere, das SDS-PAGE-Gel, die PVDF-Membran und erneut zwei Whatman 3 mm-Papiere. Die PVDF-Membran wurde zuvor in 100 % Methanol aktiviert dann wie das SDS-PAGE-Gel und die Whatman-Papiere in Transfer-Puffer (5,2 g/l Tris-OH, 2,93 g/l Glycin, 3,75 ml/l 10 % SDS, 200 ml Methanol) angefeuchtet. Der *Blot* erfolgt in 1,5 h bis 2 h bei 100 mA, als Kontrolle diente die sichtbare Übertragung des Markers. Nach dem *Blot* wurde die Membran erst luftgetrocknet und erneut in 100 % Methanol aktiviert. Anschließend erfolgte eine Inkubation über eine Stunde in 4 % Milch bei 4 °C (4 g Milchpulver in 100 ml PBS) um unspezifische Bindungsstellen auf der Membran abzusättigen. Die Bindung mit einem spezifischen Antikörper, dem „Primärantikörper“, gegen entweder das gesuchte Protein -THAP1- hier jedoch gegen das Fusionsprotein anti-FLAG M2 (Sigma) oder anti-c-myc (Roche) in 10 ml 4 % Milch einer vorbereiteten 1:1000 Verdünnung erfolgte über Nacht bei 4 °C. Danach wurde die Membran nach dreimaligem Waschen mit PBS mit einem zweiten Antikörper („Sekundärantikörper“) hier mit 1:5000 verdünntem „Meerrettich Peroxidase- (HRP) konjugierter anti Maus-Ig G“ 3 h behandelt, welcher spezifisch an den Primärantikörper bindet. Sekundärantikörper sind mit einem Enzym gekoppelt, das sein Substrat zum Leuchten anregen und somit den gebunden Komplex sichtbar machen kann. („Chemilumineszenz“). Nach erneutem dreimaligen Waschen mit PBS wurde die Membran in einer Entwicklungskassette mit diesem Substrat (Entwicklungslösung) im Dunkeln für 30 sec -5 min inkubiert, sodass das gesuchte Protein anhand der Lichtreaktion detektiert werden konnte.

3 Ergebnisse

3.1 Der Transkriptionsfaktor THAP1, ein Schlüsselprotein der *TORIA*-(*DYT1*-) Genregulation?

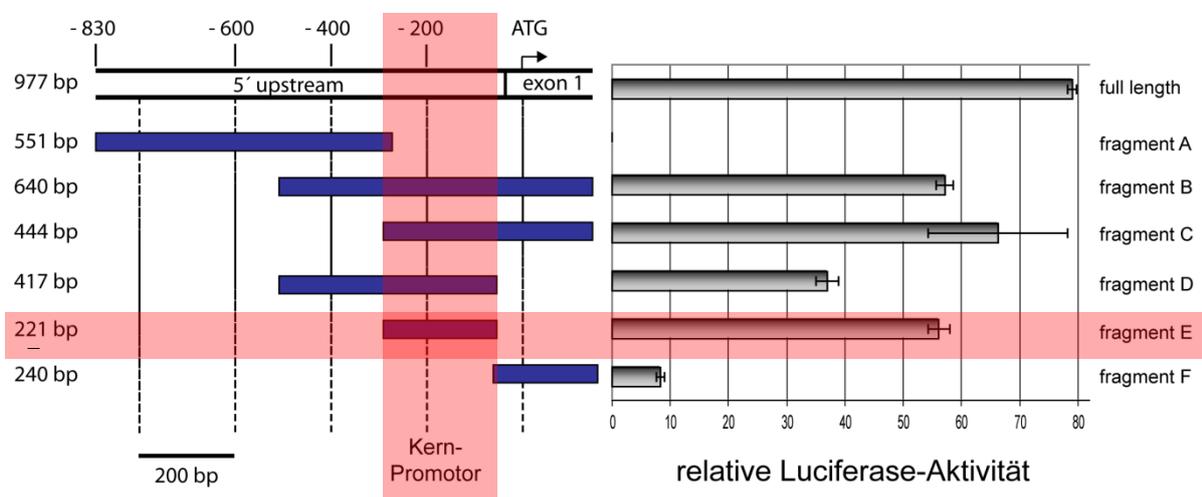
DNA-Microarray-Analysen von Cayrol und Mitarbeitern, gaben bereits im Jahr 2007 Hinweise auf eine wichtige Funktion von THAP1 bei der Regulation der Genexpression. (Cayrol et al., 2007). Durch die gezielte THAP1-Überexpression und -„Herunterregulierung“ in Endothelzellen wurden Veränderungen der Expression, zum einen von Zielgenen der G1/S-Zellzyklusprogression darunter *RRM1*, *Mad2*, *survivin*, und zum anderen von vielen weiteren nicht näher kategorisierten Genen, u.a *LAMB3*, *UCHL1*, *FOXL2*, festgestellt (Cayrol et al., 2007). Neben dieser ersten funktionellen Assoziation zeigten Untersuchungen der THAP1-Proteinstruktur, eine DNA-Bindedomäne und weitere funktionelle Regionen, welche zusätzliche Anhaltspunkte für die Bedeutung von THAP1 in der Genregulation ergaben (Clouaire et al., 2005). Mittels Kopplungsanalysen und sich daran anschließenden DNA-Sequenzierung von Kandidatengenen, konnten Mutationen im *THAP1*-Gen als genetische Ursache der DYT6-Dystonie identifiziert werden. Neben dem Dystonie 1-assoziierten *TORIA*-Gen ist bzw. war das *THAP1*-Gen erst das zweite identifizierte Gen welches mit der Entstehung einer primären Dystonien assoziiert werden konnte (Fuchs et al., 2009). Basierend auf der klinischen Ähnlichkeit der DYT6- und DYT1-Dystonien, in Kombination mit den funktionellen Eigenschaften von THAP1, verfolgten wir die Arbeitshypothese einer funktionellen Verknüpfung, im Sinne einer möglichen Regulation des *TORIA*-Gens durch den Transkriptionsfaktor THAP1.

3.1.1 Charakterisierung des *TORIA*-Kernpromotors

Zunächst wurden *in-silico* Analysen zur Identifizierung des *TORIA*-Promotors durchgeführt. Mit Hilfe von Vorhersage-Programmen wie *AliBaba2.1* und *Promotor prediction* konnten Bindemotive allgemeiner Transkriptionsfaktoren, wie c-Myc, Sp-1 und NF-1, die einen funktionellen Promotorbereich anzeigen, innerhalb eines 977 bp Bereichs um den Transkriptionsstart von *TORIA* {-830;+147} nachgewiesen werden. ChIP-Analysen im Rahmen des ENCODE (*Encyclopedia of DNA Elements*)- Projekts bestätigen die Bindung der allgemeinen Transkriptionsfaktoren (GTFs) in den 977 bp umfassenden Zielpromotorbereich. Ferner ließen sich innerhalb der ENCODE-Datenbank spezifische

posttranslationale Modifikationen des Histon-Proteins 3 (H3K4me3) als eine typische epigenetische Markierung eines aktiven Promotors in dem vorhergesagten Promotorbereich aufzeigen. Zur funktionellen Analyse des potentiellen Promotors wurde das entsprechende 977 bp überspannende Fragment (*TORIA*-Promotorfragment) an genomischer DNA amplifiziert und anschließend in das pGL4.10 Reporter-Plasmid *upstream* des *Luciferase*-Gens inseriert. Der Luciferase-Assay wurde, wie im Abschnitt 2.2.3 beschrieben in transient transfizierten HeLa und SH-SY5Y Zellen durchgeführt und in mindestens drei unabhängigen Experimenten verifiziert. Dabei zeigte sich eine deutlich verstärkte Aktivierung der Luciferase-Expression durch den vorgeschalteten *TORIA*-Promotor mit 80-fach stärkerer Aktivität in HeLa Zellen und ca. 60-facher Aktivität in SH-SY5Y Zellen, im Vergleich zur pGL4.10 Basalaktivität (Abbildung 2A). Durch die Bindung und Steuerung des Protein-Initiationskomplexes wird dem Kernbereich eines Promotors eine besonders kritische Rolle in der Genregulation beigemessen. Um diesen Kernbereich aus dem ermittelten funktionellen 977 bp *TORIA*-Promotor zu identifizieren, wurden sechs überlappende Konstrukte unterschiedlicher Größe generiert und auf ihre individuelle Aktivität getestet. Anhand der spezifischen Luciferase-Expression, der jeweiligen dem *Luciferase*-Gen im pGL4.10 Plasmid vorgeschalteten *TORIA*-Promotorkonstrukte, gelang die Eingrenzung der Kernpromotor-Region auf 221 Basenpaare 5' zum Startcodon (siehe Abbildung 2A). Anschließende Sequenzanalysen des eingegrenzten und funktionell verifizierten *TORIA*-Kernpromotors deckten sogenannte THABS (*THAP-binding site*), THAP Bindemotive, auf. Hierzu gehört eine für das THAP1-Protein charakteristische Bindesequenz $5'TxxxGGCA^3'$ und ein inverses, zweigeteiltes, für die gesamte THAP-Familie geltendes, Bindemotiv $3'TxxGGx(A/T)^5'$ (siehe Abbildung 2B) (Clouaire et al., 2005; Sabogal et al., 2010).

A



B

```

5' - CAGGTGATCCGCCCGCCTCAGCCTCCCAAAGGGCTGGGATTTACAGGCAGGAGCCACCATGCCTG
3' - GTCCACTAGGCGGGCGGAGTCGGAGGGTTTCCCGACCTAAATGTCCGTCCTCGGTGGTACGGAC

GCAAAAATAACGTCCATAAAACAAAAACACGTGGCCAACAGGGGCGGAGCAGAACCGAGTTTCCGGAAG
CGTTTTTATTGCAGGTATTTGTTTTTGTGCACCGGTTGTCCCGCCTCGTCTTGGCTCAAAGGCCTTC

CAAACAGGGCTTTGTACCGAACAAAGATGGCGGCCGCCGGCGTCGGGAGGAGGGCTTGCCCTGAAAGAA
GTTTTGTCCCGAAACATGGCTTGTCTTCTACCGCCGGCGGCCGAGCCCTCCTCCCGACGGGACTTCTT

AGATGGCCTCCGCGAGAGGAG -3'
TCTACCGGAGGCGCTCTCCTC -5'

```

Abbildung 2: Charakterisierung des *TORIA*-Kernpromotors (A) Ein 977 bp Fragment der 5' Region von *TORIA* mit Einschluss des ersten Exons (full-length) führt zur etwa 80-fach stärkeren Aktivierung der Reporter-Gen-Expression bezogen auf die Plamidbasalaktivität in HeLa-Zellen. Durch überlappende Promotorkonstrukte (fragment A-F) konnte der Kernpromotor auf eine 221 bp Region 5' aufwärts des ersten Exons eingegrenzt werden (fragment E) (B) Innerhalb der *TORIA*-Kernpromotorsequenz lassen sich ein THAP1-spezifisches Bindemotiv TxxxGGCA (schwarz) und eine inverse THAP-Familien assoziierte Konsensusbindesequenz TxxGGx(A/T) (grau) abgrenzen

3.1.2 THAP1 reguliert die *TORIA*-Kernpromotoraktivität

Zur weiteren Charakterisierung einer möglichen funktionellen bzw. physiologischen Interaktion zwischen THAP1 und dem identifizierten *TORIA*-Kernpromotor erfolgten zellbiologische *in-vitro* und *in-vivo* Untersuchungen. Der kodierende Bereich (offene Leseraster, *open reading frame* ORF) von *THAP1* wurde hierzu in geeignete Expressionsvektoren inseriert und somit das THAP1-Protein mit verschiedenen „Proteintags“ (FLAG, c-myc) fusioniert. Die Expression der generierten THAP1-Fusionskonstrukte in entsprechend transfizierten HeLa und SH-SY5Y Zellen wurde durch Immunoblot Analysen unter Verwendung spezifischer Antikörper nachgewiesen (siehe Abbildung 3A), sodass anschließend in Luciferase-Reporter-Experimenten der Einfluss von THAP1 auf die *TORIA*-Promotoraktivität untersucht werden konnte. Hierzu wurden HeLa und SH-SY5Y Zellen mit dem *TORIA*-pGL4.10 Reporter-Plasmid und dem *THAP1*-Fusionsplasmid co-transfiziert und die ermittelte Luciferase Aktivität auf die zuvor bestimmte *TORIA*-pGL4.10 Referenzaktivität bezogen. Die Versuchsergebnisse zeigten, dass das THAP1-Protein einen konzentrationsabhängigen, bis zu fast vollständigen Verlust der Luciferase Aktivität

verursacht. Somit ließ sich eine regulative Funktion in Form einer THAP1-Proteinvermittelten-Reduktion der *TOR1A*-Kernpromotoraktivität aufzeigen. Kontrollexperimente mit zwei weiteren im Labor verfügbaren Promotoren konnten eine unspezifische THAP1-vermittelte-Regulation ausschließen (siehe Abbildung 3B).

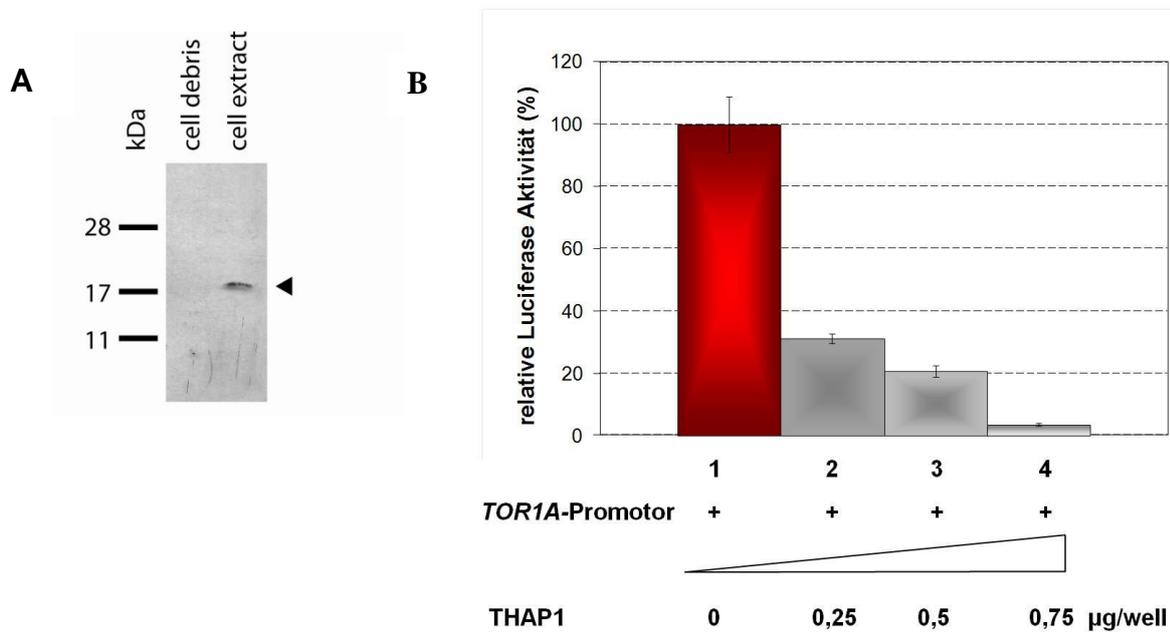


Abbildung 3: wtTHAP1-Expression und sein Effekt auf den *TOR1A*-Kernpromotor (A) Nachweis der THAP1-FLAG Expression in HeLa-Zellen nach Präzipitation mit einem Anti M2-FLAG spezifischen Antikörper (B) In transient co-transfizierten HeLa-Zellen reprimiert THAP1 die *TOR1A*-Kernpromotoraktivität, hier als relative Luciferaseaktivität angezeigt, in konzentrationsabhängiger Weise.

3.1.3 THAP1 bindet *in-vivo* an den *TOR1A*-Kernpromotor

Zur weiteren Validierung des mittels Reporter-Gen-Analysen gezeigten regulativen Effektes von THAP1 auf die *TOR1A*-Promotoraktivität wurden Chromatin Immunopräzipitations-Analysen durchgeführt. Diese Analysen (siehe Abschnitt 2.2.4) sollten die spezifische Bindung des Transkriptionsfaktors THAP1 an die *TOR1A*-Promotorregion auf Chromatin-Ebene untersuchen. Dazu wurden SH-SY5Y Zellen mit THAP-Expressionsvektoren (FLAG) transfiziert und THAP1-Fusionsprodukte (THAP-FLAG) generiert. Zusätzlich zum überexprimierten System erfolgten parallel Untersuchungen an nativen SH-SY5Y Zellen. Hierzu wurden anti-FLAG und anti-THAP1-Antikörper verwendet mit denen spezifisch die THAP1 gebundenen DNA-Abschnitte aus dem Gesamtchromatin isoliert werden sollten. Mittels PCR-Analysen konnte der *TOR1A*-Kernpromotor, im Gegensatz zu Kontrollpromotoren, spezifisch aus den Eluaten der THAP1-ChIP amplifiziert werden.

Unspezifische Bindungen des anti-FLAG Antikörpers wurden durch die fehlende Amplifikation des *TORIA*-Promotors in ChIP-Analysen von nicht-THAP1-transfizierten Zellen ausgeschlossen. Folglich konnte die Bindung von THAP1 an den *TORIA*-Kernpromotor erstmalig an Chromatin bzw. auf chromosomaler Ebene bestätigt werden (Abbildung 4).

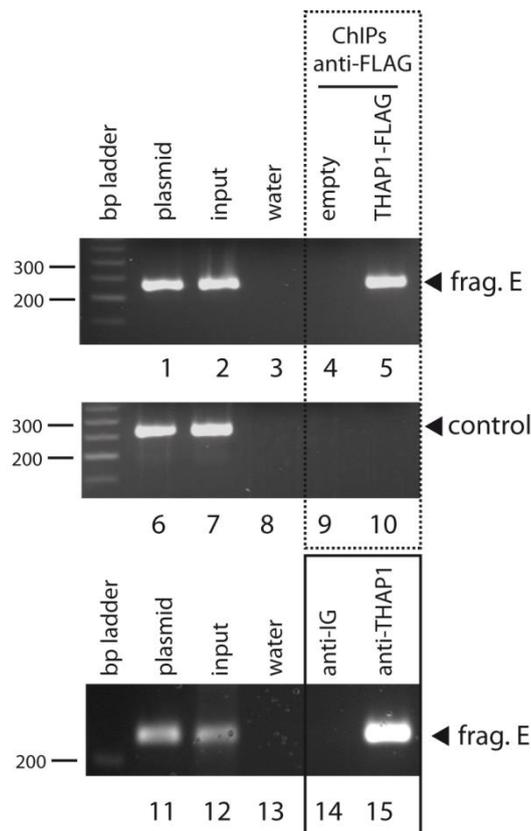


Abbildung 4: Chromatin Immunopräzipitation aus THAP1-FLAG transfizierten (Spalte 1-10) und nativen (Spalte 11-15) SH-SY5Y Zellen. Der 221 bp *TORIA*-Kernpromotor wurde erfolgreich am Kontroll-Plasmid und den verkleinerten Chromatin-Fragmenten (Input) mit den spezifischen *TORIA*-Primern amplifiziert (Spalte 1,2 und 11,12). Dasselbe Fragment konnte in den finalen ChIP Präzipitaten aus THAP1 transfizierten und nativen SH-SY5Y Zellen (Spalte 5 und 15) mittels PCR vervielfältigt werden. Kein PCR-Produkt ergab sich aus der Wasser-Kontrolle, Extrakten mit nicht transfizierten Zellen (Spalte 3 und 4) und den Anti-Immunglobulin (IG) Antikörper-Immunpräzipitaten (Spalte 14). Als weitere Kontrolle konnte ein 263 bp Promotorfragment eines „House keeping Gens“ nicht an der THAP1-spezifischen-ChIP nachgewiesen werden (Spalte10).

3.1.4 DYT6-assoziierte *THAP1*-Mutationen reduzieren die *THAP1*-Repressionsaktivität auf den *TOR1A*-Kernpromotor

Mit der Erkenntnis über die Repressionsaktivität von *THAP1* auf den *TOR1A*-Promotor wurden im nächsten Schritt die Auswirkungen der DYT6-assoziierten *THAP1*-Mutationen untersucht. Hierzu wurden die *THAP1*-Punktmutationen pArg13His und pHis23Pro überprüft, die jeweils den Austausch einer einzelnen Aminosäure direkt innerhalb der DNA-bindenden-THAP-Domäne bewirken. Mittels PCR-vermittelter-Mutagenese wurde das Arginin in Position 13 durch ein Histidin und das Histidin in Position 23 durch ein Prolin ausgetauscht (Arg13His, His23Pro). Die Expression beider Konstrukte konnte mittels Westernblot nachgewiesen werden (Abbildung 5). In den anschließenden Reporter-Gen-Analysen mit mutierten *THAP1*-Expressionsplasmiden und *TOR1A*-Promotor-co-transfizierten HeLa-Zellen konnte eine deutliche Veränderung in der Luciferase-Expression gemessen werden. Während der Austausch des Arginins 13 die *THAP1*-Funktion auf 57 % der Wildtyp-Aktivität reduziert, führt die Substitution des Histidins 23 zu einem nahezu vollständigen Funktionsverlust (Abbildung 5).

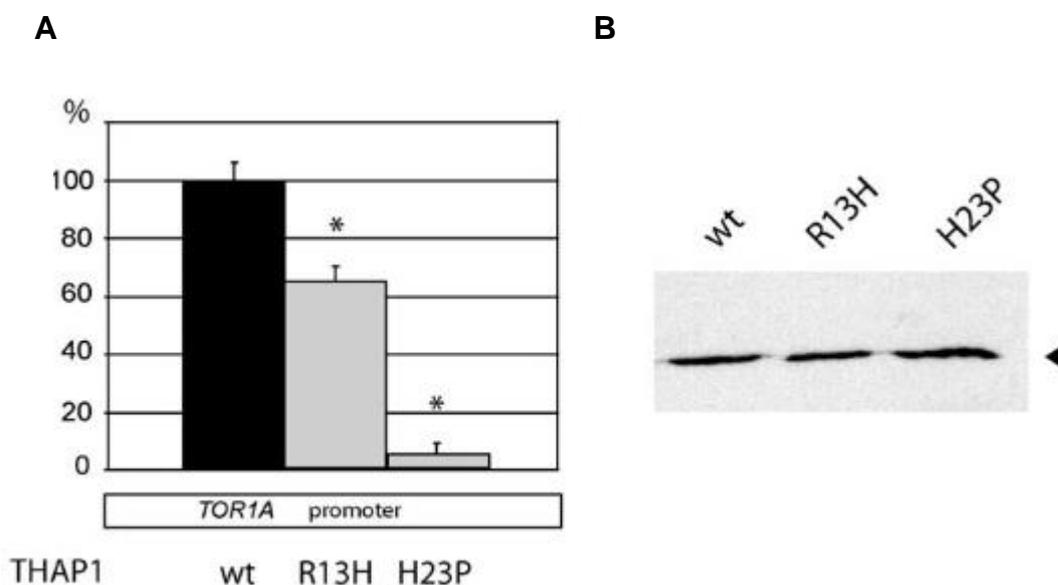


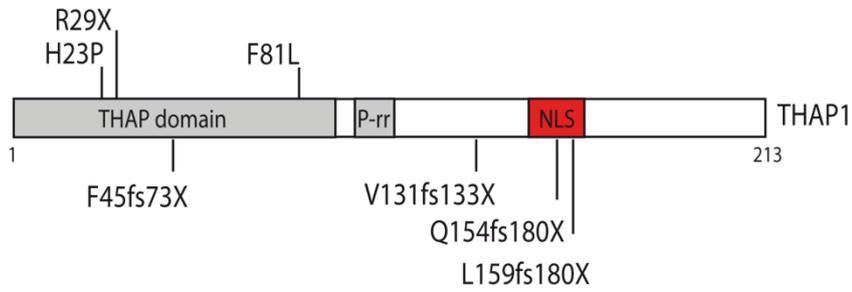
Abbildung 5: Effekt von *THAP1*-Mutationen auf die *TOR1A*-Promotoraktivität und die zelluläre Expression in HeLa-Zellen (A) *Missense*-Mutationen innerhalb der THAP-Domäne führen zu einer signifikanten Reduktion (Arg13His) oder zu einer fast vollständigen Aufhebung (His23Pro) der *THAP1*-abhängigen Repression im Vergleich zur wt*THAP1* Aktivität. Bestimmt durch Messung der Luciferase Aktivität nach Co-transfektion von HeLa-Zellen. (B) Einheitliche zelluläre Expression des wt*THAP1* sowie der beiden mutierten *THAP1* Proteine in HeLa-Zellen.

3.2 Intrazelluläre Lokalisation des THAP1-Genprodukts

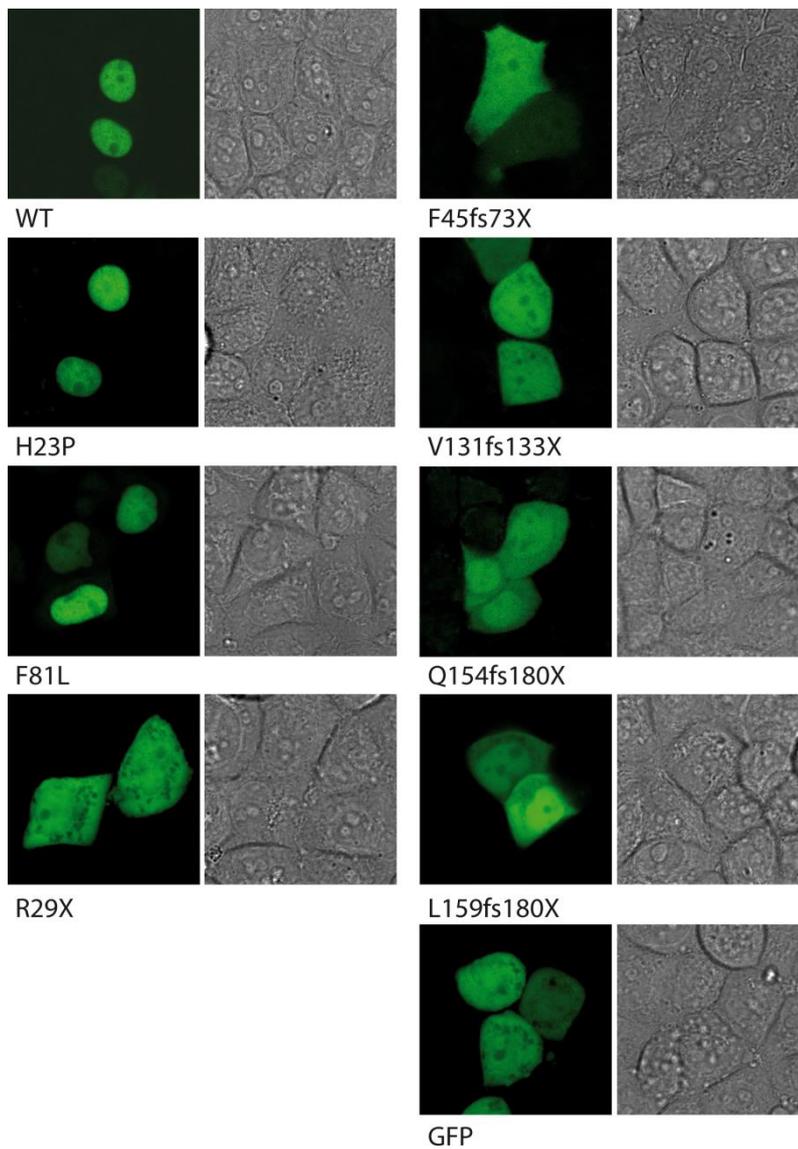
Über 70 Mutationen im *THAP1*-Gen werden derzeit mit der Dystonie 6 assoziiert (The Human Gene Mutation Database, www.hgmd.cf.ac.uk). Neben den zahlreichen *Missense*-Mutationen, die zum Austausch einzelner Aminosäuren führen, finden sich *Nonsense*- und *frameshift*-Mutationen, mit vorzeitigen Translationsabbrüchen innerhalb des ORFs. Bei den so verkürzten Proteinen kommt es zum Verlust des im C-Terminus postulierten Kernlokalisierungssignals, (NLS, *nuclear localization signal*), das zwei Oligopeptidsequenzen aus überwiegend basischen Aminosäuren ¹⁴⁶RKR¹⁴⁸ und ¹⁵⁸KLRK¹⁶⁴ umfasst (Fuchs et al., 2009). Für den funktionellen Nachweis dieses vorhergesagten NLS im THAP1-Protein wurden Untersuchungen zur subzellulären Verteilung des Wildtyp THAP1 (wtTHAP1) und verschiedener mutierter THAP1-Proteine durchgeführt. Mittels Mutagenese-PCR wurden fünf verschiedene DYT6-assoziierte Mutationen (c.85C>T [p.Arg29X]; c.134_135insGGGTT/137_139delAAC [p.Phe45fs73X]; c.388_389delTC [p.Val131fs133X]; c.460delC [p.Gln154fs180X]; c.474delA [Leu159fs180X]) konstruiert, welche zu einem frühzeitigen Transkriptionsstopp führen (Djarmati et al., 2009; Fuchs et al., 2009; Bressman et al., 2009). Alle THAP1-Konstrukte, darunter auch ein mutationsfreies wtTHAP1 und zwei Punktmutationen innerhalb der THAP-Domäne c.68A>T [p.His23Pro]; c.241C>T [p.Phe81Leu], wurden durch die Insertion in den pEGFP-N3 Expressionsvektor mit einem grün fluoreszierenden Protein (GFP) fusioniert. Nach der Transfektion von OVCAR-3-Zellen konnte die intrazelluläre Verteilung mittels confokaler Laserscanning Mikroskopie (CLSM) im Pharmakologischen Labor unter Leitung von Herrn Prof. Dr. Dendorfer analysiert werden. Das wtTHAP1-GFP, sowie die punktuell veränderten THAP1-GFP Proteine His23Pro und Phe81Leu wurden ausschließlich im Zellkern detektiert (Abbildung 6). Different dazu waren die fünf trunkierten THAP1-Proteine sowohl im Zellkern als auch im Zytoplasma nachweisbar, ähnlich der GFP-Proteinkontrolle. Zur genaueren Quantifizierung der Proteinverteilung wurden die Zellkerne mittels Zentrifugation im diskontinuierlichen Saccharose Dichtegradienten von den restlichen Zellkomponenten getrennt und anschließend direkt photometrisch gemessen (Kontron SFM25). Es zeigte sich, dass beide innerhalb der THAP-Domäne lokalisierten *Missense*-Mutationen die intrazelluläre Verteilung des Wildtyp THAP1-Proteins nicht verändern. Dagegen zeigen sich alle fünf getesteten verkürzten THAP1-Proteine signifikant weniger im Zellkern im Vergleich zu Wildtyp THAP1. Der Anteil von trunkierten THAP1-Protein im Zellkern im Vergleich zum Wildtyp THAP1 beträgt demnach für Arg29X 3 %, für Phe45fs73X 37 %, für Val131fs133X 23 %, für Gln154fs180X 40 % und 41 % für Leu159fs180X (Abbildung 6). Basierend auf die

dargestellte intrazelluläre Verteilung mit und ohne vorhergesagtes *NLS*, konnten wir den zweigeteilten basischen Bereich im C-Terminus des THAP1-Proteins erstmalig als funktionelles Kernlokalisierungssignal bestätigen.

A



B



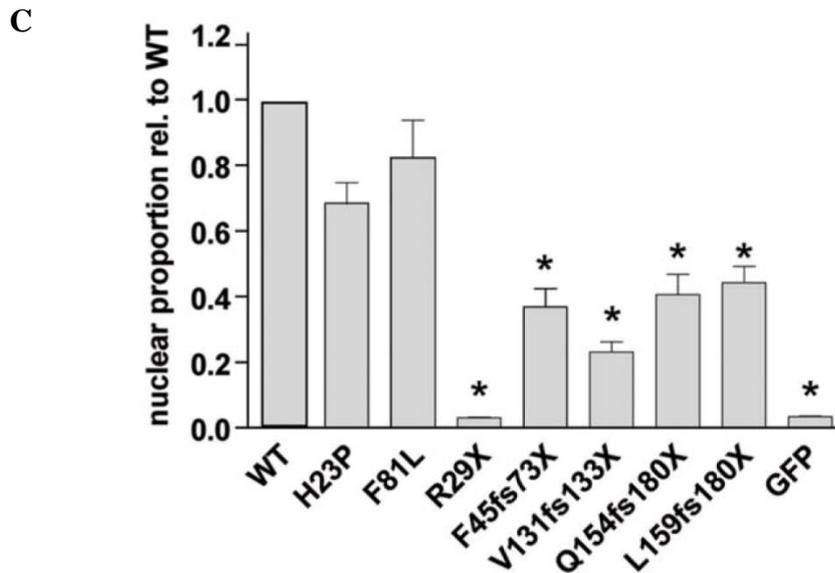


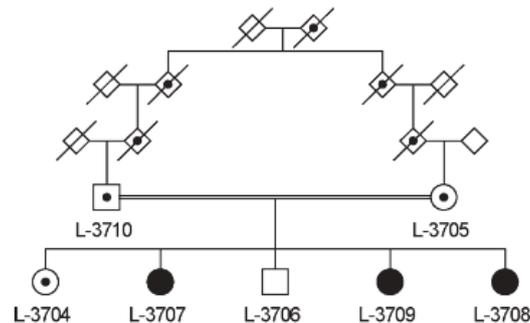
Abbildung 6: Subzelluläre Verteilung von wtTHAP1 und mutTHAP1. (A) Schematische Darstellung des THAP1-Proteins mit Kennzeichnung der untersuchten Mutationen. Die THAP-Domäne und Prolin-reiche Region (P-rr) sind mit grau unterlegt, das zweigeteilte Kernlokalisationsignal (NLS) rot hervorgehoben. (B) Intrazelluläre Lokalisation der GFP-gekoppelten THAP1-Fusionskonstrukte (grünes Signal) in transient transfizierten OVCAR-3-Zellen, detektiert mittels confokaler Lasermikroskopie. Wildtyp, H23P und F81L THAP1-GFP Konstrukte wurden ausschließlich innerhalb des Zellkerns identifiziert, wohingegen alle trunkeierten THAP1-Konstrukte zusätzlich eindeutig im Zytoplasma nachweisbar waren. Das einfache GFP Protein wurde als Kontrolle aufgeführt. (C) Quantitative Bestimmung des GFP-Signals der transfizierten Zellen im Zellkern in Relation zu den restlichen Zellkompartimenten. Es zeigt sich ein deutlich niedrigerer nukleärer Anteil aller trunkeierten THAP1-Proteine, die einen vollständigen oder partiellen Verlust der NLS aufweisen,

3.3 Funktionelle Analyse einer homozygoten *THAP1*-Mutation

Bis 2011 konnte lediglich eine sporadische homozygote Mutation in *THAP1* mit der Dystonie 6 (*THAP1* c.407A>G [p.Asn136Ser]) in Verbindung gebracht werden (Houlden et al., 2010). Unsere Kooperationspartner im Institut für Neurogenetik (Lübeck) fanden in einer konsanguinen iranischen Familie eine weitere, bis dahin unbekannte, homozygote *THAP1*-Mutation. Analysiert wurden zwei gesunde, zweitgradig verwandte Eltern und ihre insgesamt fünf Kinder, wovon drei dystone Symptome aufwiesen. Klinisch zeigten die drei betroffenen Kinder weiblichen Geschlechts eine primäre beinbetonte generalisierte Dystonie mit frühem Beginn der Symptome im Alter zwischen fünf und sechs Jahren. Der häufigste Dystonie Subtyp DYT1 wurde durch eine vollständige Sequenzierung des *TOR1A*-Gens ausgeschlossen. Mittels Kopplungsanalysen von zwei Betroffenen und eines der nicht erkrankten Kinder, konnten zwei mögliche ursächliche Regionen eingegrenzt werden. Eine größere Region auf Chromosom 8 mit 31 Mb (rs10101117 bis rs6997028) und eine zweite 3

Mb überspannende Region auf Chromosom 10 (rs35418599 und rs10903959). Bei näherer Betrachtung der beiden Chromosomenabschnitte konnte das Dystonie 6-assoziierte *THAPI*-Gen innerhalb der größeren Region auf Chromosom 8 identifiziert werden. Die Sequenzierung des *THAPI*-Gens der Indexpatientin zeigte eine *Missense*-Mutation im Exon 2 (c.95T>A; p.Leu32His), innerhalb der hoch konservierten und funktionell relevanten DNA-Binderegion (THAP-Domäne). Diese Mutation wurde daraufhin in allen drei betroffenen Geschwistern „homozygot“ identifiziert. Die Eltern und eine nichtbetroffene 19-jährige Schwester wiesen eine heterozygote Mutation auf, wohingegen ein gesunder Bruder keine *THAPI*-Mutation trug. Sequenzanalysen an 174 gesunden iranischen sowie an 400 gesunden deutschen Probanden schlossen einen SNP (*single-nucleotid polymorphism*) aus.

A



B

	L-3707	L-3709	L-3708
<i>THAPI</i> -Mutation	Homozygot c.95T>A; p.Leu32His		
Alter in Jahren	13	9	7
Geschlecht	W	W	W
Alter bei Beginn	6	5	5
Bulbäre Symptome	Schwer	Fehlt	fehlt
Zervikale Dystonie	Schwer	Mild	mild
Rumpf Beteiligung	Moderat	Mild	mild
Arm Dystonie	Moderat	Moderat	moderat
Bein Dystonie	Schwer	Moderat	moderat
Parkinsonoid	Fehlt		
Myoklonus	Fehlt		

Abbildung 7: Stammbaum (A) und klinische Informationen der homozyoten Mutationsträger (B). Ausgefüllte Symbole markieren betroffene Individuen, leere Symbole nicht betroffene Familienmitglieder. Individuen, deren DNA für genetische Untersuchungen verfügbar war, wurden mit L und einem Code gekennzeichnet. Nachgewiesene Mutationsträger sind mit einem Punkt dargestellt.

Die sich anschließenden funktionellen Analysen zur Untersuchung des molekulargenetischen bzw. pathophysiologischen Effekts der identifizierten homozygoten Mutation im Exon 2 des *THAP1*-Gens, wurden im Rahmen meiner Dissertation im Institut für Humangenetik durchgeführt. Basierend auf den bereits publizierten Effekt von heterozygoten *THAP1*-Mutationen auf den *TORIA*-Promotor (siehe 3.1) sollte die Auswirkung dieser homozygoten Mutation in dem von mir etablierten Modell getestet werden. Das von der *Missense*-Mutation betroffene Leucin an Position 32 ist nach Datenbankanalysen eine unter verschiedenen Spezies (Ratten, Mäuse, Hühner, Fröschen) hoch konservierte Aminosäure im THAP1-Protein. Vorhersagen mit SIFT (*Sorting Intoleranz From Toleranz*, Score 0.02) und PolyPhen (*Polymorphism Phenotyping*, PSIC Score 1.718) deuteten auf einen Einfluss auf die Funktion des THAP1-Proteins hin. Die folgenden *in-vitro* Analysen bestätigten diese Vorhersage. Mittels Mutagenese-PCR (siehe Abschnitt 2.2.1.2) wurde die neu identifizierte Mutation und vier weitere Mutationen in die THAP-Domäne des *THAP1*-Gens inseriert (p.Ser6Phe, p.His23Pro, p.Pro26Leu, p.Pro29Gln, p.Leu32His) und in das Expressionsplasmid eingefügt. Es wurden transiente Co-Transfektionen von SH-SY5Y, OVCAR und HeLa Zellen mit den mutierten THAP1-Expressionsplasmiden und dem *TORIA*-Kernpromotor in pGL41.0 durchgeführt. In den luminometrischen Messungen der Zellextrakte zeigte sich eine signifikante, 30 %ige Reduktion der vermittelten THAP1-Repression auf den *TORIA*-Promotor durch den Austausch von Leucin an Position 32. Die anderen getesteten Mutationen zeigten eine deutlich höhere Reduktion der THAP1-Aktivität von 50 % (p.Pro29Gln), oder 60 % (p.Ser6Phe) bis >90% (p.His23Pro; p.Pro26Leu) (Abbildung 8).

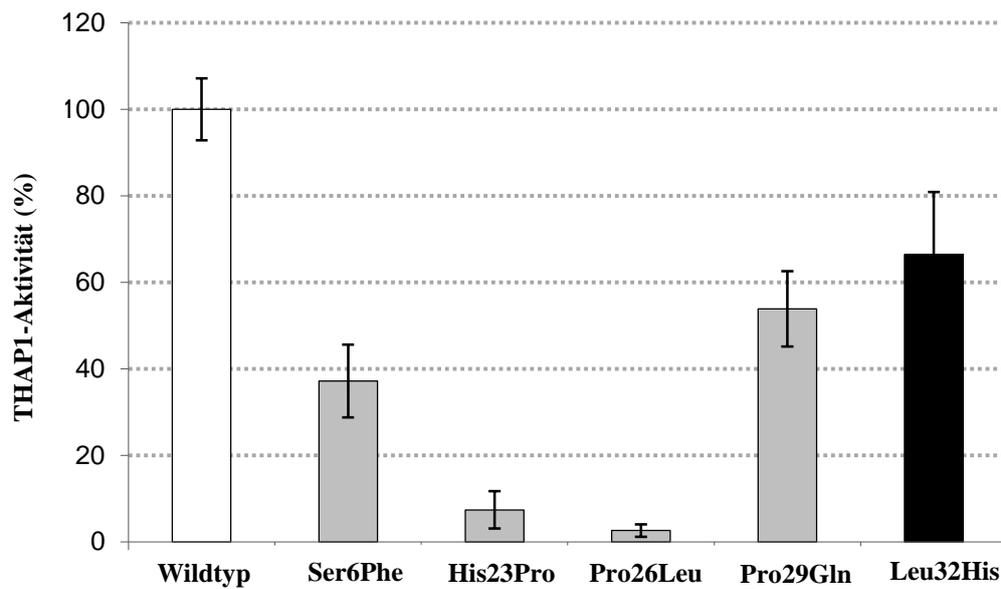


Abbildung 8: Effekt der homozygoten L32H Mutation auf die THAP1-Aktivität. OVCAR-3.Zellen wurden mit einem Reporter-Plasmid unter *TOR1A*-Promotor-Kontrolle und mit entweder einem Wildtyp THAP1- (weiß) oder einem von fünf mutierten THAP1-Expressionsplamiden (grau) co-transfiziert. Die neu identifizierte homozygote Leu32His Mutation (schwarz) zeigt die geringste Auswirkung auf die THAP1-Aktivität.

4 Diskussion

Mutationen im *THAPI*-Gen wurden erstmals im Februar 2009 als genetische Ursache für die primäre Torsionsdystonie, Dystonie 6, beschrieben (Fuchs et al., 2009). Die Dystonie 6 ist charakterisiert durch eine frühe Krankheitsmanifestation mit kraniozervikal-betonter Symptomausprägung und der Tendenz zur Generalisierung. Eine sichere klinische Diagnose ist bei vielfach überlappenden Symptomen zu anderen Dystonie Subtypen nur eingeschränkt möglich. Eine besondere klinische Ähnlichkeit besteht zu der häufigsten primären Torsionsdystonie, Dystonie 1. Patienten mit einer Dystonie 1 zeigen in der Mehrzahl der Fälle eine *GAG*-Deletion im fünften Exon des *TOR1A*-Gens (Ozelius et al., 1997). Nur einige wenige zusätzliche Mutationen im *TOR1A*-Gen konnten als Ursache für die Dystonie 1 identifiziert werden (Leung et al., 2001; Zirn et al., 2008; Calakos et al., 2010). Neben den zahlreichen Gemeinsamkeiten unterscheidet sich die Dystonie 1 von der Dystonie 6 nur in wenigen Kriterien, dazu zählen die häufigere Manifestation der dystonen Bewegungen in den unteren Extremitäten und das Fehlen von Sprechbeeinträchtigungen. Innerhalb weniger Jahre wurden eine Vielzahl neuer Dystonie 6 Mutationen im *THAPI*-Gen identifiziert, mitunter in Patientenkohorten, die obwohl phänotypisch der Dystonie 1 ähnlicher, keine Mutation im *TOR1A*-Gen aufwiesen. In einer der hier beschriebenen Arbeiten (Schneider et al., 2011) wurde im *THAPI*-Gen eine homozygote Mutation c.95T>A in einer konsanguinen iranischen Familie identifiziert, die genau dieses Phänomen zeigte. Die Symptommanifestation des Mutationsträgers begann in den Beinen und breitete sich innerhalb weniger Jahre bis zur generalisierten Dystonie aus. Die klinischen Beobachtungen deuteten in erster Linie auf eine DYT1-Dystonie hin, die durch das Fehlen von Mutationen im *TOR1A*-Gen nicht nachgewiesen werden konnte. Erst die Identifizierung der homozygoten c.95T>A *THAPI*-Mutation erbrachte die endgültige Diagnose einer DYT6-Dystonie. Angesichts dieser phänotypischen Äquivalente zwischen der DYT1- und DYT6-Dystonie, einhergehend mit der *THAPI*-Funktion als Transkriptionsfaktor, wurde die Möglichkeit einer zugrundeliegenden funktionellen Schnittstelle im Rahmen dieser Arbeit untersucht.

- **Mutationsverteilung und Genotyp- Phänotyp Korrelation**

Erste Hinweise für die krankheitsursächliche Bedeutung der Transkriptionsfaktoraktivität von *THAPI* finden sich in der Verteilung der Dystonie 6 zugrundeliegenden Mutationen. Bei den über 70 bekannten *THAPI*-Mutationen kann eine deutliche Anhäufung (etwa 60 %) innerhalb der *THAP*-Domäne festgestellt werden (The Human Gene Mutation Database,

www.hgmd.cf.ac.uk). Es handelt sich überwiegend um Protein-verändernde Mutationen, sogenannte *Missense*-Mutationen, die einen Austausch einzelner Aminosäuren bewirken. Ein zweites Cluster mit ca. 30 % der publizierten Mutationen findet sich im C-terminalen Bereich von THAP1 (aa 130-213). Darunter fallen überwiegend *Nonsense*-Mutationen aber auch größere Deletionen, die zur Expression von verkürzten oder veränderten Proteinen führen und damit größtenteils einen Verlust des THAP1-Kernlokalisations signals bewirken. Analysen einer möglichen Genotyp-Phänotyp-Korrelation auf der Grundlage klinischer und genetischer Daten von 100 veröffentlichten Mutationsträgern (Ledoux et al., 2012), zeigten bei Patienten mit N-terminal lokalisierten Mutationen einen Beginn der Symptome im Kindesalter mit höherer Wahrscheinlichkeit zur Generalisierung, im Vergleich zu Patienten mit Mutationen im C-terminalen Ende, die einen Symptombeginn eher im Erwachsenenalter aufwiesen und deren Symptome häufiger fokal blieben. Analysen unserer Kooperationspartner im Institut für Neurogenetik (Lübeck), konnten diese Korrelationen bestätigen. Fünf von sechs heterozygoten Mutationsträger (Arg13His, Lys16Glu, His23Pro, Lys24Glu, Pro26Leu) aus n=567 Dystonie-Patienten mit *Missense*-Mutationen in der THAP-Domäne zeigten ein junges Manifestationsalter (6 bis 11 Jahre) mit generalisierter (n=3) oder segmentaler (n=2) Dystonie. Der Mutationsträger einer *frameshift*-Mutation Asp191Thrfs*9 am C-terminalen Ende von THAP1 hingegen entwickelte erst im Alter von 49 Jahren eine fokale Dystonie, die noch bis zum Untersuchungszeitpunkt unverändert blieb (Lohmann et al., 2012). Die schwierige klinische Abgrenzbarkeit und der noch überwiegend unbekanntes molekulargenetische und pathophysiologische Mechanismus der Dystonien, machen eine eindeutige Genotyp-Phänotyp Korrelation jedoch schwierig. Während erste Erkenntnisse zur pathophysiologischen Bedeutung des DYT1-Genprodukts TorsinA in Verbindung mit Bewegungsstörungen, über die Dopamin-2-Rezeptor-Neurotransmission, gebracht werden konnten (Bragg et al., 2011), sind noch keine derartigen Mechanismen für das THAP1-Protein beschrieben.

- Funktionelle Bedeutung von THAP1 in Dystonien

Das THAP1-Protein besitzt einen für die THAP-Familie charakteristischen atypischen C₂CH Zinkfinger (Roussigne et al., 2003b), welcher die THAP-Domäne kennzeichnet. Zusätzlich lassen sich eine Prolin-reiche Sequenz und ein im Rahmen meiner Arbeit charakterisiertes Kernlokalisations signal (NLS), das von einer *Coiled-coil*-Domäne umschlossen wird, abgrenzen. Eine funktionelle Bedeutung konnte als proapoptisches Protein (Roussigne et al., 2003a) und in der Endothelzellproliferation nachgewiesen werden. Den Einfluss auf die

G1/S Zellzyklusprogression erhält THAP1 unter anderem durch die Regulation der Expression von pRB/E2F Zellzyklus Zielgenen, unter anderem das *RRM1*-Gen, welches für die S-Phasen DNA-Synthese gebraucht wird (Cayrol et al., 2007). Analysen des atypischen THAP-Zinkfingers und dessen Bindung am *RRM1*-Promotor ermittelten eine für THAP1 spezifische Konsensussequenz, als THABS benannt $5'$ TxxxGGC(A/T) (Bessiere et al., 2008). Ein Nachweis dieses für THAP1 spezifischen Bindemotivs, in unmittelbarer Nähe zu vermuteten Zielgenen, gibt den Hinweis auf einen möglichen regulativen Effekt. Aufgrund der mehrfach beschriebenen klinischen Gemeinsamkeiten zwischen Dystonie 1 und der Dystonie 6, zogen wir das DYT1-assoziierte *TORIA*-Gen als weiteres Zielgen des THAP1-Proteins hypothetisch in Betracht. *In-silico* Analysen im Rahmen dieser Promotion sagten einen 977 Basenpaar umfassenden potentiellen Promotor in unmittelbarer Umgebung zum Startcodon des *TORIA*-Gens {-830;+147} vorher. Durch Reporter-Gen-Untersuchungen konnte die funktionelle Aktivität des vorhergesagten *TORIA*-Promotors bestätigt und darüber hinaus auf einen 221 bp Kernbereich eingegrenzt werden. Innerhalb dieses *TORIA*-Kernpromotors fand sich nicht nur ein für das THAP1-Protein spezifisches Bindemotiv, sondern auch eine inverse Erkennungssequenz $3'$ TxxGGx(A/T) $5'$, welche als charakteristisch für die gesamte THAP-Protein-Familie postuliert wurde (Sabogal et al., 2010). Den Beweis für eine THAP1-Assoziation mit dem identifizierten *TORIA*-Kernpromotor wurde *in-vitro* durch Reporter-Gen-Analysen und *in-vivo* durch Chromatin-Immunopräzipitationen (ChIP) gegeben. Reporter-Gen-Analysen mit transient co-transfizierten HeLa und SH-SY5Y Zellen zeigten, dass THAP1 die *TORIA*-Kernpromotoraktivität konzentrationsabhängig reduziert. Die spezifische Bindung des THAP1-Transkriptionsfaktors an den *TORIA*-Promotor wurde in anschließenden ChIP-Analysen nachgewiesen. Da eigene umfangreiche Untersuchungen und unabhängige Analysen von Kollaborationspartnern nicht eindeutig die Spezifität der erhältlichen THAP1-Antikörper belegen konnten, wurden die hier beschriebenen Untersuchungen zusätzlich mit THAP1-FLAG Expressionskonstrukten durchgeführt. Beide Analysen, sowohl unter Verwendung des THAP1-FLAG Fusionsproteins, als auch des endogenen THAP1-Genproduktes, konnten eine Bindung von THAP1 an den *TORIA*-Promotor aufzeigen (Kaiser et al., 2010). Zeitgleich und unabhängig erzielten Gavarini *et al.*, (Department of Genetics and Genomic Sciences, Mount Sinai School of Medicine, New York, USA) mittels EMSA (*Electrophoretic Mobility Shift Assay*), ChIP und qPCR (quantitative Polymerasekettenreaktion) identische Ergebnisse und Schlussfolgerungen, die wir gemeinsam 2010 im *Annals of Neurology* publizierten und welche zusätzlich durch ein Editorial hervorgehoben und diskutiert worden (Kaiser et al., 2010;Gavarini et al., 2010;Muller, 2010).

Die direkte Auswirkung der Dystonie 6-assoziierten Mutationen und die dadurch bedingten THAP1-Proteinveränderungen auf die gezeigte molekulare Verknüpfung zwischen der Dystonie 1 und der Dystonie 6 wurde in nachfolgenden Analysen detaillierter untersucht.

- Funktionelle Relevanz von DYT6-Mutationen in der THAP-Domäne

Unsere Kooperationspartner im Institut für Neurogenetik (Lübeck) konnten mittels Mutationsanalysen an 567 Dystonie-Patienten zehn neue Mutationen (1,8 %) im *THAP1*-Gen identifizieren (Lohmann et al., 2012). Es fanden sich sechs *Missense*-Mutationen (1,1 %) (Arg13His, Lys16Glu, His23Pro, Lys24Glu, Pro26Leu, Ile80Val), eine *frameshift*-Mutation (0,2 %) Asp191Thrfs*9 und drei Mutationen im nicht-codierenden Bereich. Die Mehrzahl dieser identifizierten Mutationen führen zu einem Austausch einzelner Aminosäuren innerhalb der THAP-Domäne. Durch funktionelle Analysen konnte im Rahmen der vorliegenden Promotion gezeigt werden, dass die hier untersuchten DYT6-verursachenden Mutationen maßgebliche Veränderungen der THAP1-Funktion als Transkriptionsfaktor bewirken. So führt der Austausch von Histidin zu Prolin an Position 23 zu einer nahezu vollständigen Aufhebung der THAP1-Aktivität. Ursächlich für den starken Effekt der His23Pro *Missense*-Mutation kann die Helix-brechende Eigenschaft der substituierten Aminosäure Prolin sein, die zu einer Strukturänderung des THAP1-Zinkfingers führt (Macarthur and Thornton, 1991; Clouaire et al., 2005). Die Rekonstruktion der identifizierten *Missense*-Mutation c.77C>T, die zu einer Substitution von Prolin an Position 26 zu Leucin im THAP1-Protein führt, zeigte eine ebenfalls drastische Verringerung der THAP1-Repressionsaktivität auf den *TORIA*-Promotor (Abbildung 8). Diese Veränderung lässt sich vorrangig durch den unmittelbaren Austausch der für die DNA-Bindung relevanten Position 26 im THAP1-Protein erklären (Clouaire et al., 2005). Die *Missense*-Mutation c.38G>A zeigte hingegen einen im Vergleich deutlich geringeren Einfluss auf die THAP1-Aktivität (siehe Abbildung 5). Gründe können in einer fehlenden strukturellen Auswirkung auf das THAP1-Protein und seiner DNA-Bindfähigkeit liegen. So kommt es zum Austausch der basischen Aminosäure Arginin durch eine ebenfalls basische Aminosäure Histidin an Position 13, einer Position die mutmaßlich keine direkte strukturelle Relevanz für die Zinkfingerkonfiguration einnimmt (Campagne et al., 2010). Dass ein Aminosäureaustausch innerhalb der THAP-Domäne vor allem zur Aufhebung der direkten Bindung von THAP1 an seine genomische Zielsequenz führt, wird durch Fuchs et al. postuliert und durch EMSA-Analysen gestützt. Sie zeigten für die F81L Mutation im AVPTIF-Motiv des THAP1-Proteins eine deutlich reduzierte Bindung an die THAP1-Konsensussequenz THABS (Fuchs et al.,

2009). Wiederlegt wird diese Beeinträchtigung der THAP1-Bindung durch kürzlich veröffentlichte biochemische Analysen von Campagne et al., die für zehn *Missense*-Mutationen in der THAP-Domäne ihre tatsächliche Auswirkung auf die DNA-Bindung untersuchten (Campagne et al., 2012). Fünf der zehn untersuchten *THAP1*-Mutationen zeigten eine leicht reduzierte DNA-Bindeaffinität, drei wiesen keinen Effekt auf, darunter die F81L-Variante, und eine Mutation verstärkte sogar die Bindung. Ausgehend davon liegt die pathologische Relevanz von Mutationen in der THAP-Domäne nicht ausschließlich in der gestörten DNA-Bindung, sondern beruht vermutlich auf eine Vielzahl von Gründen. Hierzu zählen Auswirkungen auf die Proteinstruktur und auf regulativ wichtige Interaktionen zu Co-Faktoren. Erste Hinweise in diese Richtung bieten Studien an weiteren Proteinen der THAP-Familie. So konnte für das THAP7-Protein eine direkte Interaktion mit der Histondeacetylase 3 (HDAC3) in der THAP-Domäne gezeigt werden (Macfarlan et al., 2005). HDAC-Proteine haben eine große Bedeutung in der Transkriptionsrepression. Sie induzieren lokale Umstrukturierungen des Chromatins und verhindern so die Rekrutierung wichtiger Transkriptions-(Co-)Aktivatoren (wie TAF II) an acetylierte Histone (Wu and Grunstein, 2000). Die THAP-Domäne ist eine hochkonservierte Region innerhalb der THAP-Proteine, sodass auch für THAP1 eine Interaktion mit HDAC3 denkbar ist. Würde also durch Mutationen in THAP1 die Bindung von wichtigen Cofaktoren - wie beispielsweise HDAC3 - an einen regulatives Element -hier der *TORIA*-Promotor- gestört, kann dies zu einer Reduktion oder sogar Aufhebung der Transkriptions-Repression, wie in den *in-vitro* Analysen für Mutationen in THAP1 nachgewiesen, führen (Kaiser et al., 2010).

- Funktionelle Relevanz von DYT6-Mutationen im C-Terminus von THAP1

Im C-terminalen Bereich des THAP1-Proteins findet sich eine weitere Region, in der gehäuft DYT6-assoziierte Mutationen identifiziert werden. Innerhalb dieser Region lässt sich ein vorhergesagtes zweigeteiltes Kernlokalisierungssignal (NLS, *nuclear localization sequence*) (¹⁴⁶RKR¹⁴⁸ und ¹⁵⁸KLRK¹⁶⁴) abgrenzen (Fuchs et al., 2009). DYT6-Mutationen führen hier in der Mehrheit zu einem Translationsstopp im Sinne einer *Nonsense*- oder *frameshift*-Mutation, mit dem Resultat einer THAP1-Proteinverkürzung. Funktionell waren das NLS und die Auswirkung der proteinverkürzenden Mutationen vor Beginn meiner Arbeit nicht charakterisiert. Wir konnten das THAP1-Protein als Transkriptionsfaktor (siehe Abschnitt 3.1) bestätigen, sodass der Hauptwirkungsort innerhalb des Zellkerns anzunehmen ist. Ob das postulierte Kernlokalisierungssignal maßgeblich an der intrazellulären Verteilung von THAP1 beteiligt ist, untersuchten wir durch den von fünf DYT6-Mutationen verursachten

vollständigen (p.R29X, p.F45fs73X und p.V131fs133X) oder partiellen (p.Q154fs180X und p.159fs180X) Verlust des vorhergesagten THAP1-Kernlokalisierungssignals. Die Verteilung wurde durch eine Überexpression von GFP-gekoppelten verkürzten- und Wildtyp-THAP1-Fusionsproteinen in humanen OVCAR-3-Zellen mittels confokaler Laserscanning Mikroskopie (CLSM) dargestellt. Für alle fünf Mutationen konnten wir eine Anreicherung im Zytoplasma sowie eine Reduktion innerhalb des Zellkerns, im Vergleich zum Wildtyp THAP1 nachweisen (Abbildung 6). Wir konnten mit diesen Analysen die vorhergesagte NLS erstmals als funktionelles Kernlokalisierungssignal bestätigen. Trotz des teilweise vollständigen Verlustes des NLS fanden sich in allen Experimenten weiterhin trunkierte THAP1-Proteine innerhalb des Zellkerns. Diese Tatsache lässt sich mit einem passiven, -NLS unabhängigen- Transport durch die Kernporen erklären. Ein solcher passiver Transport erfolgt mittels Diffusion durch die Kernporen, welche für Proteine bis zu circa 60 kDa permeabel sind (Ding et al., 2010). Diese Art des Transportes durch die Kernmembran unterscheidet sich vom aktiven NLS-abhängigen Transport über Importine, die das Kernlokalisierungssignal spezifisch erkennen (Gorlich et al., 1995). Eine pathophysiologische Betrachtung dieser Ergebnisse legt die Annahme eines Dosis-Effekts nahe. Eine reduzierte THAP1-Menge im Zellkern kann maßgeblich an der Ausbildung des Dystonie 6-Phänotyps beteiligt sein (Haploinsuffizienz). Gestützt wird die Hypothese durch den Nachweis von DYT6-Phänotypen bei heterozygoten *Nonsense*-, und *frameshift*-Mutationen mit verminderter quantitativer Detektion im Zellkern ohne Beeinträchtigung der THAP-Domäne. Diese Vermutung wird weiterhin bestätigt durch Reporter-Gen-Analysen, die eine konzentrationsabhängige THAP1-vermittelte Repression des *TORIA*-Promotors aufzeigen. Da die nukleäre THAP1-Dosis bereits zu einer relevanten Änderung der THAP1-Funktion führt, verzichteten wir auf weitere Reporter-Gen-Analysen mit trunkierenden Mutationen (*Nonsense*- und *frameshift*-Mutationen). Neben einem Dosis-Effekt sind strukturelle Proteinveränderungen, die durch trunkierende THAP1-Proteine verursacht werden, ebenfalls als krankheitsrelevant zu diskutieren. Dies gilt insbesondere wenn Mutationen noch weitere funktionelle Domänen betreffen, hierzu gehören die *Coiled-coil*-Domäne und das innerhalb dieser Domäne liegende HCF1-Bindemotiv (HBM). Gelangen durch passive Diffusion noch verkürzte THAP1-Proteine in den Zellkern kann ihre Funktionalität durch den Verlust von Proteininteraktionsdomänen gestört sein. Für diese Annahme sprechen *in-vitro* und *in-vivo* Untersuchungen, die eine HCF-1-abhängige Verstärkung der THAP1-vermittelten Regulation des *RRM1*-Gens zeigten (Mazars et al., 2010). In aktuellen Studien finden sich weitere Hinweise für eine funktionelle Bedeutung, der als potentiell Protein-Interaktionsrelevant

postulierten *Coiled-coil*-Domäne (Burkhard et al., 2000; Burkhard et al., 2001). Sengel et al. beschrieben innerhalb dieser *Coiled-coil*-Domäne eine mögliche *Leucine-Zipper*-Konfiguration, die die Bildung von oligomeren Komplexen unterstützt (Landschulz et al., 1988). Es gelang Ihnen daraufhin der *in-vivo* Nachweis von THAP1-Homodimeren und eine Eingrenzung eines dreizehn Aminosäuren Bereichs (aa 154-166) innerhalb der *Coiled-coil*-Domäne, als minimale Interaktionsdomäne zur Homodimerisierung. Obwohl die funktionelle Relevanz einer Homodimerisierung von THAP1 noch nicht endgültig geklärt ist, sprechen einige Fakten wie eine niedrige Bindeaffinität von THAP1-Monomer an genomische Konsensussequenzen (Campagne et al., 2010), sowie die zwei identifizierten Bindemotive innerhalb bekannter THAP1-Zielpromotoren, wie der *TORIA*-Kernpromotorsequenz für eine physiologische Bedeutung (Kaiser et al., 2010).

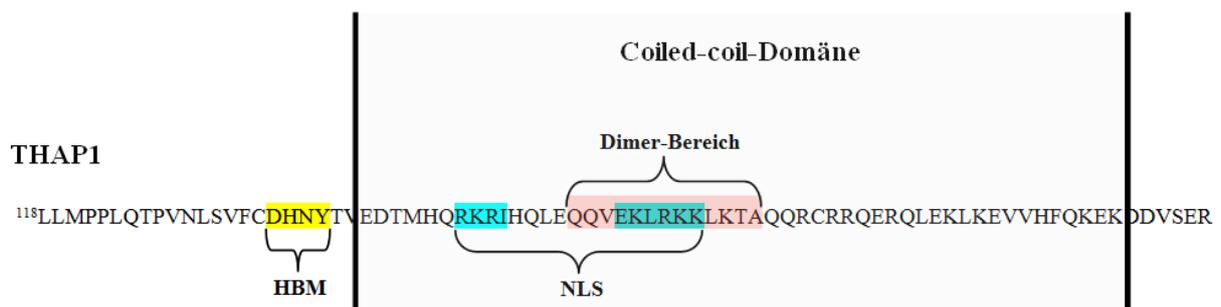


Abbildung 9: Funktionelle Bereiche im THAP1 C-Terminus. Das Kernlokalisationssignal (NLS, blau unterlegt aa146-162) teilt sich 8 Aminosäuren mit der kürzlich identifizierten Homodimerisierungsregion (Dimer- Bereich, rot unterlegt, aa 154-166) und liegt innerhalb der *Coiled-coil* Struktur im C-terminalen Bereich von THAP1. Angrenzend an die *Coiled-Coil* Domäne befindet sich das HCF-1 Bindemotiv (HBM, D/EHxY, gelb markiert aa 134-137).

- **Auswirkung der Transkriptionsdysregulation**

Die Ergebnisse aus den *in-vitro*-Analysen postulieren eine vermehrte Expression des *TOR1A*-Gens durch den mutationsbedingten Funktionsverlust des THAP1-Proteins. Allerdings zeigten sowohl RNA *interference* Experimente, mit artifizieller Verringerung des *THAP1* RNA-Spiegels in nativen Fibroblasten, als auch Expressionsstudien in Fibroblasten und Lymphoblasten von *THAP1*-Mutationsträgern (p.L159fs180X oder p.V131fs133X), keine signifikanten Veränderungen der *TOR1A*-Expression *in-vivo* (siehe Doktorarbeit Dr. cand. med. Nils Uflacker) (Kaiser et al., 2010). Trotz eines bisher nicht nachgewiesenen Effektes von THAP1 auf die *TOR1A*-Expression unter nativen Bedingungen, lässt sich die physiologische Relevanz nicht ausschließen. So könnten die hier dargestellten Effekte Zelltyp-spezifisch sein und nur innerhalb eines bestimmten Abschnittes der Entwicklung in spezifischen neuronalen Zellen erfolgen. So zeigen Expressionsstudien in der Maus eine besonders starke *THAP1*-Expression in Purkinje Zellen des Kleinhirns, den hippocampalen Pyramidenzellen sowie im zerebralen Cortex (Zhao et al., 2012). Folglich werden für *in-vivo* Untersuchung von Dystonie-relevanten molekularen Mechanismen humanes Nerven- und Gehirngewebe benötigt, welche nicht verfügbar waren. Die verwendeten Fibroblasten- und Lymphozyten-Kulturen haben hingegen keinerlei bekannte pathologische Bedeutung bei Dystonien und zeigen darüber hinaus ein geringes THAP1-Expressionslevel (Mazars et al., 2010). Des Weiteren findet sich die *TOR1A*-Expression in Mäusen perinatal am höchsten (Vasudevan et al., 2006), sodass der Einfluss von THAP1 auf die *TOR1A*-Expression nur zu bestimmten entwicklungsbiologischen Stadien von Belang sein könnte. Auch die perinatale Expression von *THAP1* im ZNS wurde in einer erst kürzlich veröffentlichten Arbeit von Zhao et al. an Mausmodellen untersucht. Gefunden wurde ein Maximum der *THAP1*-Expression in der siebten Woche (postnatal), besonders im Cerebellum mit deutlich sinkenden Raten bis zum Alter von 2 Monaten, insbesondere für Regionen im Cortex und den Basalganglien. Die von unseren Kollaborationspartnern (Institut für Neurogenetik, Lübeck) eingeschlossenen Zellen von Patienten mit Dystonie 6 wurden von Mutationsträgern im Alter von 30 Jahren und Älter entnommen, also außerhalb des entwicklungsbiologisch aktivsten und wohlmöglich relevantesten Stadium. Überdies besteht die Möglichkeit einer im Laufe des Lebens zunehmenden Anhäufung kleiner THAP1-mutationsbedingter Ereignisse mit einer krankheitsrelevanten Akkumulation, welche in unserem isolierten Testsystem nicht messbar sind.

- Bedeutung für Dystonien

Der regulative Einfluss von THAP1 auf die Genexpression von *TORIA*, stellt das Genprodukt TorsinA ins Zentrum für weitere pathophysiologische Untersuchungen. Die funktionelle Bedeutung von TorsinA in der Dystonie ist trotz vielversprechender Ansätze bis heute noch nicht vollständig geklärt. Die meisten Theorien gehen von einer „loss of function“ von TorsinA durch die häufigste Mutation Δ GAG im Exon fünf aus, wie einige transgene Mausmodelle bestätigen (Dang et al., 2006). Andererseits wurde auch die Überexpression von TorsinA in Mäusen als pathologisch identifiziert (Grundmann et al., 2007). Angesichts des nur geringen bzw. schwer zu diagnostizierenden - phänotypischen - Unterschieds zwischen der DYT1- und DYT6-Dystonie, muss von einer leicht differenten „pathophysiologischen Endstrecke“ ausgegangen werden. Der mittels der hier dargelegten Ergebnissen postulierte „gain of funktion“ Effekt von TorsinA, durch Mutationen in *THAP1*-Gen, kann somit möglicherweise als spezifische Ursache für die DYT6-Dystonie und nicht für die DYT1-Dystonie angesehen werden. Der in dieser Arbeit isoliert betrachtete genregulative Mechanismus zwischen THAP1 und *TORIA* muss für das endgültige Verständnis jedoch in einem Gesamtkonzept eingefügt werden, in dem weitere, bisher noch unbekannter THAP1-Zielgene und Co-Faktoren berücksichtigt werden müssen. Seit Ende 2012 sind insgesamt vier Gene mit einer primären Torsionsdystonien assoziiert *TORIA* (DYT1), *THAP1* (DYT6), *CIZ1* (Cip1-interacting zinc finger protein 1- spätes Manifestationsalter, zervikale fokale Dystonie) (Xiao et al., 2012), *GNAL* (codiert α -Untereinheit von G-Proteinen, spätes Manifestationsalter ~31,3 Jahre, kraniozervikale fokal-segmentale Dystonie mit Sprechbeeinträchtigung) (Fuchs et al., 2012). Zu prüfen gilt es, ob noch weitere molekulare Überlappungen unter den Dystonien bestehen. Bereits jetzt wurde eine mögliche molekulargenetische Verbindung der DYT6-Dystonie und der DYT3-Dystonie über die Interaktion des THAP1-Proteins mit OGT (O-GlcNAc Transferase) veröffentlicht (Mazars et al., 2010). Diese identifizierte Interaktion lässt auf eine erweiterte funktionelle Bedeutung von THAP1 innerhalb eines größeren, noch nahezu unbekanntem, Protein-Komplexes, schließen. Durch die Charakterisierung von neuen Protein-Protein-Interaktionen und der Identifizierung neuer THAP1-Kandidatengene, wird ein besseres Verständnis der THAP1-Funktion und seiner pathophysiologischen Rolle in Dystonien erzielt.

Die im Rahmen meiner Arbeit generierten Ergebnisse zeigten erstmalig Veränderungen auf der Ebene der Gen-Expression bzw. Regulation als einen pathophysiologisch relevanten Mechanismus bei der Entstehung von Dystonien. Zusätzlich konnten durch weitere molekularbiologische und zelluläre Analysen des THAP1-Proteins, und durch

Untersuchungen von Dystonie 6-verursachender Mutationen, wichtige funktionelle Domänen innerhalb des THAP1-Transkriptionsfaktors klassifiziert werden. Ferner unterstreichen die hier aufgezeigten und diskutierten Ergebnisse, dass eine Identifizierung sowohl weiterer THAP1-Zielgene als auch wichtiger funktioneller Co-Faktoren, die essentielle Grundlage zur Aufklärung pathophysiologisch relevanter Mechanismen der Dystonien bilden. Ein detailliertes Verständnis dieser physiologischen Mechanismen und der individuellen Dystonie-verursachenden Mutationen bildet somit die Grundlage zur Entwicklung und Verbesserung geeigneter Therapien und Pharmazeutika für eine effektive Behandlung der Patienten.

5 Zusammenfassung

Das *THAP1-(DYT6-)*Gen kodiert für das 213aa umfassende THAP1-Protein. Seine Funktion als Transkriptionsfaktor wird durch die namensgebende THAP-Domäne, einem atypischen C₂CH-Zinkfinger mit der Eigenschaft zur spezifischen Bindung an eine DNA-Konsensussequenz, ermöglicht. Struktur- und Datenbankanalysen gaben Hinweise auf weitere funktionelle Bereiche. Dazu zählen eine Prolin-reiche-Sequenz, eine *Coiled-coil*-Region, sowie ein zweigeteiltes Kernlokalisierungssignal (NLS). Der Schwerpunkt meiner Arbeit lag in der Charakterisierung des THAP1-Proteins und seiner funktionellen Rolle im Zusammenhang mit primären Dystonien. Hierbei gelang die Identifizierung einer THAP1-vermittelten Repression der *TORIA-(DYT1-)*Genexpression und die durch DYT6-Mutationen induzierte Reduktion dieser THAP1-Transkriptionsfaktoraktivität. Durch die hier dargestellten funktionellen Analysen konnte erstmalig die transkriptionsregulativen Eigenschaften von THAP1 als ein zentraler Mechanismus in der Pathogenese der Dystonie 6 herausgestellt werden (Kaiser et al., 2010;Lohmann et al., 2012). Zusätzlich konnte erstmalig eine homozygote familiäre Mutation im *THAP1*-Gen, in einer konsanguinen iranischen Familie mit schwerer generalisierter Dystonie 6 aufgezeigt und funktionell charakterisiert werden (Schneider et al., 2011). Wir führten ferner Untersuchungen zur Analyse von *Nonsense*- und *frameshift*-Mutationen, welche das postulierte NLS betrafen, durch. Mittels *in-vitro* Mutagenesen dieser C-terminalen Mutationen und der Detektion der subzellulären Protein-Lokalisation, konnte das vorhergesagte Kernlokalisierungssignal erstmals als funktionell verifiziert werden (Osmanovic et al., 2011). Obwohl die hier aufgeführten Ergebnisse erste wichtige Einblicke in die Funktion des THAP1-Transkriptionsfaktors geben, sind weitere funktionelle Analysen notwendig, um dessen physiologische Relevanz bei der Entstehung der Dystonie 6 zu verstehen. Ein Schwerpunkt gegenwärtiger Forschungsprojekte liegt dabei auf der Identifizierung neuer Zielgene von THAP1. Die Aufklärung und das Verständnis der von THAP1-regulierten, gewebe- und entwicklungsspezifischen Expressionsmustern, wird dabei maßgeblich zum molekularen Verständnis der Dystonie 6 und weiterer Dystonien beitragen. Zusätzlich erhoffen wir uns, durch die Identifizierung von THAP1-Protein-Interaktionspartnern die komplexe molekulare Vernetzung der Dystonie 6 mit weiteren Dystonien aufzuzeigen. Nur das detaillierte Verständnis dieser THAP1-assoziierten molekularen Regulationsmechanismen wird langfristig Grundlage für die Entwicklung spezifischer Therapien darstellen und somit eine bessere Versorgung der Patienten ermöglichen.

6 Literaturverzeichnis

Almasy, L. et al., 1997, Idiopathic torsion dystonia linked to chromosome 8 in two Mennonite families: *Ann.Neurol.*, v. 42, no. 4, p. 670-673.

Augood, S. J., J. B. Penney, Jr., I. K. Friberg, X. O. Breakefield, A. B. Young, L. J. Ozelius, and D. G. Standaert, 1998, Expression of the early-onset torsion dystonia gene (DYT1) in human brain: *Ann.Neurol.*, v. 43, no. 5, p. 669-673.

Bernstein, B. E., E. Birney, I. Dunham, E. D. Green, C. Gunter, and M. Snyder, 2012, An integrated encyclopedia of DNA elements in the human genome: *Nature*, v. 489, no. 7414, p. 57-74.

Bessiere, D. et al., 2008, Structure-function analysis of the THAP zinc finger of THAP1, a large C2CH DNA-binding module linked to Rb/E2F pathways: *J.Biol.Chem.*, v. 283, no. 7, p. 4352-4363.

Blanchard, A., V. Ea, A. Roubertie, M. Martin, C. Coquart, M. Claustres, C. Beroud, and G. Collod-Beroud, 2011, DYT6 dystonia: review of the literature and creation of the UMD Locus-Specific Database (LSDB) for mutations in the THAP1 gene: *Hum.Mutat.*, v. 32, no. 11, p. 1213-1224.

Bragg, D. C., I. A. Armata, F. C. Nery, X. O. Breakefield, and N. Sharma, 2011, Molecular pathways in dystonia: *Neurobiol.Dis.*, v. 42, no. 2, p. 136-147.

Breakefield, X. O., C. Kamm, and P. I. Hanson, 2001, TorsinA: movement at many levels: *Neuron*, v. 31, no. 1, p. 9-12.

Bressman, S. B., L. D. de, M. F. Brin, N. Risch, H. Shale, R. E. Burke, P. E. Greene, and S. Fahn, 1988, Inheritance of idiopathic torsion dystonia among Ashkenazi Jews: *Adv.Neurol.*, v. 50, p. 45-56.

Bressman, S. B., D. Raymond, T. Fuchs, G. A. Heiman, L. J. Ozelius, and R. Saunders-Pullman, 2009, Mutations in THAP1 (DYT6) in early-onset dystonia: a genetic screening study: *Lancet Neurol.*, v. 8, no. 5, p. 441-446.

Bruggemann, N., and C. Klein, 2010, Genetics of primary torsion dystonia: *Curr.Neurol.Neurosci.Rep.*, v. 10, no. 3, p. 199-206.

Burkhard, P., M. Meier, and A. Lustig, 2000, Design of a minimal protein oligomerization domain by a structural approach: *Protein Sci.*, v. 9, no. 12, p. 2294-2301.

Burkhard, P., J. Stetefeld, and S. V. Strelkov, 2001, Coiled coils: a highly versatile protein folding motif: *Trends Cell Biol.*, v. 11, no. 2, p. 82-88.

Calakos, N. et al., 2010, Functional evidence implicating a novel TOR1A mutation in idiopathic, late-onset focal dystonia: *J.Med.Genet.*, v. 47, no. 9, p. 646-650.

Campagne, S., I. Muller, A. Milon, and V. Gervais, 2012, Towards the classification of DYT6 dystonia mutants in the DNA-binding domain of THAP1: *Nucleic Acids Res.*, v. 40, no. 19, p. 9927-9940.

Campagne, S., O. Saurel, V. Gervais, and A. Milon, 2010, Structural determinants of specific DNA-recognition by the THAP zinc finger: *Nucleic Acids Res.*, v. 38, no. 10, p. 3466-3476.

Cayrol, C. et al., 2007, The THAP-zinc finger protein THAP1 regulates endothelial cell proliferation through modulation of pRB/E2F cell-cycle target genes: *Blood*, v. 109, no. 2, p. 584-594.

Clouaire, T., M. Roussigne, V. Ecochard, C. Mathe, F. Amalric, and J. P. Girard, 2005, The THAP domain of THAP1 is a large C2CH module with zinc-dependent sequence-specific DNA-binding activity: *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, v. 102, no. 19, p. 6907-6912.

Dang, M. T., F. Yokoi, M. A. Pence, and Y. Li, 2006, Motor deficits and hyperactivity in Dyt1 knockdown mice: *Neurosci.Res.*, v. 56, no. 4, p. 470-474.

Ding, Q., L. Zhao, H. Guo, and A. C. Zheng, 2010, The nucleocytoplasmic transport of viral proteins: *Virolog.Sin.*, v. 25, no. 2, p. 79-85.

Djarmati, A. et al., 2009, Mutations in THAP1 (DYT6) and generalised dystonia with prominent spasmodic dysphonia: a genetic screening study: *Lancet Neurol.*, v. 8, no. 5, p. 447-452.

Edwards, M., N. Wood, and K. Bhatia, 2003, Unusual phenotypes in DYT1 dystonia: a report of five cases and a review of the literature: *Mov Disord.*, v. 18, no. 6, p. 706-711.

Fahn, S., 1986, Generalized dystonia: concept and treatment: *Clin.Neuropharmacol.*, v. 9 Suppl 2, p. S37-S48.

Fuchs, T., S. Gavarini, R. Saunders-Pullman, D. Raymond, M. E. Ehrlich, S. B. Bressman, and L. J. Ozelius, 2009, Mutations in the THAP1 gene are responsible for DYT6 primary torsion dystonia: *Nat.Genet.*, v. 41, no. 3, p. 286-288.

Fuchs, T. et al., 2012, Mutations in GNAL cause primary torsion dystonia: *Nat.Genet.*, v. 45, no. 1, p. 88-92.

Gavarini, S., C. Cayrol, T. Fuchs, N. Lyons, M. E. Ehrlich, J. P. Girard, and L. J. Ozelius, 2010, Direct interaction between causative genes of DYT1 and DYT6 primary dystonia: *Ann.Neurol.*, v. 68, no. 4, p. 549-553.

Gorlich, D., S. Kostka, R. Kraft, C. Dingwall, R. A. Laskey, E. Hartmann, and S. Prehn, 1995, Two different subunits of importin cooperate to recognize nuclear localization signals and bind them to the nuclear envelope: *Curr.Biol.*, v. 5, no. 4, p. 383-392.

Groen, J. L. et al., 2010, DYT6 dystonia: mutation screening, phenotype, and response to deep brain stimulation: *Mov Disord.*, v. 25, no. 14, p. 2420-2427.

Grundmann, K. et al., 2007, Overexpression of human wildtype torsinA and human DeltaGAG torsinA in a transgenic mouse model causes phenotypic abnormalities: *Neurobiol.Dis.*, v. 27, no. 2, p. 190-206.

- Houlden, H., S. A. Schneider, R. Paudel, A. Melchers, P. Schwingenschuh, M. Edwards, J. Hardy, and K. P. Bhatia, 2010, THAP1 mutations (DYT6) are an additional cause of early-onset dystonia: *Neurology*, v. 74, no. 10, p. 846-850.
- Kabakci, K. et al., 2004, Mutations in DYT1: extension of the phenotypic and mutational spectrum: *Neurology*, v. 62, no. 3, p. 395-400.
- Kaiser, F. J. et al., 2010, The dystonia gene DYT1 is repressed by the transcription factor THAP1 (DYT6): *Ann.Neurol.*, v. 68, no. 4, p. 554-559.
- Klein, C., and S. Fahn, 2013, Translation of Oppenheim's 1911 paper on dystonia: *Mov Disord.*, v. 28, no. 7, p. 851-862.
- Landschulz, W. H., P. F. Johnson, and S. L. McKnight, 1988, The leucine zipper: a hypothetical structure common to a new class of DNA binding proteins: *Science*, v. 240, no. 4860, p. 1759-1764.
- Ledoux, M. S. et al., 2012, Genotype-phenotype correlations in THAP1 dystonia: molecular foundations and description of new cases: *Parkinsonism.Relat Disord.*, v. 18, no. 5, p. 414-425.
- Leung, J. C. et al., 2001, Novel mutation in the TOR1A (DYT1) gene in atypical early onset dystonia and polymorphisms in dystonia and early onset parkinsonism: *Neurogenetics.*, v. 3, no. 3, p. 133-143.
- Lohmann, K. et al., 2012, Identification and functional analysis of novel THAP1 mutations: *Eur.J.Hum.Genet.*, v. 20, no. 2, p. 171-175.
- Macarthur, M. W., and J. M. Thornton, 1991, Influence of proline residues on protein conformation: *J.Mol.Biol.*, v. 218, no. 2, p. 397-412.
- Macfarlan, T., S. Kutney, B. Altman, R. Montross, J. Yu, and D. Chakravarti, 2005, Human THAP7 is a chromatin-associated, histone tail-binding protein that represses transcription via recruitment of HDAC3 and nuclear hormone receptor corepressor: *J.Biol.Chem.*, v. 280, no. 8, p. 7346-7358.
- Marras, C., K. Lohmann, A. Lang, and C. Klein, 2012, Fixing the broken system of genetic locus symbols: Parkinson disease and dystonia as examples: *Neurology*, v. 78, no. 13, p. 1016-1024.
- Mazars, R. et al., 2010, The THAP-zinc finger protein THAP1 associates with coactivator HCF-1 and O-GlcNAc transferase: a link between DYT6 and DYT3 dystonias: *J.Biol.Chem.*, v. 285, no. 18, p. 13364-13371.
- Muller, U., 2009, The monogenic primary dystonias: *Brain*, v. 132, no. Pt 8, p. 2005-2025.
- Muller, U., 2010, A molecular link between dystonia 1 and dystonia 6?: *Ann.Neurol.*, v. 68, no. 4, p. 418-420.
- Orphanides, G., T. Lagrange, and D. Reinberg, 1996, The general transcription factors of RNA polymerase II: *Genes Dev.*, v. 10, no. 21, p. 2657-2683.

- Osmanovic, A. et al., 2011, Truncating mutations in THAP1 define the nuclear localization signal: *Mov Disord.*, v. 26, no. 8, p. 1565-1567.
- Ozelius, L. J. et al., 1997, The early-onset torsion dystonia gene (DYT1) encodes an ATP-binding protein: *Nat.Genet.*, v. 17, no. 1, p. 40-48.
- Ranish, J. A., and S. Hahn, 1996, Transcription: basal factors and activation: *Curr.Opin.Genet.Dev.*, v. 6, no. 2, p. 151-158.
- Roussigne, M., C. Cayrol, T. Clouaire, F. Amalric, and J. P. Girard, 2003a, THAP1 is a nuclear proapoptotic factor that links prostate-apoptosis-response-4 (Par-4) to PML nuclear bodies: *Oncogene*, v. 22, no. 16, p. 2432-2442.
- Roussigne, M., S. Kossida, A. C. Lavigne, T. Clouaire, V. Ecochard, A. Glories, F. Amalric, and J. P. Girard, 2003b, The THAP domain: a novel protein motif with similarity to the DNA-binding domain of P element transposase: *Trends Biochem.Sci.*, v. 28, no. 2, p. 66-69.
- Sabogal, A., A. Y. Lyubimov, J. E. Corn, J. M. Berger, and D. C. Rio, 2010, THAP proteins target specific DNA sites through bipartite recognition of adjacent major and minor grooves: *Nat.Struct.Mol.Biol.*, v. 17, no. 1, p. 117-123.
- Sanger, F., S. Nicklen, and A. R. Coulson, 1977, DNA sequencing with chain-terminating inhibitors: *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, v. 74, no. 12, p. 5463-5467.
- Schneider, S. A. et al., 2011, Homozygous THAP1 mutations as cause of early-onset generalized dystonia: *Mov Disord.*, v. 26, no. 5, p. 858-861.
- Sengel, C., S. Gavarini, N. Sharma, L. J. Ozelius, and D. C. Bragg, 2011, Dimerization of the DYT6 dystonia protein, THAP1, requires residues within the coiled-coil domain: *J.Neurochem.*, v. 118, no. 6, p. 1087-1100.
- Steeves, T. D., L. Day, J. Dykeman, N. Jette, and T. Pringsheim, 2012, The prevalence of primary dystonia: A systematic review and meta-analysis: *Mov Disord.*, v. 27, no. 14, p. 1789-1796.
- Vasudevan, A., X. O. Breakefield, and P. G. Bhide, 2006, Developmental patterns of torsinA and torsinB expression: *Brain Res.*, v. 1073-1074, p. 139-145.
- Williamson, M. P., 1994, The structure and function of proline-rich regions in proteins: *Biochem.J.*, v. 297 (Pt 2), p. 249-260.
- Wu, J., and M. Grunstein, 2000, 25 years after the nucleosome model: chromatin modifications: *Trends Biochem.Sci.*, v. 25, no. 12, p. 619-623.
- Xiao, J. et al., 2010, Novel human pathological mutations. Gene symbol: THAP1. Disease: dystonia 6: *Hum.Genet.*, v. 127, no. 4, p. 470.
- Xiao, J. et al., 2012, Mutations in CIZ1 cause adult onset primary cervical dystonia: *Ann.Neurol.*, v. 71, no. 4, p. 458-469.
- Zhao, Y., J. Xiao, S. Gong, J. A. Clara, and M. S. Ledoux, 2012, Neural expression of the transcription factor THAP1 during development in rat: *Neuroscience*.

Zirn, B., K. Grundmann, P. Huppke, J. Puthenparampil, H. Wolburg, O. Riess, and U. Müller, 2008, Novel TOR1A mutation p.Arg288Gln in early-onset dystonia (DYT1): J.Neurol.Neurosurg.Psychiatry, v. 79, no. 12, p. 1327-1330.

7 Danksagung

Mein größter Dank gilt

Herrn Prof. Dr. Frank Kaiser.

Ohne seine mutigen Ideen, das notwendige *Know-how* und die unglaubliche Unterstützung wäre meine Promotion in dieser Form nicht möglich gewesen. Ganz besonders dankbar bin ich für den engagierten Einsatz als Mentor und die lehrreiche Zeit unter seiner Supervision.

Ich danke **Frau Prof. Dr. Gabriele Gillessen-Kaesbach** für die Möglichkeit an ihrem Institut zu promovieren, für die Hilfe bei Präsentationsvorbereitungen und für die immerzu freundliche und kompetente Unterstützung.

Ich danke **Frau Prof. Dr. Christine Klein** und **Frau Priv.-Doz. Dr. Katja Lohmann** für die freundliche und professionelle Zusammenarbeit als Kollaborationspartner, ihrer Unterstützung bei meiner Promotion, den anregenden wissenschaftlichen Austausch und der großartigen Hilfe bei dem Projekt „Promotionsstipendium“.

Ich danke **Herrn Prof. Dr. Andreas Dendorfer**, **Herrn Dr. Reinhard Depping**, **Herrn Dr. Aleksandar Rakovic**, **Frau Dr. Slobodanka Orolicki**, **Frau Thora Lohnau**, **Frau PD. Dr. Susanne Schneider**, **Herrn Nils Uflacker** für den wissenschaftlichen Austausch, für die Nutzung bestimmter Geräte, der Patientendatenerhebung und der Durchführung ergänzender Analysen.

Danke!! auch an meine Labor Kolleginnen/Kollegen **Dr. Diana Braunholz**, **Dr. Alev Erogullari**, **Juliane Eckhold**, **Melanie Albrecht**, **Conchi María Concepción Gil-Rodríguez** und **Ulf Edener**, für ein großartiges Arbeitsklima, der allzeitbereiten Hilfestellung und die erfolgreiche Zusammenarbeit. Besonders dankbar bin ich **Diana**, die mich von Beginn bis zum Ende meiner Arbeit im Labor unterstützte und förderte. Liebe Diana, Du warst mein Labor-Engel, unvergessen bleibt deine Hilfe bei Vorträgen.

Außerdem danke ich allen **Mitarbeitern** des **Instituts für Humangenetik** und des **Instituts für Neurogenetik** in Lübeck für die freundliche Aufnahme ins Team.

Von Herzen danke ich meiner **Familie**, die mein Medizinstudium überhaupt ermöglichte und mich in meinem Promotionsvorhaben unterstützte, meinen Hamburger Mädels **Norma** und **Tina** für Ihre Geduld, und den heldenhaften Einsatz in schwierigen Zeiten, und natürlich meinen Lübecker Gespann **Conny**, **Lena**, **Insa**, **Ann-Christin** für die wundervollen gemeinsamen Stunden.

8 Lebenslauf

Name: *Alma Osmanovic*

Geburtsdatum: *18.05.1987*

Geburtsort: *Tuzla/Bosnien und Herzegowina*

Studium: *2006-2012 Universität zu Lübeck, Humanmedizin*

Beruf: *Ab 04.2013 Assistenzärztin der Neurologie, Medizinische Hochschule Hannover*