

Aus der Sektion für Funktionelle Genetik  
am Institut für Humangenetik  
der Universität zu Lübeck

Leiter der Sektion: Prof. Dr. rer. nat. Frank Kaiser

# Die vielen Facetten hereditärer Bewegungsstörungen – molekularer und klinischer Natur

Am Beispiel von Dystonie-THAP1 und Spastischer Paraplegie

## Inauguraldissertation

Zur Erlangung des Doktorgrades Dr. rer. nat.

Der Universität zu Lübeck

Aus der Sektion für Naturwissenschaften

Vorgelegt von

**Ronja Hollstein**

aus Paderborn

Lübeck, 2017



Diese Arbeit wurde im Zeitraum vom 01.01.2013 – 31.03.2017 in der Sektion für Funktionelle Genetik am Institut für Humangenetik in Lübeck unter der Anleitung von Prof. Dr. rer. nat. Frank Kaiser durchgeführt.

Erster Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. Frank Kaiser

Zweiter Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. Georg Sczakiel

Tag der mündlichen Prüfung: 25. April 2018

Zum Druck genehmigt: 2. Mai 2018



Im Rahmen meiner Doktorarbeit konnten folgende Publikationen und Beiträge zu nationalen und internationalen Kongressen erzielt werden:

### **Publikationen**

Vanja Nagy, **Ronja Hollstein**, Tsung-Pin Pai, Michel K. Herde, Paul Möseneder, Ewelina Lenartowicz, Anoop Kavirayani, Georg-Christoph Korenke, Ivona Kozieradzki, Roberto Nitsch, Ana Cicvaric, Francisco J. Monje Quiroga, Matthew A. Deardorff, Emma C. Bedoukian, Gökhan Yigit, Bernd Wollnik, Christian Henneberger, Frank J. Kaiser and Josef M. Penninger (2018) Characterization of a human neurodevelopmental disorder caused by mutations in Hace1 E3 Ubiquitin ligase in mice reveals a role for Rac1 (in Begutachtung)

Alexander Balck, Sinem Tunc, Johanna Schmitz, **Ronja Hollstein**, Frank Kaiser, Norbert Brüggemann (2018) A novel frameshift CACNA1A mutation causing Episodic Ataxia Type 2. *Cerebellum*, Aug;17(4):504-506

**Ronja Hollstein\***, Benedikt Reiz\*, Lucas Kötter\*, Alev Richter, Susanne Schaake, Katja Lohmann, Frank J. Kaiser (2017) Synergistic activity of the DYT6-associated THAP1 protein and HCFC1 in regulating gene expression. *Human Molecular Genetics*, Aug 1;26(15):2975-2983

Thorsten Kessler, Jana Wobst, Bernhard Wolf, Juliane Eckhold, Baiba Vilne, **Ronja Hollstein**, Simon von Ameln, Tan An Dang, Hendrik B. Sager, Philipp Moritz Rumpf, Redouane Aherrahrou, Adnan Kastrati, Johan L.M. Bjoerkegren, Jeanette Erdmann, Aldons J. Lusis, Mete Civelek, Frank J. Kaiser, Heribert Schunkert (2017) Functional characterization of the GUCY1A3 coronary artery disease risk locus. *Circulation*, Aug 1;136(5):476-489

Alev Richter\*, **Ronja Hollstein\***, Eva Koschmidder, Franca Vulinovic, Juliane Eckhold, Alma Osmanovic, Reinhard Depping, Frank Kaiser, Katja Lohmann (2017) In-depth Characterization of the Homodimerization Domain of the Transcription Factor THAP1 and Dystonia-Causing Mutations Therein. *Journal of Molecular Neuroscience*, May;62(1):11-16

Julia Schmidt\*, **Ronja Hollstein\***, Frank J. Kaiser, Gabriele Gillessen-Kaesbach (2017) Molecular analysis of a novel intragenic deletion in GPC3 in three cousins with Simpson-Golabi-Behmel syndrome. *American Journal of Medical Genetics*, 173(5), 1400-1405

**Ronja Hollstein**, David A. Parry, Lisa Nalbach, Clare V. Logan, Tim M. Strom, Verity L. Hartill, Ian M. Carr, Georg C. Korenke, Sandeep Uppal, MalikMushtaq Ahmed, Thomas Wieland, Alexander F. Markham, Christopher P. Bennett, Gabriele Gillessen-Kaesbach, Eamonn G. Sheridan, Frank J. Kaiser, David T. Bonthron (2015) HACE1 deficiency causes an autosomal recessive neurodevelopmental syndrome. *Journal of Medical Genetics*, 52(12), 797-803

Alev Erogullari\*, **Ronja Hollstein\***, Philip Seibler, Diana Braunholz, Eva Koschmidder, Reinhard Depping, Juliane Eckhold, Thora Lohnau, Gabriele Gillessen-Kaesbach, Anne Grünewald, Aleksandar Rakovic, Katja Lohmann and Frank J. Kaiser (2014) THAP1, the gene mutated in DYT6 dystonia, autoregulates its own expression. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms*, 1839, 1196-1204

Katrin Bürk, Frank J. Kaiser, Stephanie Tennstedt, Ludger Schöls, Friedmar R. Kreuz, Thomas Wieland, Tim M. Strom, Thomas Büttner, **Ronja Hollstein**, Diana Braunholz, Jens Plaschke, Gabriele Gillessen-Kaesbach, Christine Zühlke (2013) A novel missense mutation in CACNA1A evaluated by in silico protein modeling is associated with non-episodic spinocerebellar ataxia with slow progression. *European Journal of Medical Genetics*, 57, 207–211

\*geteilte Erstautorenschaft

### **Tagungsbeiträge:**

#### **Eigene Vorträge:**

#### **International Congress of Human Genetics, Kyoto, Japan, 2016**

**Ronja Hollstein**, David A. Parry, Lisa Nalbach, Clare V. Logan, Tim M. Strom, Verity L. Hartill, Ian M. Carr, Georg C. Korenke, Sandeep Uppal, Mushtaq Ahmed, Thomas Wieland, Alexander F. Markham, Christopher P. Bennett, Gabriele Gillessen-Kaesbach, Eamonn G. Sheridan, David T. Bonthron, Frank J. Kaiser. Mutations in HACE1 cause an autosomal-recessive neurodevelopmental disorder

#### **Jahrestagung der Gesellschaft für Humangenetik, Lübeck, 2016**

**Ronja Hollstein**, David A. Parry, Lisa Nalbach, Clare V. Logan, Tim M. Strom, Verity L. Hartill, Ian M. Carr, Georg C. Korenke, Sandeep Uppal, Mushtaq Ahmed, Thomas Wieland, Alexander F. Markham, Christopher P. Bennett, Gabriele Gillessen-Kaesbach, Eamonn G. Sheridan, David T. Bonthron, Frank J. Kaiser. Mutations in HACE1 cause an autosomal-recessive neurodevelopmental disorder

#### **Treffen der Norddeutschen Humangenetiker, Hamburg, 2015**

**Ronja Hollstein**, David A. Parry, Lisa Nalbach, Tim M. Strom, Georg C. Korenke, Eamonn G. Sheridan, David T. Bonthron, Gabriele Gillessen-Kaesbach, Frank J. Kaiser. Mutationen im HACE1-Gen als Ursache für eine autosomal-rezessive neurologische Entwicklungsstörung

#### **Treffen der Norddeutschen Humangenetiker, Greifswald, 2013**

**Ronja Hollstein**, Alev Erogullari, Lucas Kötter, Eva Ibing, Alma Osmanovic, Jens Habermann, Timo Gemoll, Gabriele Gillessen-Kaesbach, Christine Klein, Katja Lohmann, Frank Kaiser. "Nicht-THAP-assoziierten Funktionen" des THAP1-Proteins

**Eigene Poster:**

**1<sup>st</sup> Symposium of the Vienna Center for Rare and Undiagnosed Diseases, Wien, Österreich 2016**

**Ronja Hollstein**, David A. Parry, Lisa Nalbach, Clare V. Logan, Tim M. Strom, Verity L. Hartill, Ian M. Carr, Georg C. Korenke, Sandeep Uppal, Mushtaq Ahmed, Thomas Wieland, Alexander F. Markham, Christopher P. Bennett, Gabriele Gillessen-Kaesbach, Eamonn G. Sheridan, David T. Bonthron, Frank J. Kaiser. HACE1 deficiency causes an autosomal recessive neurodevelopmental syndrome

**Jahrestagung der Europäischen Gesellschaft für Humangenetik, Glasgow, 2015**

**Ronja Hollstein**, Julia Schmidt, Gabriele Gillessen-Kaesbach, Frank J. Kaiser. Molecular analysis of a novel intragenic deletion in *GPC3* in three cousins with Simpson-Golabi-Behmel syndrome

**Preise und Auszeichnungen**

**European Society of Human Genetics Travel Fellowship** für den Besuch des **International Congress of Human Genetics - ICHG 2016 in Kyoto, Japan.**



*Ein Gelehrter in seinem Laboratorium ist nicht nur ein Techniker; er steht auch vor den Naturgesetzen wie ein Kind vor der Märchenwelt.*

*Marie Skłodowska Curie*



# Inhalt

1	Zusammenfassung dieser Arbeit.....	1
1.1	Zusammenfassung.....	1
1.2	Abstract .....	3
2	Einleitung.....	7
2.1	Funktionelle Genetik – Ein Prolog .....	7
2.2	Neurogenetische Bewegungsstörungen .....	8
2.2.1	Klinik und Genetik der Dystonien.....	8
2.2.2	Bewegungsstörungen mit ungeklärter genetischer Ursache.....	13
2.3	Die Molekularbiologie von DYT- <i>THAP1</i> .....	15
2.3.1	Das Gen <i>THAP1</i> und sein Genprodukt.....	15
2.3.2	Transkriptionelle Regulation in Eukaryoten .....	17
2.4	Ubiquitin in der Entstehung von Bewegungsstörungen .....	19
2.5	Vorarbeiten und Zielsetzungen .....	20
2.5.1	Dystonie- <i>THAP1</i> .....	20
2.5.2	Funktionelle Charakterisierung und Validierung mittels Exom-Sequenzierung identifizierter Mutationen in <i>HACE1</i> .....	21
3	Materialien und Methoden.....	23
3.1	Materialien .....	23
3.1.1	Geräte.....	23
3.1.2	Plastik- und Glaswaren .....	24
3.1.3	Chemikalien.....	25
3.1.4	Häufig genutzte Puffer und Lösungen.....	27
3.1.5	Antikörper .....	27
3.1.6	Enzyme .....	28
3.1.7	Oligonukleotide und Sonden.....	28
3.1.8	Expressionsplasmide .....	29
3.1.9	Verwendete Größenstandards.....	29
3.1.10	Software und Internetseiten .....	29

3.2	Methoden.....	30
3.2.1	Zellkulturtechniken .....	30
3.2.2	Bakterien .....	33
3.2.3	Hefen .....	35
3.2.4	Molekularbiologische Methoden .....	39
3.2.5	Proteinbiochemie .....	53
3.2.6	Statistische Auswertung.....	62
4	Ergebnisse .....	63
4.1	Funktionelle Charakterisierung von THAP1 .....	63
4.1.1	THAP1 reguliert seine eigene Expression.....	63
4.1.2	THAP1 als Interaktionspartner .....	67
4.1.3	Funktionelle Studien der Interaktion von THAP1 und HCFC1.....	75
4.2	Mutationen im <i>HACE1</i> -Gen als Ursache für eine autosomal-rezessive neurologische Entwicklungsstörung .....	83
4.2.1	Verifikation der Mutationen mittels Sangersequenzierung.....	85
4.2.2	Proteinstatus der Patienten .....	89
4.2.3	Funktionelle Konsequenzen der <i>HACE1</i> -Defizienz.....	90
5	Diskussion.....	95
5.1	THAP1 und Dystonie.....	95
5.1.1	Die Funktionen der THAP-Domäne 1: Autoregulation.....	96
5.1.2	Die Funktionen der THAP-Domäne 2: HDAC3 als Kofaktor von THAP1 .....	101
5.1.3	„Die goldene Mitte:“ THAP1 und das HCFC1-Binde-Motiv .....	105
5.1.4	Die Funktion der <i>Coiled-Coil</i> -Domäne: Die Homodimerisierung von THAP1 ....	109
5.1.5	Fazit der funktionellen Charakterisierung von THAP1 .....	111
5.2	Bewegungsstörungen und <i>HACE1</i> .....	113
5.2.1	Mutationen in <i>HACE1</i> und Exon <i>skipping</i> .....	113
5.2.2	Hyperaktives RAC1 .....	116
5.2.3	Verändertes Migrationsverhalten durch Dysregulation von RAC1 .....	118
5.2.4	Oxidativer Stress und <i>HACE1</i> -Defizienz.....	120

5.2.5	Fazit HACE1 .....	122
6	Literaturverzeichnis.....	125
7	Anhang .....	137



# 1 Zusammenfassung dieser Arbeit

## 1.1 Zusammenfassung

Hereditäre Bewegungsstörungen umfassen ein weites Feld verschiedenster Erkrankungen, von progressiven, anfangs lokal begrenzten, neurodegenerativen *late-onset* Krankheiten bis hin zu komplexen neurologischen Entwicklungsstörungen, die mehrere Organsysteme betreffen können.

Dazu gehören auch die Dystonien, eine heterogene Gruppe von Erkrankungen die durch unwillkürliche Muskelkontraktionen, repetitive Bewegungen und krampfartige, abnorme Haltung von Gliedern und Körper charakterisiert werden. Der erste Teil dieser Arbeit befasst sich mit der Dystonie 6, auch DYT-*THAP1* genannt. Verursacht wird die Erkrankung durch Mutationen im namensgebenden *THAP1*-Gen. Die DYT-*THAP1* unterliegt einer reduzierten Penetranz von etwa 60 %. *THAP1* codiert für den gleichnamigen Transkriptionsfaktor, der funktionell eine Rolle als proapoptotisches Protein, bei der Regulation des Zellzyklus und bei der Myelinisierung von Oligodendrozyten spielt.

Ziel dieser Arbeit war die funktionelle Charakterisierung von *THAP1* und Dystonie-assoziierten Mutationen Hinblick auf die Regulation neuer Zielgene sowie die Interaktion von *THAP1* mit verschiedenen Proteinen und Kofaktoren. Um vorausgegangene Studien der Arbeitsgruppe weiterzuführen, wurden Chromatin-Immünpräzipitationen (ChIP) und Expressionsanalysen durchgeführt die zeigten, dass *THAP1* an seinen eigenen Promotor bindet und so sein eigene Expression reprimiert. Quantitative ChIP-Experimente haben ergeben, dass Mutationen innerhalb der DNA-bindenden *THAP*-Domäne die DNA-Assoziation des Proteins signifikant reduzieren. Die Expression von *THAP1* unterliegt also einem negativen *Feedback-Loop*, der sich vermutlich protektiv auf die Fehlregulation der *THAP1*-Zielgene in Individuen mit *THAP1*-Mutationen auswirkt, indem die Menge des aberranten *THAP1*-Proteins durch eine verstärkte Expression des *THAP1*-Gens kompensiert wird. Da Transkriptionsfaktoren abhängig von ihrer spezifischen Funktion Komplexe mit anderen Transkriptionsfaktoren und Kofaktoren eingehen, wurden mittels GST-Pulldown-Experimenten und Hefe-2-Hybrid-Studien potentielle Protein-Protein-Interaktionen von *THAP1* untersucht. Unterstützt durch quantitative ChIP-Experimente konnte gezeigt werden, dass HDAC3 mit *THAP1* interagiert und über eine Deacetylierung des Promotors an der Repression des *THAP1*-Gens beteiligt ist.

Neben HDAC3 ist HCFC1 ein wichtiger transkriptioneller Kofaktor. Die Interaktion von *THAP1* und HCFC1 wurde mittels Co-Immünpräzipitation bestätigt und in quantitativen ChIP-Analysen konnte gezeigt werden, dass HCFC1 durch *THAP1* an die DNA rekrutiert wird. Die untersuchten *THAP1*-Mutationen innerhalb des HCFC1-Bindemotivs beeinflussten zwar die nicht DNA-

Bindung von THAP1 selbst, führten aber zu einem vollständigen Verlust der THAP1-vermittelten Rekrutierung von HCFC1 an die untersuchten Zielpromotoren. Expressionsanalysen konnte aufzeigen, dass HCFC1 essentiell für Repression in der *THAP1*-Autoregulation ist. Zusätzlich durchgeführte bioinformatische Analysen auf der Grundlage öffentlich zugänglicher ChIP-Seq Daten ergaben, dass über 90 % der THAP1-Bindestellen innerhalb des Genoms ebenfalls eine HCFC1-Bindung aufzeigen. Zusammengenommen zeigen diese Daten, dass HCFC1 ein wichtiger, wenn nicht sogar der Haupt-Kofaktor bei der THAP1-vermittelten Transkriptionsregulation ist.

Die in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse über die Funktion von THAP1 liefern wichtige Hinweise auf die pathologischen Mechanismen der Entstehung von DYT-*THAP1* und potentielle protektive Mechanismen. Da bisher nicht bekannt ist was zur reduzierten Penetranz von *THAP1*-Mutationen führt, sollten in weiterführenden Studien nicht nur die Effekte von Mutationen auf *trans*-regulatorische Elemente untersucht werden, sondern auch auf *cis*-regulatorische Elemente wie *Enhancer* und *Silencer*. Insbesondere die Identifikation von protektiven Mechanismen kann zu einem besseren Verständnis der komplexen Pathologie von DYT-*THAP1* führen und eine Grundlage für ursachenspezifische Therapieansätze liefern.

Der zweite Teil dieser Dissertation befasst sich mit der Identifizierung der krankheitsursächlichen Mutationen in drei an einer neurologischen Entwicklungsstörung erkrankten Geschwistern gesunder Eltern und der anschließenden funktionellen Charakterisierung der gefundenen Mutationen. Alle drei Patienten zeigen eine auffällige Bewegungsstörung, begleitet von weiteren neurologischen und systemischen Symptomen, wie beispielsweise einer Epilepsie und morphologischer Auffälligkeiten des Gehirns. Anhand der Symptome konnte das Krankheitsbild als Spastische Paraplegie klassifiziert werden. Mittels *Whole Exome Sequencing* (WES) wurden biallelische *Loss-of-Function* Mutationen im *HACE1*-Gen identifiziert. *HACE1* codiert für die gleichnamige E3-Ubiquitinligase, deren am besten studiertes Zielprotein die kleine Rho-GTPase RAC1 ist. In primären Fibroblasten der Patienten konnte ein vollständiger Verlust des HACE1-Proteins nachgewiesen werden, und zusätzlich ein deutlicher Anstieg des aktiven RAC1-Proteins. RAC1 ist in vielen verschiedenen zellulären Mechanismen involviert, zum Beispiel in die Regulation von Zytoskelett und Zellmigration sowie die Regulation der Produktion von Reaktiven Sauerstoff-Spezies (ROS). Wundheilungsassays konnten zeigen, dass die Fibroblasten der Patienten im Vergleich zu Zellen einer gesunden Kontrollperson ein deutlich gesteigertes, RAC1-abhängiges Migrationsverhalten aufweisen. Eine gestörte Zellmigration insbesondere während der Embryonalentwicklung kann zu einer fehlerhaften Organisation von Geweben führen, insbesondere zu strukturellen Auffälligkeiten im Gehirn wie sie bei den Patienten festgestellt

wurde. Durchflusszytometrische Analysen ergaben einen deutlichen Anstieg von ROS in den Patientenzellen im Vergleich zu Kontrollzellen. Hohe Konzentrationen an ROS werden auch als oxidativer Stress bezeichnet und können Zellen, insbesondere neuronale Zellen, schwer schädigen. Unterstützt werden diese Ergebnisse von weiteren Studien an *HACE1-Knockout*-Mäusen, welche im Rahmen einer wissenschaftlichen Kollaboration in Wien durchgeführt wurden. Diese aus Patientenzellen und Mäusen generierten Ergebnisse lieferten erste wertvolle Erkenntnisse zu den pathophysiologischen Mechanismen der Krankheitsentstehung und machen RAC1 zu einem interessanten Ziel für potenzielle Therapieansätze.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass funktionelle Studien von Mutationen und ihren Auswirkungen auf verschiedenste molekulare und zelluläre Mechanismen unabdingbar für ein molekulares Verständnis der Pathologie sind die die Grundlage für eine optimierte Versorgung und genetische Beratung der Patienten bilden.

## 1.2 Abstract

The field of hereditary movement disorders covers a wide spectrum of different disease with variable symptoms including progressive and/or neurodegenerative late-onset disorders as well as complex neuronal developmental syndromes, affecting several organs and apparatuses.

The first part of this thesis focuses on DYT-*THAP1* that belongs to the group of Dystonia comprising extremely heterogeneous forms of movement disorders characterised by cramps, involuntary and repetitive movements, and abnormal posturing. In 2009, mutations in the *THAP1* gene were identified as disease-causing for DYT-*THAP1*, underlying an autosomal-dominant inheritance with a reduced penetrance of 60 %. *THAP1* encodes for a transcription factor that is involved in several cellular mechanisms, like apoptosis, cell cycle regulation and myelination of oligodendrocytes. I have investigated the functions of THAP1 as transcription factor for several target genes and used different approaches to identify THAP1's interaction with other cofactors in regulating gene expression. Additionally, the effects of DYT-THAP1 associated mutations on different functions were analysed.

To continue previous studies of our research group, chromatin immunoprecipitations (ChIP) and expression studies were performed to investigate the binding of THAP1 to its own promoter in regulating its own expression. Further, quantitative ChIP assays showed that dystonia-causing mutations within the DNA-binding THAP-domain significantly reduced the DNA-binding ability of the mutant proteins. The expression of *THAP1* is autoregulated in a

negative feedback-loop. This autoregulation might be a protective mechanism to compensate the dysregulation of THAP1 target genes by increasing the level of total THAP1 protein.

Depending on their specific functions, transcription factors interact in large regulatory complexes with other proteins like cofactors or regulators of chromatin structure. GST-pulldowns, yeast-two-hybrid assays, and co-immunoprecipitation were used to study the protein-protein interactions of THAP1 with candidate proteins. Additional quantitative ChIP assays using an antibody against acetylated Histone 3, a marker for active promoter regions, gave evidence that HDAC3 does not only interact with THAP1, but plays an important role in THAP1-mediated repression by deacetylating target promoters.

Another known cofactor of THAP1 is HCFC1. This interaction was verified in co-immunoprecipitation assays. Quantitative ChIP assays revealed that THAP1 recruits HCFC1 to chromatin. *THAP1* mutations affecting the HCFC1 binding motif completely abolished interaction of THAP1 with HCFC1 and prevented the recruitment of HCFC1 to the DNA. Additional expression studies showed that HCFC1 was essential for the repression in THAP1-autoregulation. Indeed, bioinformatics analyses of publically available ChIP-seq data revealed that more than 90 % of THAP1 binding sites in the genome overlap with HCFC1 binding sites. Taken together, these data indicate that HCFC1 is an important, if not the main cofactor of THAP1 in transcriptional regulation.

All these data give important insights into the molecular pathology of dystonia and potential protective mechanisms that might help to understand reduced penetrance. Therefore, following studies should continue to investigate the effects of mutations on *trans*-regulatory elements, but also bring *cis*-regulatory elements into the spotlight, which could harbour either protective or harmful variants. Deciphering of reduced penetrance can help us to develop better and more precise treatments of DYT-THAP1.

The second part of my thesis is about the identification of disease-causing mutations in three individuals with a neurological developmental disorder and its functional characterisation. All three patients suffered from a movement disorder and several other neurological and systemic symptoms, including epileptic seizures and an altered brain morphology. In all three individuals, biallelic loss of function mutations in *HACE1* were identified by whole exome sequencing (WES) and verified by Sanger sequencing. According to *in silico* analyses, both mutations were considered null-alleles. Based on the symptoms, the disorder was classified as a spastic paraplegia.

*HACE1* encodes an E3 ubiquitin ligase named HACE1 and the best-studied target protein is the small Rho-GTPase RAC1. As expected, no HACE1 protein was detectable in patients' fibroblasts, but interestingly, a significant increase of total RAC1 levels and active RAC1 was

measured. RAC1 is involved in various cellular mechanisms and pathways, for example, the regulation of cytoskeleton and cellular migration and the regulation of reactive oxygen species (ROS) production. Performing wound-healing assays with and without a specific RAC1-inhibitor a significant increase of cellular migration in patients' fibroblasts was observed in comparison to fibroblasts from a healthy donor. Dysregulated cellular migration especially during embryonal development can lead to an abnormal organisation of tissues and organs, including abnormal brain morphology as seen in the patients. In addition, fibroblasts were stained for ROS and analysed by microscopy and flow cytometry. Indeed, a significant increase of ROS in the patients' cells compared to cells of a healthy donor was observed in flow cytometry. High levels of ROS are termed oxidative stress and can severely damage cells, especially neurons. High oxidative stress is associated with several neurodegenerative and some neurodevelopmental disease.

These data were supported by studies in *HACE1* knockout-mice, performed by collaborators in Vienna. The mice show a very similar phenotype to the human patients including movement disorder, learning difficulties, and abnormal brain morphology.

The studies in human fibroblasts and mice revealed interesting insights into the molecular pathology of this new form of spastic paraplegia. However, the data obtained in fibroblasts needs to be confirmed in a neuronal cell type, or neurons derived from induced pluripotent stem cells (iPS), for a better understanding of the pathological changes in the patients' neurons. Moreover, new target proteins of *HACE1* need to be identified to study other possible disease mechanisms. In addition, the role of ubiquitin ligase-independent functions of *HACE1* needs to be investigated. A better understanding of the dysregulated pathways and cellular mechanisms is basis for a more specific treatment of symptoms like epileptic seizures and for preventions of further damage caused by oxidative stress.

Taken together, functional studies of mutations and their effects on various molecular and cellular mechanisms, both in progressive late-onset disease and developmental disorders, are necessary for a better understanding of the molecular pathology and for the development of targeted therapy and medication.



## 2 Einleitung

### 2.1 Funktionelle Genetik – Ein Prolog

DNA-Moleküle werden oft als „Bausteine des Lebens“ bezeichnet. Ein Genom ist aber viel mehr als nur eine Ansammlung von Bausteinen, es ist auch Bauplan, Handbuch und Uhrwerk eines Organismus. Das menschliche Genom umfasst mehr als 3 Milliarden Basenpaare und codiert für mindestens 19.000 Gene [1]. Es gibt Abschnitte die speziesübergreifend stark konserviert sind, andere Bereiche sind wiederum hoch variabel. Während eine Deletion von mehreren tausend Basenpaaren keinen nennenswerten Effekt auf die Entwicklung eines Menschen haben muss, kann schon ein einziger Basenaustausch zu einem schweren Erkrankungsbild führen.

Das *Human Genome Project* und die Entwicklung neuer Methoden wie dem *Next Generation Sequencing* (NGS) haben zu einem besseren Verständnis des menschlichen Genoms geführt, zudem werden immer neue Varianten als krankheitsursächlich identifiziert. Für die Aufklärung der molekularen Pathologie einer Erkrankung ist aber viel mehr nötig als nur die Identifikation der ursächlichen genomischen Veränderung. Zwischen einer Mutation und dem daraus resultierenden Phänotyp liegt ein Signalnetzwerk verschiedener Proteine und Moleküle, die in den meisten Fällen unbekannt sind. Um dieses Netzwerk zu entschlüsseln muss nicht nur die Funktion der betroffenen Region im Genom geklärt werden – handelt es sich um ein Gen oder eine regulatorische Sequenz? – sondern auch der Effekt der genetischen Variante auf diese Funktion und die Interaktionspartner. Funktionelle Studien sind notwendig, um die pathologischen Mechanismen einer genetischen Erkrankung aufzuklären und zu verstehen und somit einen Grundstein für eine mögliche Behandlung zu legen.

Oftmals ist ein Phänotyp, der von der Norm abweicht, nicht nur auf eine genetische Veränderung zurückzuführen, sondern auf ein Zusammenspiel mehrerer Mutationen und Varianten. Bei einigen genetischen Erkrankungen liegt eine sogenannte reduzierte Penetranz vor, das heißt, nicht alle Mutationsträger entwickeln zwingend Symptome.

Die Investigation der Auswirkungen von Mutationen und Varianten, sowohl auf DNA- und Chromatin-Ebene als auch auf Protein-Ebene, ist unabdingbar für die Entschlüsselung der molekularen Pathologie von Erbkrankheiten.

## 2.2 Neurogenetische Bewegungsstörungen

Bereits im 17. Jahrhundert stellte der Britische Arzt Thomas Willis einen Zusammenhang zwischen Bewegungsstörungen und Veränderungen im Gehirn, genauer im Striatum fest:

„When I opened a number of cadavers of patients who had died from a long paralysis ...I always found the striate bodies more softened than any other part; also discoloured like the dregs in an olive press, and the striae much obliterated“ (Willis, 1664, wie zitiert von [2, 3]).

Etwa 200 Jahre später beschrieb Dr. Georg Huntington eine von ihm als „Chorea“ bezeichnete Krankheit mit schweren, im Erwachsenenalter auftretenden Symptomen als erblich bedingt [4]. Seit dem wurden viele weitere genetisch bedingte Bewegungsstörungen beschrieben, deren Pathologie das Nervensystem betrifft und nicht die Muskulatur selbst. Viele dieser Erkrankungen treten erst im Erwachsenenalter auf und haben einen progressiven und/oder neurodegenerativen Krankheitsverlauf, neben Chorea Huntington [5] zum Beispiel Morbus Parkinson [6] oder verschiedene Formen der Dystonie [7]. Doch gibt es auch eine Vielzahl seltener Krankheitsbilder und neurologischer Entwicklungsstörungen, die bereits unmittelbar nach der Geburt oder während der Embryonalentwicklung einsetzen. Hier ist die Bewegungsstörung oftmals nur ein Symptom von vielen. Auf molekularer Ebene können die verschiedensten Mechanismen zu den pathologischen Veränderungen im Nervensystem führen, für viele Erkrankungen sind diese Mechanismen immer noch weitgehend ungeklärt.

### 2.2.1 Klinik und Genetik der Dystonien

Der Begriff „Dystonie“ wurde zum ersten Mal 1911 von Hermann Oppenheim verwendet, in seinem Aufsatz „Über eigenartige Krampfkrankheit des kindlichen und jugendlichen Alters (Dysbasia lordotica progressiva, Dystonia Musculorum Deformans)“ [8]. Unter dem Begriff Dystonien ist heute eine heterogene Gruppe klinischer Symptome zusammengefasst, die durch ungewollte anhaltende oder intermittierende Muskelkontraktionen charakterisiert werden, welche unnormale, oft repetitive Bewegungen und/oder verdrehte Haltungen eines oder mehrerer Körperteile verursachen [9]. Dystonische Bewegungen folgen typischerweise einem sich wiederholenden Muster und können zusammen mit einem Tremor auftreten. Ausgelöst oder verstärkt wird eine Dystonie oft durch gewollte Bewegungen und eine überschießende Muskelaktivierung [10]. Als neurologische Ursache der unwillkürlichen Muskelkontraktionen werden verschiedene Mechanismen diskutiert, darunter der Verlust neuronaler Inhibition, eine Fehlfunktion sensorischer Neuronen sowie eine Störung der synaptischen Plastizität [11], die genauen Mechanismen sind nach wie vor ungeklärt.

Dystonien werden anhand der Ätiologie, der Lokalisation der Symptome sowie dem Erkrankungsalter klassifiziert. Man unterscheidet zwischen idiopathischen (primären) und symptomatischen (sekundären) Dystonien [12]. Die idiopathische Dystonie ist ein eigenes, seltenes Krankheitsbild, mit einer Prävalenz von 16:100.000 [13]. Während die Symptome der idiopathischen Dystonie unabhängig von exogenen Einflüssen sind und spontan auftreten, sind die symptomatischen Dystonien, wie der Name sagt, nur das Symptom einer anderen Erkrankung (z.B. einer metabolischen Erkrankung oder eines Schlaganfalls) oder werden durch andere äußere Einflüsse (z.B. Medikamente) hervorgerufen. Dystonie-Symptome können durch Fehlfunktionen in unterschiedlichsten Gehirnregionen ausgelöst werden, wobei diese meist nicht mit einer Neurodegeneration der betroffenen Hirnstrukturen in Zusammenhang gebracht werden [14]. Erst vor kurzem wurde ein Dystonie-assoziiertes Gen in Zusammenhang mit der Regulation der Myelinisierung von Oligodendrozyten gebracht [15].

Zu den wichtigsten Kriterien der klinischen Klassifizierung einer Dystonie gehört die topische Verteilung der unwillkürlichen Bewegungen, es können ein Körperteil (fokal), mehrere und zusammenhängende (multifokal/segmental) oder viele (generalisiert) Körperregionen betroffen sein [16]. Zudem spricht man bei einem Einsetzen der Symptome vor dem 28. Lebensjahr von einem frühen Erkrankungsalter bzw. einer „*early onset dystonia*“ und bei einer Manifestation nach dem 28. Lebensjahr von einem späten Erkrankungsalter oder einer „*late onset dystonia*“ [17]. Die genetischen Ursachen von Dystonien sind oftmals schwer zu identifizieren, es wurden nur in 20 % der Patienten krankheitsursächliche Mutationen identifiziert [18–20]. Trotzdem konnten in den vergangenen drei Jahrzehnten, auch durch neue Sequenziermethoden, mehr als 200 Gene mit verschiedenen generalisierten Dystonie-Erkrankungen assoziiert werden, darunter vor allem solche die sich in der Kindheit manifestieren [7, 21–23]. Dies umfasst sowohl isolierte Dystonien, das heißt die Dystonie ist mit Ausnahme des Tremors das einzige Symptom, kombinierte Dystonien, also Erkrankungen in denen die Dystonie zusammen mit anderen Bewegungsstörungen, wie z.B. Parkinson auftritt, und auch sogenannte komplexe Dystonien, bei denen die Dystonie nur ein weniger prominentes Symptom unter mehreren schweren ist [10, 24]. Die meisten genetischen Formen gehören zu den komplexen Dystonien, welche im Bezug auf die klinische Ausprägung auch die heterogenste Klasse sind [7]. Ursprünglich wurden die genetischen Dystonien anhand der vom HUGO/GDB (*Human Genome Organisation / Genome Database*) vorgeschlagenen Dystonie-Bezeichnungen mit durchnummerierten Abkürzungen DYT1 bis DYT23 klassifiziert. Die Abkürzungen stehen für die 23 bisher bekannten, monogenen Dystonie Subtypen, die anhand der Reihenfolge ihrer Erstbeschreibung und/oder der Identifizierung der genetischen Ursache durchnummeriert wurden.

**Tabelle 2.1: Isolierte und kombinierte Formen von Dystonie mit etablierter genetischer Ursache (Nach Lohmann et al. 2017)**

Akronym	Phänotyp	Mutationsspektrum	Proteinfunktion
<b>Isolierte Dystonie</b>			
DYT-TOR1A	Frühe Manifestation, generalisierte Dystonie auch bekannt als Oppenheim Dystonie oder DYT1 Dystonie)	In den meisten Fällen die gleiche Mutation (c.904_906delGAG; p.302delGLU)	ATPase assoziiert mit verschiedenen zellulären Mechanismen, vermutlich ein molekulares Chaperon
DYT-THAP1	Dystonie mit adoleszenter Manifestation mit variablem Phänotyp (auch DYT6 Dystonie)	Über 100 verschiedene Mutationen	Transkriptionsfaktor
DYT-GNAL	Segmentale Dystonie mit adultem Manifestationsalter	Etwa 30 verschiedene Mutationen	Involviert in Signaltransduktion
DYT-ANO3	Kraniozervikale Dystonie mit spätem Manifestationsalter	Viele verschiedene Mutationen, Pathogenität oft unklar (keine Segregation)	Kalzium-aktivierter Chlorid-Kanal
<b>Kombinierte Dystonie</b>			
DYT-GCH1	Dopa-responsive Dystonie (auch bekannt als Segawa Syndrom oder DYT5-Dystonie)	Über 100 verschiedene Mutationen	Enzym in der Biosynthese von Tetrahydrobiopterin
DYT-ATP1A3	Dystonie-Parkinsonismus mit frühem Manifestationsalter (auch DYT12 Dystonie)	Etwa 20 verschiedene Mutationen	Katalytische Untereinheit einer Ionenpumpe
DYT-PRKRA	Dystonie-Parkinsonismus (DYT16)	Eine bestätigte Mutation c.665C>T, p.Pro222Leu)	Proteinkinase mit Funktion der Stressresponse
DYT-SGCE	Myoklone Dystonie (DYT11)	Etwa 80 verschiedene Mutationen	Vermutlich ein Transmembranprotein, Funktion weitestgehend Unbekannt

Die Symbole des genetischen Locus (z.B. *DYT1*) wurden als Synonym für den jeweiligen Phänotyp (DYT1-Dystonie) oder die genetische Ursache (Mutationen im DYT1-Gen) verwendet. Doch wie bereits erwähnt wurden durch neue Methoden im Bereich des *Next Generation Sequencing* wurden insbesondere in den letzten Jahren zahlreiche neue Krankheitsgene identifiziert [7, 23]. Aufgrund dieser rapiden Entwicklung auch im Bereich der Genetik von

Dystonien ist es beinahe unmöglich die chronologische, nummernbasierte Reihenfolge beizubehalten. Um Probleme wie falsche oder doppelte Krankheitsloci zu vermeiden, wurde von der *International Parkinson's Disease and Movement Disorder Society* eine neue genetische Klassifikation und Nomenklatur erarbeitet, die auf den als krankheitsursächlich identifizierten Genen beruht und die Bezeichnungen des *HUGO Gene Nomenclature Committee* ersetzt [24] (Zusammenfassung siehe Tabelle 2.1).

Funktionelle Studien der betroffenen Proteine und Signalwege sind essentiell für das Verständnis der molekularen Pathologie und konnten Hinweise auf fehlerhafte Vorgänge im zentralen Nervensystem (ZNS) liefern. So konnte bereits gezeigt werden, dass der Transkriptionsfaktor THAP1 (DYT6 bzw. DYT-*THAP1*) die Expression des DYT1 bzw. DYT-*TOR1A* verursachenden Gens *Torsin1A* reguliert [25, 26].

Des Weiteren spielen TOR1A und das mit DYT11 bzw. DYT-*SGCE* assoziierte  $\epsilon$ -Sarkoglykan (SGCE) eine Rolle bei der Lokalisation sowie beim Transport neuronaler mit der Zellmembran assoziierter Proteine [27, 28]. Mit *ATP1A3* und *GCH1* konnten zudem zwei Gene als Dystonie-verursachend identifiziert werden, deren Genprodukte, die Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase  $\alpha$ 3-Untereinheit (ATP1A3) und die DYT5-verursachende GTP-Zyklohydrolase 1 (GCH1), direkt an der Transmission neuronaler Signale beteiligt sind [29].

Bisher können die verschiedenen Dystonieformen allerdings nur symptomatisch und nicht ursächlich behandelt werden. Es stehen je nach Dystonie-Form und Schwere der Erkrankung verschiedene pharmakologische sowie eine neuro-operative Therapie zur Verfügung. Injektionen mit Botulinumtoxin direkt in den betroffenen Muskel werden bei fokalen und bestimmten generalisierten Dystonien angewandt [30]. Die Verabreichung von Anti-Cholinergen oder Dopaminergen Medikamenten sowie GABA-Agonisten wirkt im ganzen ZNS [31, 32]. Bei der neuro-operativen Therapie handelt es sich um die sogenannte Tiefe Hirnstimulation (*Deep Brain Stimulation, DBS*) [33]. Hierbei werden bestimmte Hirnregionen mittels leichter elektrischer Spannung stimuliert, was in einer funktionellen Manipulation der Regelkreise im Gehirn resultiert. Diese Form der Therapie erzielt insbesondere bei Dystonieformen mit frühem Erkrankungsalter gute Behandlungserfolge [34–36].

#### 2.2.1.1 Dystonie-*THAP1*

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die pathologischen Mechanismen der Dystonie 6 (OMIM: 602629), DYT6, seit kurzem als DYT-*THAP1* bezeichnet [24], untersucht und charakterisiert. Bei der DYT-*THAP1* handelt es sich um eine isolierte, primäre Torsionsdystonie bei der insbesondere die kraniozervikale Muskulatur sowie die Muskeln der oberen Extremitäten betroffen sind [37, 38]. Bedingt durch eine laryngeale Dystonie zeigen viele

Patienten zudem Sprach- und Schluckprobleme. Das mittlere Erkrankungsalter liegt bei 17.8 Jahren. Allerdings zeigt sich hierbei ein sehr breites Spektrum, es gibt Patienten mit einem Erkrankungsalter von 2 bis 62 Jahren [38]. Der Krankheitsverlauf ist progressiv, mit fortschreitenden Symptomen tritt häufig eine generalisierte Dystonie ein. Das krankheitsursächliche und namensgebende Gen *THAP1* wurde 2009 von Fuchs und Kollegen identifiziert [39]. Durch Sequenzanalysen in fünf Familien mit Amisch-Mennonitischem Hintergrund konnten zwei heterozygote Mutationen (c.134\_135insGGTGTT; 137\_139delAAC und c.241T>C) gefunden werden [39, 40]. Das Vererbungsmuster ist autosomal-dominant, unterliegt jedoch einer reduzierten Penetranz von etwa 60 %, d.h. nur etwa zwei Drittel der *THAP1*-Mutationsträger erkranken tatsächlich an Dystonie. In verschiedenen DYT-*THAP1*-Familien wurden mehrere (noch) nicht erkrankte Mutationsträger identifiziert, jedoch kann eine spätere Manifestation der Krankheit nicht ausgeschlossen werden.

Bisher konnten mehr als 100 verschiedene, meist heterozygote DYT-*THAP1*-Mutationen identifiziert werden [7], hauptsächlich *Missense*-Mutationen, aber auch *Nonsense*- und *Framshift*- Mutationen. Ein großer Teil der *THAP1*-Mutationen sind im ersten und zweiten Exon des Gens lokalisiert, welche für die namensgebende, DNA-bindende THAP-Domäne codieren. Die genaue Struktur und Funktion des Gens, sowie des codierten Proteins werden in Abschnitt 2.3 beschrieben.

## 2.2.2 Bewegungsstörungen mit ungeklärter genetischer Ursache

Insbesondere durch die rasante Weiterentwicklung des *Next Generation Sequencing* (NGS) konnten in den letzten Jahren die krankheitsassoziierten Gene vieler Bewegungsstörungen identifiziert werden. Dennoch gibt es immer noch eine große Anzahl von Erkrankungen und Syndromen, bei denen der Bewegungsapparat betroffen ist, mit unbekannter genetischer Ursache. Dies betrifft neben den schon genannten Dystonien zum Beispiel die durchaus ähnlichen myoklonen Erkrankungen, gekennzeichnet durch plötzliche, kurze ungewollte Bewegungen, die zusammen mit überschießender Muskelaktivität oder plötzlichem Erschlaffen der Muskeln auftreten [41, 42].

Eine weitere Gruppe neurogenetischer Bewegungsstörungen, deren krankheitsassoziierte Gene bisher nur teilweise identifiziert werden konnten bzw. bei denen mittels NGS regelmäßig neue Krankheitsloci identifiziert werden, sind die hereditären Ataxien und Hereditäre Spastische Paraplegien (HSP), die klinisch nicht immer eindeutig zu differenzieren sind [43–48]. Sowohl hereditäre Ataxien als auch HSP umfassen klinisch und genetisch extrem komplexe und heterogene Gruppen von Erkrankungen [46, 49]. Hereditäre Ataxien manifestieren sich zuerst in einer ataktischen Gangstörung, bei der es sich zudem um das Leitsymptom handelt. Im weiteren Krankheitsverlauf treten oftmals eine Standataxie, Extremitätenataxie und – hypermetrie, Tremor, eine Augenbewegungsstörung und weitere Symptome auf [46]. Klinisch werden hereditäre Ataxien als „reine“ Ataxien und Ataxie-Plussyndrome klassifiziert. Zu den klinischen Auffälligkeiten der Plussyndrome gehören neben Bewegungsstörungen wie Dystonien, Chorea, Myoklonus und Parkinsonismus auch Symptome die das vegetative Nervensystem betreffen, wie Urge-Inkontinenz und erektiler Dysfunktion, REM (*Rapid-eye-movement*)-Schlafverhaltensstörungen und das *Restless-legs*-Syndrom [46]. Bisher sind über 75 Gene mit autosomal-dominanten und autosomal-rezessiven Formen der hereditären Ataxie assoziiert [50, 51]. Zusätzlich sind auch pseudodominante, mitochondriale und X-chromosomale Vererbungsmuster bekannt, was die Diagnose für den einzelnen Patienten oft erschwert [46].

Die Leitsymptome von HSP sind eine Schwäche/Hypotonie und Spasmen der unteren Extremitäten, die entweder allein, als „reine“ HSP, oder in Kombination mit anderen neurologischen Auffälligkeiten und Symptomen auftritt, auch komplizierte HSP genannt [43]. Wie bei den verschiedenen Dystonieförmern, ist das Erkrankungsalter extrem variabel. Während autosomal-dominante HSP-Formen häufig als „rein“ eingeordnet werden, werden insbesondere die autosomal-rezessiven Formen mit komplexen Erkrankungen assoziiert [52, 53]. Insbesondere bei den komplexen Erkrankungen treten eine Vielzahl neurologischer und nicht-neurologischer Zusatzsymptome auf, darunter neurogene Blasenstörung, periphere

Neuropathie, Sprechstörungen, kognitive Beeinträchtigungen, Psychosen, eine Optikusatrophie, Atrophie des Kleinhirns, extra-pyramidalmotorische Symptome oder Krampfanfälle [46, 51].

Bis heute umfasst HSP über 70 sehr unterschiedliche Erkrankungen mit zum Teil auch überlappenden Phänotypen, genetisch klassifiziert durch die Art der Vererbung (autosomal-dominant, autosomal-rezessiv oder X-chromosomal) und anhand des genetischen Lokus/des identifizierten Gens, durchnummeriert von SPG1 bis (derzeit) SPG78 [46, 49, 53]. Zusammen mit Genen, die zwar mit einem HSP-ähnlichen Phänotyp assoziiert sind, aber nicht als SPG-Lokus klassifiziert sind, gibt es aktuell etwa 150 HPS-Gene [46]. Trotzdem können nur 70 % der autosomal-dominanten Fälle, 50 % der autosomal-rezessiven Fälle und 30 % der sporadischen HSP-Fälle genetisch aufgeklärt werden [54].

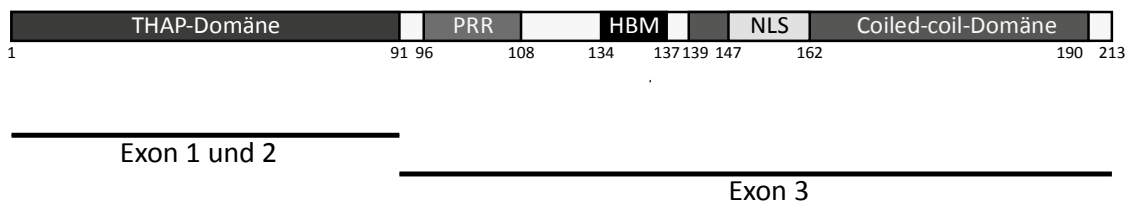
Durch die neuen Sequenzieretechniken werden sowohl für hereditäre Ataxien als auch für HSP neue Krankheitsformen beschrieben und bisher unbekannte Krankheitsgene identifiziert.

## 2.3 Die Molekularbiologie von DYT-THAP1

### 2.3.1 Das Gen THAP1 und sein Genprodukt

Das mit DYT-THAP1 assoziierte Gen *THAP1* (*thanatos-associated [THAP] domain-containing apoptosis-associated protein-1*) ist auf Chromosom 8p11.21 lokalisiert und codiert für den gleichnamigen THAP1 Transkriptionsfaktor. THAP1 gehört zur Familie der THAP-Proteine, die im Menschen 12 Proteine umfasst. *THAP1* wird vor allem im Herzen, im Skelettmuskel, in den Nieren und in der Leber exprimiert. Gehirn, Plazenta und Blut weisen eine geringere Expression auf [55]. In Expressionsstudien wurde eine zusätzliche THAP1-Splice-Variante nachgewiesen, deren Transkript lediglich das erste und dritte Exon einschließt [56]. Alle Angaben in dieser Arbeit beziehen sich auf das Transkript NM\_018105.2 (RefSeq, HG38).

Die codierende Sequenz der drei Exons beinhaltet 642 Basenpaare und das daraus synthetisierte Protein besteht aus 213 Aminosäuren (AS) mit einem berechneten Molekulargewicht von 25 kDa. Abbildung 2.3. zeigt eine schematische Darstellung der funktionellen Domänen des THAP1-Proteins. Die ersten beiden Exons codieren für die namensgebende N-terminale THAP-Domäne (AS 1-91), das dritte Exon codiert für eine Prolin-reiche Region (PRR, AS 96-108), ein HBM-Motiv (HCFC1-*binding-motif*, AS 134-137) sowie für die C-Terminale Coiled-Coil-Domäne (CCD, AS 139-190) mit einem Kernlokalisationsignal (*nuclear localization signal*, NLS, AS 147-162). Die Familie der THAP-Proteine wurde 2003 anhand eines auffälligen Proteinmotivs identifiziert, der N-terminalen THAP-Domäne [55, 57, 58]. Dieser Abschnitt des Proteins ist der DNA-bindenden Domäne des *Drosophila melanogaster* Proteins *P element transposase* [59] strukturell sehr ähnlich, so dass bereits auf der Grundlage der Aminosäuresequenz eine DNA-Bindfähigkeit der THAP-Domäne vermutet wurde.



**Abbildung 2.3.1: Schematische Darstellung der funktionellen Domänen des Transkriptionsfaktors THAP1**

Die N-terminale THAP-Domäne (AS 1-91) des THAP1-Proteins wird von den Exons 1 und 2 codiert. Auf dem von Exon 3 codierten Bereich liegen eine Prolin-reiche Region (PRR, AS 96-108), das HCFC1-Bindungs-Motiv (HBM, AS 134-137), die Coiled-Coil-Domäne (AS 139-190) und das Kernlokalisationsignal (NLS, 147-162).

Studien der Kristallstruktur der THAP-Domäne von THAP1 ergaben die Struktur eines atypischen Zinkfingers mit einem C2CH-Motiv ( $CX_{2-4}CX_{35-53}CX_2H$ ), dessen  $\beta$ - $\alpha$ - $\beta$ -Sekundärstruktur von einem Zink-Ion stabilisiert wird [58]. Weitere Untersuchungen verschiedener Arbeitsgruppen ergaben, dass das Sequenzmotiv  $^{76}AVPTIF^{81}$  wichtig für die korrekte Faltung der THAP-Domäne ist, während die Aminosäuren Pro26, Trp36, Phe58 und Pro78 essentiell für die DNA-Bindung sind [58, 60]. Bisher konnten zwei als THABS (THAP1-*binding-sequence*) bezeichnete THAP1-Konsensus-Motive identifiziert werden, die von THAP1 hochspezifisch erkannt und gebunden werden: TxxxGGCA [60] und TxxGGGx(A/T) [61]. Obwohl die Zinkfinger von THAP1, THAP2 und THAP3 eine große strukturelle Ähnlichkeit aufweisen, binden weder THAP2 noch THAP3 an das THAP1-THABS-Motiv, was für eine hohe Spezifität der DNA-Bindung von THAP1 spricht [62]. Über die DNA-Bindung vermittelt THAP1 die transkriptionelle Regulation verschiedener Gene, darunter *RRM1*, *TOR1A*, *BIRC5* [55]. Als Transkriptionsfaktor kann THAP1 die Expression der Zielgene sowohl aktivieren als auch reprimieren [25, 26, 55]. In seiner Funktion als Transkriptionsfaktor spielt THAP1 eine Rolle bei der Regulation von Apoptose [57, 63], der Zellproliferation und des Zellzyklus [55, 62] sowie bei der Myelinisierung von Neuronen [15].

Zusätzlich konnte ein für den gerichteten Transport von THAP1 in den Zellkern verantwortliches Kernlokalisierungssignal (*Nuclear Localization Signal, NLS*) in THAP1 C-terminal zur THAP-Domäne beschrieben werden [64]. Es wird/wurde vermutet, dass die im C-Terminus gelegene *Coiled-Coil*-Domäne eine wichtige Funktion bei der Interaktion von THAP1 mit anderen Proteinen spielt. Eine weitere Untersuchung auf die Funktion der C-Terminalen Domäne im Bezug auf die Bindeeigenschaft anderer potentieller Interaktionspartner von THAP1 ist Bestandteil dieser Arbeit. Die Funktion der Prolin-reichen Region ist bisher nicht bekannt.

Das innerhalb der *Coiled-Coil*-Domäne lokalisierte HBM-Motiv vermittelt die Interaktion zu dem transkriptionellen Kofaktor HCFC1, der als essentieller Bestandteil eines Gen-*Enhancer*-Komplex von Herpes-Simplex-Genen identifiziert wurde [65–67]. Eine umfangreiche Charakterisierung der Interaktion von THAP1 mit HCFC1 erfolgte im Rahmen dieser Arbeit.

### 2.3.2 Transkriptionelle Regulation in Eukaryoten

Das Zusammenwirken von Transkriptionsfaktoren mit verschiedenen Kofaktoren und anderen regulatorischen Elementen zur Regulation der Expression ist ein komplexer Prozess. Je nach Zielgen und Gewebe interagieren verschiedene Faktoren um ein entwicklungs- und gewebespezifisches Expressionsmuster zu etablieren und zu erhalten.

Die DNA in eukaryotischen Zellen liegt als Chromatin vor, das aus Nukleosomen genannten Komplexen aus DNA und (Histon-)Proteinen besteht [68, 69]. Über posttranslationale Modifikationen der Seitenketten von Histon-Proteinen kann die Zugänglichkeit der DNA für Proteine des Transkriptionsmechanismus verändert werden und somit die Expression von Genen reguliert werden. So führt eine Acetylierung der Histone H3 und H4 und eine Methylierung der Lysine 4 und 79 des Histons H3 dazu, dass sich das Chromatin entspannt und regulatorische Elemente der DNA zugänglicher für Transkriptions- und Kofaktoren wird. Eine Hypermethylierung und Deacetylierung führen zu einer stärkeren Kondensation und Inaktivierung des Chromatins. Die Zugänglichkeit des Chromatins betrifft allerdings nicht nur transkriptionsrelevante Proteine, sondern auch die DNase I. Aktive, zugängliche DNA-Abschnitte sind für einen enzymatischen „Angriff“ der DNase I eher zugänglich und werden daher als DNase I-hypersensitive Regionen bezeichnet, während das inaktive Chromatin wesentlich schlechter zugänglich für DNase I und somit resistenter gegen einen enzymatischen Verdau ist [70, 71].

Die direkte Expression eines Gens wird über den sogenannten Promotor reguliert, eine DNA-Region die stromaufwärts des Transkriptionsstartpunktes (TSS) liegt. Die Promotorregion besteht aus einem definierten Kern- oder Minimalpromotor und proximalen regulativen Regionen. Neben dem Promotor regulieren weitere funktionelle Elemente, sogenannte *cis*-regulative Elemente, die Gen-Expression. Zu dieser Gruppe von Elementen gehören *Enhancer*, *Silencer*, *Insulatoren* und *Locus Control Regions* (LCRs), die mehrere hundert Kilobasen entfernt von der eigentlichen Promotorregion liegen können [72, 73]. Als *trans*-regulative Elemente bezeichnet man universell oder sequenzspezifisch DNA-assoziierte Transkriptionsfaktoren, histonmodifizierende Proteine und weitere regulative Kofaktoren wie beispielsweise kleine RNA-Moleküle. Je nach rekrutierten Kofaktoren kann ein bestimmter Transkriptionsfaktor sowohl eine Aktivierung als auch eine Repression der Expression vermitteln [74].

Diese regulatorischen Komplexe binden nicht nur spezifisch an die Promotorsequenz, sondern können auch die Erkennungssequenzen der *cis*-regulativen Elemente erkennen und binden. Die für diese Interaktion notwendige räumliche Nähe wird durch eine als *Looping* bezeichnete Schlaufenbildung des Chromatins erzeugt. Eine Interaktion zwischen Promotor und *Enhancer* führt zu einer Aktivierung der Transkription, während die Bindung des

Transkriptionskomplexes an ein *Silencer*-Element zu einer Inhibition der Transkription führt [75]. Insulatoren sind genomische Regionen, die als Barriere zwischen regulatorischen Elementen und fremden Promotoren dienen und so unkontrollierte Interaktionen zwischen Promotoren und unspezifischen *Enhancern* oder *Silencern* verhindern [76]. *Locus Control Regions* (LCRs) sind weitreichende *cis*-regulatorische Elemente welche die Expression von funktionellen Gengruppen entwicklungs- oder gewebespezifisch regulieren.

Dank *Chromatin-Conformation-Capture*(3C)-Techniken und NGS-Sequenzierung steigt die Zahl der Genom-weiten Datensätze zur hierarchischen Genomorganisation und erlaubt mit Hilfe computergestützter Methoden eine Rekonstruktion dreidimensionaler Genomstrukturen und *DNA-Loops* [77]. Es wird deutlich, dass die Organisation des Genoms zielgerichtet und grundlegend ist, schon kleine Veränderungen können zu Entwicklungsstörungen [78] und Krankheiten [79, 80] führen. In der humangenetischen Diagnostik und auch bei der funktionellen Charakterisierung von Mutationen spielen *cis*-regulative Elemente eine immer wichtigere Rolle.

## 2.4 Ubiquitin in der Entstehung von Bewegungsstörungen

Neben Transkriptionsfaktoren können Fehlregulierung oder strukturelle Veränderungen sehr vieler Proteinklassen mit der Entstehung von hereditären neurologischen Erkrankungen und Bewegungsstörungen in Verbindung gebracht werden. Ein kleines Molekül, das in sehr vielen zellulären Signalwegen eine Rolle spielt ist das überall – ubiquitär – vorkommende Ubiquitin [81]. Fehlfunktionen von Genen, die Ubiquitin-assoziierte Proteine codieren, konnten bereits mit verschiedenen neurologischen Erkrankungen in Verbindung gebracht werden. Das prominenteste Beispiel hierfür ist *PARK2*. Mutationen in diesem Gen, welches die E3-Ubiquitinligase Parkin codiert, können eine juvenile Form von Parkinson verursachen [82, 83]. Auch das Angelman-Syndrom und Autismus lassen sich auf Expressionsunterschiede des Gens *UBE3A* zurückführen, das für die Ubiquitinligase UBE3A codiert [84, 85]. Die Ubiquitinierung ist ein reversibler Mechanismus zur posttranslationalen Modifikation von Proteinen. Ubiquitin ist ein in Eukaryoten hoch konserviertes und in allen eukaryotischen Zellen vorkommendes kleines Protein, das von den sogenannten Ubiquitinligasen kovalent an die Lysinreste von bestimmten Zielproteinen gebunden wird [81]. Es werden entweder einzelne Ubiquitine (Monoubiquitinierung) oder aus mehreren Proteinen bestehende Ubiquitin-Ketten (Polyubiquitinierung) gekoppelt. Diese Markierung von Proteinen kann verschiedenste Funktionen haben, zum Beispiel als Lokalisationssignal, Aktivierung von Kinasen oder als Signal für eine selektive Degradation durch das Proteasom. 80-90 % aller Proteine in Eukaryoten werden durch das Ubiquitin/Proteasom-System degradiert [86–88]. Die Anheftung von Ubiquitin wird schrittweise von drei Enzymen vermittelt: das Ubiquitin-aktivierende Enzym oder E1, das Ubiquitin-konjugierende Enzym oder E2 und schließlich die Ubiquitin-Protein-Ligase E3. Für eine Polyubiquitinierung werden weitere Ubiquitine mittels einer Isopeptidbindung zwischen dem Glycin 76 des zuletzt angehängten Ubiquitinmoleküls und dem Lysin 48 des nächsten Ubiquitins verbunden [89, 90]. Für eine proteosomale Degradation sind spezifische G76-K48 verknüpfte Ubiquitinketten notwendig, die aus mindestens 4 Molekülen bestehen [91]. Ubiquitin und die Ubiquitinierung von Proteinen ist essentiell für eine Vielzahl, wenn nicht aller, zellulärer Mechanismen, darunter die DNA-Reparatur, die Aktivierung von Kinasen, Zellmigration, Transkriptionelle Regulation und der Transport von Membranproteinen [83, 87, 88]. Die Ubiquitinierung ist also ein wichtiger Regulator vieler verschiedener Prozesse und Signalwege im ganzen Organismus. Eine Dysregulation dieses Mechanismus kann je nach betroffenem Zelltyp schwerwiegende Auswirkungen auf die zelluläre Homöostase haben und verschiedenste Erkrankungen verursachen.

## 2.5 Vorarbeiten und Zielsetzungen

### 2.5.1 Dystonie-THAP1

Die DYT-THAP1 ist eine progressive neurologische Erkrankung, die für Betroffene durch schmerzhafte Symptome und mangelnde Bewegungsfähigkeit eine massive Verschlechterung der Lebensqualität bedeutet. Eine Behandlung der Erkrankung ist bisher nur symptomatisch möglich. Mutationen im *THAP1*-Gen konnten als krankheitsursächlich identifiziert werden. Ein besseres Verständnis der physiologischen Funktion von THAP1 und der Effekte der identifizierten Mutationen auf die THAP1-Funktion sind essentiell für ein besseres Verständnis der Erkrankung und bilden die Grundlage für die Entwicklung zukünftiger Therapien der physiologischen Ursache.

Nach der ursprünglichen Identifizierung des *DYT1*-Promotors [25, 26] wurden weitere Vorarbeiten zur Identifikation neuer THAP1-Zielpromotoren und Interaktionspartner im Rahmen der Doktorarbeit von Dr. Alev Richter durchgeführt. Mittels *in silico* Analysen und Luciferase-Reportergen-Analysen wurde u.a. die Promotorregion des *THAP1*-Gens selbst als Zielpromotor identifiziert und auf einen 480 bp großen Kernpromotor eingegrenzt. Mittels Chromatin-Immunpräzipitation (ChIP) konnte die spezifische Bindung eines exprimierten THAP1-FLAG-Fusionsproteins an den *THAP1* Kernpromotor verifiziert werden. In sich daran anschließenden Reportergen-Analysen wurde eine THAP1-vermittelte Repression des *THAP1*-Kernpromotors aufgezeigt [92]. In einem Teilprojekt der hier vorgestellten Arbeit wurde in verschiedenen zellulären Modellen untersucht, inwieweit sich DYT-*THAP1*-ursächliche Mutationen in *THAP1* auf die DNA-Bindeigenschaften von THAP1 sowie dessen Funktion als Transkriptionsfaktor u.a. innerhalb des aufgeführten Autoregulationsmechanismus auswirken. In einem weiteren Teilprojekt der hier vorgestellten Arbeit wurde der Einfluss ausgewählter DYT-*THAP1*-verursachender Mutationen innerhalb der Coiled-Coil-Domäne untersucht, die in Vorarbeiten von Frau Dr. Alev Richter als kritische Region für die THAP1-THAP1-Homodimerisierung identifiziert werden konnte. Neben der Homodimerisierung von THAP1 konnten in weiteren Vorarbeiten mittels sogenannter GFP-TRAPS® und GST-Pulldown-Analysen YWHAE, HSC71 und HDAC3 als potentielle THAP1-Interaktionspartner identifiziert werden. Die im Rahmen der hier vorliegenden Doktorarbeit angefertigten Analysen, sollten diese möglichen Bindepartner verifizieren und deren funktionelle Relevanz für die Aktivität von THAP1 ermitteln.

## 2.5.2 Funktionelle Charakterisierung und Validierung mittels Exom-Sequenzierung identifizierter Mutationen in *HACE1*

Mittels Exom-Sequenzierung konnten in drei Geschwistern mit einer neurologischen Entwicklungsstörung mit sehr auffälligem, ataxischem Gangbild Mutationen im *HACE1*-Gen identifiziert werden. Beide Varianten wurden bisher in keiner Datenbank gelistet und für beide Mutationen wurde durch *in silico* Analysen ein vollständiger Funktionsverlust vorhergesagt. Während der laufenden Studie wurden zudem weitere Patienten mit biallelischen *Loss of function*-Mutationen in *HACE1* und ähnlicher klinischer Symptomatik identifiziert. Ob und über welche Mechanismen der Verlust von *HACE1* an der Pathophysiologie der Entwicklungsstörung beteiligt ist, wurde im Rahmen dieser Dissertation untersucht.

In verschiedenen zellbiologischen und proteinbiochemischen Experimenten an Fibroblasten der Patienten wurden die Auswirkungen der Mutation auf verschiedene bekannte Funktionen des *HACE1*-Proteins untersucht, um erste Hinweise auf die Prozesse, die zur Krankheitsentstehung führen, zu erlangen.



## 3 Materialien und Methoden

Um Mehrfachnennungen zu vermeiden sind die Firmensitze der Hersteller im Anhang zusammenfassend aufgelistet und werden im weiteren Verlauf der Arbeit nicht mehr angegeben.

### 3.1 Materialien

#### 3.1.1 Geräte

<b>Name</b>	<b>Modellbezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>
Abzüge		Köttermann
Autoklav		Webeco
Automatischer Zellzähler	TC20™ Automated Cell Counter	BioRad
Drucker	Digital Graphic printer UP-D895	SONY
Eismaschine		Bosch
Fluoreszenzmikroskop	Axioskop 2 plus HBO 100	Kübler
Fluoreszenzlampe	ebq 100 isolated	Kübler
Gefrierschränke (-20 °C)	Bosch electronic	Bosch
	Siemens GS34VV20	Siemens
Gefrierschränke (-80 °C)	Sanyo Ultra Low	Sanyo
Inkubatoren	Ln 75	Memmert
	Galaxy 170S	New Brunswick/ Eppendorf
Imager	MF ChemiBis 2.0	DNR-Biolmaging Systems
Kameras	CCD Black and White Video Camera	Sony
	Pentax MX-1	Ricoh Imaging K.K
Kammer für Agarosegele		Hoefer
Kammer für SDS-Gele	Mini Protean Tetra	BioRad
Kühlschränke		Kirsch Liebherr
Luminometer	LB 942 TriStar <sup>2</sup>	Berthold Technologies
Magnetrührer	KAMAG RH MR3002	Jahnke & Kunkel Heidolph
Mikroskope	Konfokales Laser Scanning Mikroskop	Zeiss
	Laborlux 12	Leitz
	Zeiss	Carl Zeiss AG
Mini Trans Blot Module		Bio Rad
Netzgeräte	LKB GFP200/400	Biostad-Pharmacia
	PowerPac Basic Power Supply	BioRad
	PowerPAC 300	BioRad
	MP-300V	Major Science
pH-Meter	PCE-BPH 1	Eppendorf
Pipetten		Eppendorf Gilson
Pipettierhilfe	Easypet-Pipetboy 9V DC	Eppendorf
Plattenzentrifuge	5804	Eppendorf
Schüttler/Schwenker	Polymax 1040	Heidolph

Schüttler (Überkopfschüttler)	Reax 2	Heidolph
Sequenziergerät	3130x/Genetic Analyzer	Applied Biosystems
Spektrophotometer	BioPhotometer® D30	Eppendorf
Sterilbänke	Hera Safe	Heraeus
	Hera Safe LaminAir HLB 2448Gs	Heraeus
	Centrifuge 5415C	Eppendorf
Tischzentrifugen	Centrifuge 5415R	Eppendorf
	Microfuge 22R	Beckman Coulter
	Thermal Cycler 2720	Applied Biosystems
Thermocycler	Veriti 96 well Thermal Cycler	Applied Biosystems
	T-gradient	Biometra
	C1000-Touch ThermoCycler	BioRad
	Comfort	Eppendorf
Thermomixer	Compact	Eppendorf
Transblot SD SemiDry		BioRad
Transfer Cell		
Typhoon FLA900		GE Healthcare
Ultraschall Homogenisator	SONOPLUS	Bandelin electronic
	Bioruptor Pico	Diagenode
Geldokumentationsdystem	FAS Digi	Bulldog Bio
	Gel Imaging System	
Vakuumpumpe	WOB-L Pres/Vac-Dry	Welch
		ABM Greiffenberger
Vakuumpumpen-Antrieb	Pump2	Antriebstechnik
		Savant
Vakuumtrockner	Slab Gel Dryer SGD 2000	Fisher Bioblock Scientific
Vortexer	Top Mix 11118	Bender & Hobein
	Vortex Genie	Saartorius
Waage	Kern	Saartorius
	Typ 2254	
	Analysewaage Typ 2492	GFL
Wasserbäder	GFL Typ 1003	
Zellzähler	TC20™ Automated Cell Counter	BioRad
Zentrifugen	Avanti J-30I Centrifuge	Beckman Coulter
Zentrifuge/Vortexer	CombiSpin FVL-2400	PeqLab Biotechnologie GmbH

### 3.1.2 Plastik- und Glaswaren

Name	Größe	Hersteller
Amicon ultra 0,5ml 100K		Millipore
Einmalspritzen	1 ml, 10 ml, 50 ml	Beckton Dickinson
Einmalkanülen	0.9 x 40 mm	Beckton Dickinson
Einmalskalpelle		Pfm medical AG
Glaspipetten	5 ml, 10 ml, 20 ml	Hirschmann Laborgeräte
Glasplatten	0,75 mm	BioRad
Illustra Sephadex G-50 Fine		GE Healthcare
DNA Grade		
Impfeschlinge		Sarstedt
Kryoröhrchen	1 ml	
Objektträger	26 x 76 mm / ca. 1mm	Heinz Heren Medizinalbedarf GmbH

Optical Reaction Plate	96 well	Applied Biosystems
Petrischalen	92 x 16 mm	Sarstedt
Pipettenspitzen	10 µl, 200 µl, 1000 µl, 5 ml	Sarstedt
Pipettenspitzen mit Filter	10 µl, 100 µl, 200 µl, 1000 µl	Nerbeplus
PVDF Westernblot Membrane		Roche
Reaktionsgefäße	0,2 ml, 0,5 ml, 1,5 ml, 2ml	Sarstedt
Reaktionsgefäße	15 ml, 50 ml	Sarstedt
Surelock Tubes	1,5 ml	Starlab
Zellheber		Th. Geyer
Zellkulturflaschen	25 cm <sup>2</sup> , 75 cm <sup>2</sup>	Sarstedt
Zellkulturplatten	6 well, 12 well, 24 well	Th. Geyer
Zellkulturschalen	100 mm, 150 mm	Nunc, Biochrom

### 3.1.3 Chemikalien

Name	Hersteller
3-(N-morpholino)propanesulfonic acid (MOPS)	Sigma-Aldrich
Acrylamid-30 % (Rotiphorese 30; 37,5:1)	Roth
Agar	Fluka
Ammoniumpersulfat	Roth
Ammoniumsulfat	Fluka Biochem
Ampicillin Roth	Roth
Antibiotic/ Antimycotic Solution	PAA Laboratories
Ascorbinsäure	Sigma Aldrich
Calbiochem® Protease Inhibitor Set V	Millipore
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich
Bovine Serumalbumin (BSA)	Sigma-Aldrich
Calciumchlorid	Serva
Chloroform	Merck
Complete, Mini Protease Inhibitor Cocktail	Roche
Coomassie Brilliant Blue G250	Merck
Coomassie Brilliant Blue R250	Merck
Dithiothreitol (DTT)	Sigma-Aldrich
Dibutyryl cAMP	Sigma-Aldrich
DMEM (High glucose)	Gibco
DO-Supplement (-Leu/-Trp)	Takara Clontech
DO-Supplement (-Leu/-Trp/-Ade/-His)	Takara Clontech
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Merck
Essigsäure	Merck
Ethanol 100 %	J.T Baker
Ehtidiumbromid 0,025 %	Roth
FCS	Gibco
FuGENE HD	Roche / Promega
Glycin	Sigma-Aldrich
Glucose	Merck
Glycerin	Calbiochem
HEPES	Sigma-Aldrich
HiDi-Formamid	Applied Biosystems
Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG)	Geyer

Kaliumchlorid	Fluka
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck
Kaliumacetat	Sigma-Aldrich
Kanamycin	Sigma-Aldrich
Knockout-DMEM	Invitrogen
Knockout™ Serum Replacement	Invitrogen
L-Glutathione reduced	Sigma-Aldrich
L-Glutamin	Invitrogen
Lipofectamin	Invitrogen
Lithiumacetat	Fluka
Lithiumchlorid	Sigma-Aldrich
Magermilchpulver	Merck
MEM NEAA	Invitrogen
Methanol	J.T. Baker
β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich
Midori Green Advanced DNA Farbstoff	Nippon Genetics
N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Roth
Natriumchlorid	Merck
Natriumhydroxid	Merck
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Sigma-Aldrich
Di-Natriumhydrogenphosphat	Merck
Natriumcarbonat	Sigma-Aldrich
Natriumpyruvat	
Natriumselenit	Sigma-Aldrich
Nonidet-P40 (NP-40)	Fluka
optiMEM	Gibco
o-Nitrophenyl-β-D-galactopyranosid- (ONPG)	Sigma-Aldrich
2 μl [32P]-γ-ATP (1,48 MBq)	Hartmann Analytic
Polyethylenglycol (PEG) 4000	Fluka
Pepton	Gibco
Peptone 140	Life Technologies
Penicillin / Streptomycin	Invitrogen
Phenol	AppliChem
ProLong Gold antifade Reagent with DAPI	Invitrogen
Progesteron	Sigma-Aldrich
Protaminsulfat	Sigma-Aldrich
Putrescin	Sigma-Aldrich
Rubidiumchlorid	Sigma-Aldrich
SB431542	Sigma-Aldrich
[35S] L-Methionine 18,5Mbq (500μCi) in 50μl	Hartmann Analytic
Star Pure Agarose- Low EEO Standard	Starlab
Transferrin, human	Millipore
Tris-Base MP	Biomedicals
Triton-X-100	Sigma-Aldrich
Trypton	Beckton Dickinson
Tween® 20	Sigma-Aldrich
Yeast extract	Beckton Dickinson
Yeast nitrogen base	Beckton Dickinson

### 3.1.4 Häufig genutzte Puffer und Lösungen

Soweit nicht anders vermerkt wurden alle Puffer und Lösungen in destilliertem Wasser (*Aqua dest*) angesetzt. Prozentangaben bei Flüssigkeiten beziehen sich auf v/v und bei Feststoffen auf w/v.

<b>PBS</b>	137 mM NaCl 2,6 mM KCl 6,5 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 1,5 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
<b>TBS</b>	150mM NaCl, 20mM Tris pH 8
<b>TBST</b>	1x TBS 0.05 % Tween

### 3.1.5 Antikörper

<b>Antikörper</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Anwendung</b>
Anti-Aktin (Kaninchen, polyklonal)	Sigma	Westernblot
Anti-FLAG M2 (Maus, monoklonal)	Sigma	Westernblot, ChIP, Immunhistochemie, Immunpräzipitation
Anti-GAPDH (Kaninchen)	Cell Signaling	Westernblot
Anti-Gal4-DNA-BD (Maus, monoklonal)	Clontech	Westernblot
Anti-GFP (Kaninchen, polyklonal)	Abcam	Westernblot
Anti-GST (Maus)	Santa Cruz	Westernblot
Anti-HACE1(Rabbit, monoklonal)	Abcam	Westernblot
Anti-HACE1 (Kaninchen, polyklonal)	Origene	Westernblot
Anti-HCF1 (Kaninchen, polyklonal)	Bethyl	Westernblot, ChIP
Anti-HDAC3 (Maus)	Cell Signaling	Westernblot
Anti-acetyl Histon H3 (Kaninchen, polyklonal)	Millipore	ChIP
Anti-c-Myc	Abcam	Westernblot, Immunpräzipitation,
Anti-RAC1 (Maus, monoklonal)	Thermo Scientific	Westernblot
Anti-RAC1 (Maus, monoklonal)	Millipore	Westernblot
Anti-THAP1 (Ziege, polyklonal)	Santa Cruz	ChIP
Anti-Mouse IgG-HRP (Ziege)	Thermo Scientific	Westernblot
Anti-Rabbit IgG-HRP (Ziege)	Thermo Scientific	Westernblot
Anti-Rabbit IgG-Alexa Fluor954 (Ziege)	Thermo Scientific	Immunhistochemie

### 3.1.6 Enzyme

<b>Enzym</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Anwendung</b>
Taq-DNA-Polymerase	MP Biomedicals, LLC	PCR, Sequenzierung
Taq-DNA-Polymerase	Qiagen	PCR, Sequenzierung
Taq-DNA-Polymerase	5PRIME	PCR, Sequenzierung
HighFidelity Polymerase	Takara	PCR, Klonierung
ExoSAP	GE Healthcare	Aufreinigung von PCR-Produkten
T4 Ligase	Roche	Klonierung
Fast Digest Enzyme	Fermentas/Thermofischer	Klonierung
Trypsin	Serva	Zellkultur
RNAseA	Quiagen	Plasmid-Präparation
ProteinaseK	Quiagen	DNA-Präparation

### 3.1.7 Oligonukleotide und Sonden

Im Rahmen dieser Arbeit wurden verschiedenste Oligonukleotide zur Klonierung, Mutagenese, Sequenzierung und für weitere PCR-Analysen verwendet. Sie wurden je nach Anwendung von den Firmen Biomers (Klonierung, Mutagenese) und Microsynth (Sequenzierungen, generelle PCRs) synthetisiert. Aufgrund der hohen Anzahl sind die einzelnen Primer im Material und Methoden Teil nicht aufgeführt.

Die für die qPCR-Analysen verwendeten Primer und Sonden wurden von der Firma LifeTechnologies synthetisiert. Für die *Housekeeping*-Gene *GAPDH* und *MAPK1* wurden kommerziell erhältliche Primer und Sonden von der Firma LifeTechnologies verwendet.

<b>Bezeichnung</b>	<b>Sequenzen</b>
<i>BIRC5</i> Promotor	Primer Forward: CAAGGACCACCGCATCTCTA Primer Reverse: GGAGGGCGGCTTGTACC TaqMan-Sonde: GGAGCGGGTGAGACTGCC
<i>RRM1</i> -Promotor	Primer Forward: GTTCCCGCCGGTTAGGTTTTG Primer Reverse: GGGCCCCATTGGATATGGAC TaqMan-Sonde: GACCCAGCGGGCTCTAG
<i>TBP</i>	Primer-Forward: CATTATCAACGCGGCCAG Primer-Reverse: TCCAGCACACTCTTCTCAGC TaqMan-Sonde: GCTGTTTAACTTCGCTTC
<i>TBP</i> -Promotor	Primer-Forward: CCTATGCTCACACTTCT CAT Primer-Reverse: GTACAATCTGTTACCTGGGTC TaqMan-Sonde: CGGAAGTGACATTATCAAC

<i>THAP1</i>	Primer-Forward: AGAGAATGAGAACAGTGTG Primer Reverse: TGATCAGATATGCAATGAC TaqMan-Sonde: ATCAGAAGTATGGGTCAG
<i>THAP1</i> -Promotor	Primer-Forward: CCCACTTCGGCAACTCTGAA Primer-Reverse: GCAGCTTCAACCTCACCTCT TaqMan-Sonde: GGCTAATCAGAGACAGTGG
<i>TOR1A</i> -Promotor	Primer Forward: AAACAAAAACACGTGGCCAACA Primer Reverse: GGAGGCCATCTTCTTCAGG TaqMan-Sonde: GGAGCAGAACCGAGTTTC

### 3.1.8 Expressionsplasmide

<b>Vektor</b>	<b>Herkunft/Hersteller</b>	<b>Anwendung</b>
pcDNA-3.1(A,B,C)	Invitrogen	Immunpräzipitation, IVTTs
pEGFP-N3	Clontech	Immunhistochemie
pFLAG-N3/ p3xFLAG-N3	Modifizierte pEGFP-N3 mit FLAG-Tag bzw. 3-fach FLAG-Tag anstelle der GFP-codierenden Sequenz	Immunpräzipitation, ChIP Taqman-Assay, Immunhistochemie
pGADT7	Clontech	Hefe-zwei-Hybrid
pGBKT7	Clontech	Hefe-zwei-Hybrid
pGEM-T-Easy-Vector	Promega	Klonierung
pGEX-4T2	Pharmacia	Bakterielle Überexpression

### 3.1.9 Verwendete Größenstandards

<b>DNA-Größenstandards</b>	HyperLadder I, Bionline Low DNA Mass Ladder, Invitrogen
<b>Protein-Größenstandard</b>	Precision Plus Protein Standards Dual Color, BioRad

### 3.1.10 Software und Internetseiten

<b>Name</b>	<b>Hersteller/URL</b>
Chromas lite	Technelysium Pty Ltd
Edit Seq	DNASStar Lasergene
ENCODE	<a href="http://genome.ucsc.edu/ENCODE/">http://genome.ucsc.edu/ENCODE/</a>
Ensembl	<a href="http://www.ensembl.org/index.html">http://www.ensembl.org/index.html</a>
FACSDiva	BD Bioscience
FlowJo	<a href="http://mbcf.dfci.harvard.edu/docs/oligocalc.html">http://mbcf.dfci.harvard.edu/docs/oligocalc.html</a> (Eugen Buehler)
Oligo Calculator	oligocalc.html (Eugen Buehler)
Seqman	DNASStar Lasergene
Sequencing analysis	Applied Biosystems
UCSC Genome Browser	<a href="http://genome.ucsc.edu/">http://genome.ucsc.edu/</a>

## 3.2 Methoden

### 3.2.1 Zellkulturtechniken

#### 3.2.1.1 Zelllinien und Kultivierung

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimente wurden mit verschiedenen Zelllinien durchgeführt. Sofern vorhanden sind die DSMZ-Nummern der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ) angegeben.

<b>Name</b>	<b>Herkunft</b>
HEK293 (ACC 305)	<i>Human embryonal kidney</i> , fibroblastoide Zelllinie aus humaner, embryonaler Niere
HeLa (ACC 57)	“Henrietta Lacks”, humane Epithelzellen aus einem Zervix-Karzinom
SH-SY5Y (ACC 209)	Epitheliale/neuronale Zelllinie aus humanem Neuroblastom
Primäre Fibroblasten	Dermale Fibroblasten von Patienten und Kontrollpersonen, gewonnen durch Hautbiopsien

Alle Zelllinien wurden, soweit nicht anders gekennzeichnet, in Dulbecco's Modified Eagle Medium (Invitrogen) mit 10 % FCS und 1 % Antibiotikum kultiviert. Die Zellkulturen wurden in 75 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen in einem Inkubator bei 37 °C unter 5 % CO<sub>2</sub>-Begasung in wassergesättigter Atmosphäre kultiviert. Das Wachstum und die Zellgesundheit wurden unter dem Mikroskop kontrolliert. Alle zwei bis drei Tage wurden die Zellen je nach Dichte in einem Verhältnis von 1:5 bis 1:9 (Zellsuspension: Medium) passagiert. Um die adhärenen Zellen abzulösen wurde eine sterile Trypsin/EDTA-Lösung verwendet.

<b>Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) 101</b>	1x DMEM high glucose 10 % FCS, hitzeinaktiviert 1 % Antibiotic/Antimycotic Solution
<b>Trypsin/EDTA</b>	40 g/l Trypsin 0,7 mM EDTA In PBS

### 3.2.1.2 Kryokonservierung von humanen Zellen

Um die Zelllinien längerfristig zu lagern wurden Kryokulturen angelegt und in Flüssigstickstoff gelagert. Dafür wurden Zellen in 75 cm<sup>2</sup> Kulturflaschen ausgesät und bei Erreichen der Konfluenz mit Trypsin/EDTA abgelöst und in Suspension gebracht. Die Konzentration der Zellen wurde auf 4\*10<sup>6</sup> Zellen pro ml Medium eingestellt. Je 500 µl Zellsuspension wurden in ein Kryoröhrchen mit 500 µl vorgelegtem Einfriermedium überführt. Das Einfrieren erfolgte schrittweise in mit Isopropanol gefüllten Einfrierboxen bei -80 °C, nach 24 h wurden die Zellen dann in Flüssigstickstoff gelagert.

<b>Einfriermedium</b>	80 % DMEM 101
	20 % DMSO

### 3.2.1.3 Auftauen von humanen Zellen

Bei Bedarf wurden die Kryokulturen kurz im Wasserbad bei 37 °C angetaut und dann in ein 50 ml Reaktionsröhrchen mit 20 ml vorgewärmtem Medium überführt. Um das zytotoxische DMSO zu entfernen wurden die Zellen in einer 5-minütigen Zentrifugation bei 500 g pelletiert und das Medium verworfen. Anschließend wurden die Zellen in 5 ml frischem Medium resuspendiert und in 25 cm<sup>2</sup> Kulturflaschen ausgesät. Ein Mediumwechsel erfolgte nach 24 h.

### 3.2.1.4 Bestimmung der Zellzahl

Zur Bestimmung der Zellkonzentration einer Zellsuspension wurde der TC20™ Automated Cell Counter der Firma BioRad verwendet. Hierfür wurden 10 µl der Zellsuspension in eine Einmalzählkammer pipettiert, mit dem Einführen der Zählkammer ermittelte der Zellzähler automatisch die Anzahl der Zellen pro Milliliter Suspension.

### 3.2.1.5 Transiente Transfektion humaner Zellen mittels Lipofektion

Als Lipofektion wird die Transfektion von Zellen mittels kationischer Lipide bezeichnet, die mit den Nukleinsäuren – in diesem Fall Plasmide oder siRNA – DNA-Lipid-Komplexe bilden [93]. Diese werden endozytotisch von den Zellen aufgenommen. In dieser Arbeit wurden die Transfektionsreagenzien FuGENE (Promega) für die Transfektion mit Plasmiden und Lipofectamin RNAimax (Invitrogen) für die Transfektion mit siRNA verwendet. Für die Transfektion wurden die Zellen in definierter Zellzahl (siehe Versuchsbeschreibungen) ausgesät und 24 h bei 37 °C inkubiert, um eine Phase des exponentiellen Wachstums zu erreichen. Transfektionsreagenz und Nukleinsäuren wurden im Verhältnis 2:3 in FCS-freiem Medium (DMEMpure) bzw. serumreduziertem Medium (OptiMEM) gemischt und für 25-30 min bei

Raumtemperatur inkubiert, so dass sich DNA-Lipid-Komplexe bilden konnten. Je nach Zellkulturgefäß ergaben sich folgende Pippetierschemata für die Transfektionsansätze:

<b>Wachstumsfläche</b>	<b>siRNA</b>	<b>Plasmid-DNA</b>
6-well Platte (pro Well)	250 µl OptiMEM 4 µl Lipofectamin 6µl siRNA	250 µl DMEMpure 4 µl FuGENE 0,5 µg Plasmid
100 mm Platte	1000 µl OptiMEM 20 µl Lipofectamin 15 µl siRNA	1000 µl DMEMpure 20 µl FuGENE 1-3 µg Plasmid
150 mm Platte	2000 µl OptiMEM 30 µl Lipofectamin 30 µl siRNA	2000 µl DMEMpure 30 µl FuGENE 5-7 µg Plasmid

Vor der Zugabe des Transfektionsansatz wurde ein Mediumwechsel mit frischem DMEM 101 durchgeführt. Nach 24 bis 48 Stunden Inkubation wurden die Zellen geerntet und weiterverwendet.

### 3.2.1.6 Migration von Fibroblasten (*Scratch-Assay*)

Um Veränderungen im Migrationsverhalten von Patientenfibroblasten zu messen wurde ein sogenannter *Scratch*- oder Wundheilungs-Assay durchgeführt. Hierfür wurden die Fibroblasten in einer 24-Well Platte ausgesät. Nachdem eine vollständige Konfluenz erreicht wurde, wurde der Zellrasen mit der Spitze einer 100 0µl Pipette aufgekratzt und anschließend zweimal mit PBS gewaschen um Zelltrümmer zu entfernen. Die freige kratzte Fläche („*scratch*“) wurde direkt nach dem Zufügen der „Wunde“ und nach 24 h photographisch dokumentiert und anschließend die Größe der Fläche in Pixel gemessen. Daraus wurde der relative Wundverschluss berechnet und anhand der Messwerte der wildtyp Fibroblasten normiert. Für die Dosis-Effekt-Kurve des Inhibitors NSC23766 ( $\geq 97\%$ , Sigma-Aldrich) wurden die Zellen mit 5 µM, 10 µM, 15 µM, 20 µM oder 30 µM des Inhibitors, gelöst in Wasser, behandelt.

## 3.2.2 Bakterien

### 3.2.2.1 Bakterienstämme und Kultivierung

Es wurden zwei verschiedene *E.coli* Stämme verwendet, zum einen DH5 $\alpha$  zur Amplifikation von Plasmiden sowie BL21-CondonPlus (DE3)-RIL zur induzierten Überexpression von GST-Fusionsproteinen.

<b>Name</b>	<b>Genotyp</b>
DH5 $\alpha$	F- endA1 glnV44 thi-1 recA1 relA1 gyrA96 deoR nupG $\Phi$ 80d <i>lacZ</i> $\Delta$ M15 $\Delta$ ( <i>lacZYA-argF</i> )U169, hsdR17( $r_K$ - $m_K$ +), $\lambda$ -
BL21-CondonPlus (DE3)-RIL	F- ompT gal dcm lon hsdS <sub>B</sub> ( $r_B$ - $m_B$ -) $\lambda$ (DE3 [ <i>lacI lacUV5-T7 gene 1 ind1 sam7 nin5</i> ]) <i>E.coli</i>

Die Bakterien wurden entweder auf LB-Agarplatten ausgestrichen oder in LB-Flüssigmedium angeimpft und für 16 Stunden bei 37 °C inkubiert. Die Inkubation erfolgte in einem Brutschrank bzw. in einem Schüttelinkubator bei einer Umdrehungszahl von 220 rpm. Eine spezifische Selektion erfolgte durch ein dem Vektorresistenzgen entsprechendes Antibiotikum, je nach Vektor entweder mittels Ampicillin oder Kanamycin.

<b>LB-Medium</b>	20 g/l Trypton Pepton 10 g/l Hefeextrakt 20 g/l NaCl
<b>frisch zugesetzt:</b>	+100 $\mu$ g/ml Ampicillin oder +35 $\mu$ g/ml Kanamycin
<b>Agarplatten</b>	LB-Medium 16 g/l Agar +100 $\mu$ g/ml Ampicillin mit 40 $\mu$ g/ml X-Gal oder +35 $\mu$ g/ml Kanamycin

#### 3.2.2.2 Herstellung chemisch-kompetenter *E.coli* Bakterien nach Mandel & Higa

Die Herstellung kompetenter Bakterien durch die Behandlung mit CaCl<sub>2</sub> wurde erstmals von Mandel und Higa [94] beschrieben. Zur Herstellung chemisch kompetenter Bakterien erfolgte eine Kultivierung auf einer Antibiotika-freien LB-Platte über Nacht. Von dieser Platte wurden am nächsten Tag einige Klone in eine 5 ml Übernachtskultur inokuliert. Mit dieser Übernachtskultur wurden am folgenden Tag 500 ml LB-Medium inokuliert und für ca. vier Stunden bei 37 °C und 220 rpm im Schüttelinkubator inkubiert, bis für die Vorkultur eine optische Dichte (OD<sub>600</sub>; bei 600 nm) von 0,3-0,4 gemessen wurde. Für das Erreichen der

chemischen Kompetenz müssen sich die Bakterien in einer exponentiellen Wachstumsphase befinden. Anschließend wurde die Flüssigkultur in zwei gekühlten 50 ml Reaktionsröhrchen bei 4600 rpm, 4 °C für 10 Minuten zentrifugiert, bis alle Bakterien pelletiert waren. Das Zellsediment wurden zweimal in 10 ml eiskalter MgCl<sub>2</sub>-Lösung und einmal in 10 ml CaCl<sub>2</sub>-Lösung gewaschen, anschließend wurden die Bakterien gelöst in 10 ml CaCl<sub>2</sub>-Lösung über Nacht auf Eis inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Zellen erneut bei 4600 rpm, 4 °C für 10 Minuten pelletiert und in je 5 ml 15 %iger Glycerol-Lösung resuspendiert. In Aliquots von 110 µl wurden die Bakterien in Flüssigstickstoff schockgefroren und anschließend bei -80 °C gelagert [95].

<b>MgCl<sub>2</sub>-Lösung</b>	100 mM MgCl <sub>2</sub>
<b>CaCl<sub>2</sub>-Lösung</b>	100 mM CaCl <sub>2</sub>
<b>Glycerol-Lösung</b>	85 % 100 mM CaCl <sub>2</sub> + 15 % Glycerol

### 3.2.2.3 Transformation chemisch-kompetenter Bakterien

Für eine Transformation wurden 50 µl einer aufgetauten Suspension chemisch kompetenter Bakterien mit 5-10 µl eines Ligationsansatzes oder 1 µl Plasmid-DNA gemischt. Es erfolgte eine 10-minütige Inkubation auf Eis mit einem anschließenden Hitzeschock für 2 Minuten bei 42 °C. Damit die Bakterien die entsprechende Antibiotikum-Resistenz ausbilden können, wurden sie in 450 µl LB-Medium für eine Stunde bei 37 °C im Schüttelinkubator inkubiert. Danach wurden die Bakterien entsprechend des Selektionsmarker auf LB-Agar-Platten mit dem jeweiligen Antibiotikum ausplattiert und für ca. 16 h bei 37 °C oder über für 72 h bei Raumtemperatur inkubiert.

### 3.2.2.4 Überexpression von GST-Fusionsproteinen im *E.coli*-Stamm BL21

Um große Mengen von GST-gekoppelten Fusionsproteinen herzustellen, wurden diese im *E.coli*-Stamm BL21 exprimiert. Dafür wurden die Bakterien mit einem prokaryotischen Expressionsplasmid pGEX4T2 transformiert, in welches die Sequenz des zu untersuchenden Zielgens inseriert wurde. Durch Zugabe von IPTG zum Kulturmedium wird eine Expression des gewünschten Fusionsproteins mit einer N-Terminal gekoppelten GST-Domäne aus *Schistosoma japonicum* [96] vom pGEX4T2-Vektors induziert.

Für die in dieser Arbeit durchgeführten Experimente wurden GST-THAP1-pGEX4T2 (GST-THAP1-Protein), GST-HDAC3-pGEX4T2 (GST-HDAC3-Protein) und pGEX4T2 (GST-Protein) verwendet.

Für die Überexpression wurde zuerst eine kleine Vorkultur von 2 ml Selektionsmedium (Ampicillin) mit einem Klon der transformierten Bakterien angeimpft und für 5-6 Stunden bei 37 °C und 250 rpm im Schüttelinkubator kultiviert. Mit dieser kleinen Vorkultur wurden 100 ml Selektionsmedium angeimpft und über Nacht bei 37 °C und 250 rpm inkubiert. Am nächsten Tag wurden 500 ml Selektionsmedium mit 5 ml der großen Vorkultur inokuliert. Alle 30-60 Minuten wurde die optische Dichte der 500 ml Kultur gemessen. Die OD<sub>600</sub> zum Zeitpunkt der Inokulation lag in der Regel bei 0,05. Bei einer OD<sub>600</sub> von 0,5 wurde IPTG mit einer finalen Konzentration von 0,5 mM zugegeben um die Expression des Fusionsproteins zu induzieren. Die Bakterienkultur wurde für 3 weitere Stunden bei 37 °C und 250 rpm inkubiert und anschließend bei 6000 rpm für 15 Minuten pelletiert. Bis zur Sonifikation wurden die Bakterien bei -80 °C gelagert.

### 3.2.3 Hefen

#### 3.2.3.1 Hefestamm und Kultivierung

In dieser Arbeit wurde der Hefestamm AH109 mit folgendem Genotyp verwendet:

Name	Genotyp
AH109	MATa, trp1-901, leu2-3, 112, ura3-52, his3-200, gal4Δ, gal80Δ, LYS2::GAL1UAS-GAL1TATA-HIS3, GAL2UAS-GAL2TATA-ADE2, URA3::MEL1UAS-MEL1TATA-lacZ, MEL1

Die Hefen wurden auf YPD-Agarplatten bei 30 °C im Brutschrank oder als Flüssigkultur in YPD-Medium bei 30 °C und 250 rpm kultiviert. Etwa alle 10 Tage erfolgte ein Umsetzen auf eine frische YPD-Agarplatte oder eine Verdünnung der Flüssigkultur.

<b>YPD-Medium (Vollmedium)</b>	10 g/l Hefeextrakt 20 g/l Pepton 140 20 g/l Glucose (nach dem Autoklavieren)
<b>YPD-Agarplatten</b>	YPD-Medium 20 g/l Agar
<b>10x -2 SD dropout solution</b>	6,4 g/l DO supplement -Leu/-Trp
<b>10x -4 SD dropout solution</b>	6 g/l DO supplement -Ade/-His/-Leu/-Trp
<b>SD-Medium (Selektionsmedium)</b>	6,7 g/l Yeast nitrogen base w/o aa nach dem Autoklavieren: 1x dropout solution -2 SD / -4 SD 20 g/l Glucose

**SD-Platten**      -2 SD / -4 SD-Medium  
20 g/l Agar

### 3.2.3.2 Transformation des Hefestammes *AH 109*

Die Transformation der Hefen für ein Hefe-zwei-Hybrid Assay erfolgte nach einem modifizierten Protokoll der Lithium-Acetat Methode [97–100]. Zuerst wurde eine Starterkultur in 5 ml YPD-Medium mit Hefen einer YPD-Agarplatte angeimpft und 2-3 Tage bei 30 °C im Schüttelinkubator kultiviert. Mit dieser Kultur wurde am Tag der Transformation eine 50 ml Vorkultur inokuliert und für 4-5 Stunden bei 30 °C inkubiert. Die Hefen wurden dann in ein 50 ml Reaktionsgefäß überführt und bei 3000 rpm für 5 min pelletiert. Es folgten Waschschriffe in 20 ml sterilem destilliertem Wasser, und je 1 ml frischem TE-Puffer und TE/LiAc-Puffer. Anschließend wurden die Hefen in 250-400 µl TE/LiAc-Puffer aufgenommen und je 50 µl wurden zu einem Transformationsansatz zugegeben.

<b>Transformationsansatz</b>	300 µl TE/LiAc PEG 40 5 µl Lachs-Sperma-DNA je 1 µl Midi-Präparation bei einer Kotransformation 50 µl TE/LiAc-Hefesuspension
------------------------------	---

Die Transformationsansätze wurden gevortext und für 30 Minuten im Schüttelinkubator bei 30 °C inkubiert. Danach erfolgte ein Hitzeschock für 15 Minuten bei 42 °C und eine 1-minütige Inkubation auf Eis. Schließlich wurde der ganze Transformationsansatz auf einer -2 SD-Platte ausgestrichen und für 3-4 Tage im Brutschrank bei 30 °C inkubiert.

#### Stammlösungen:

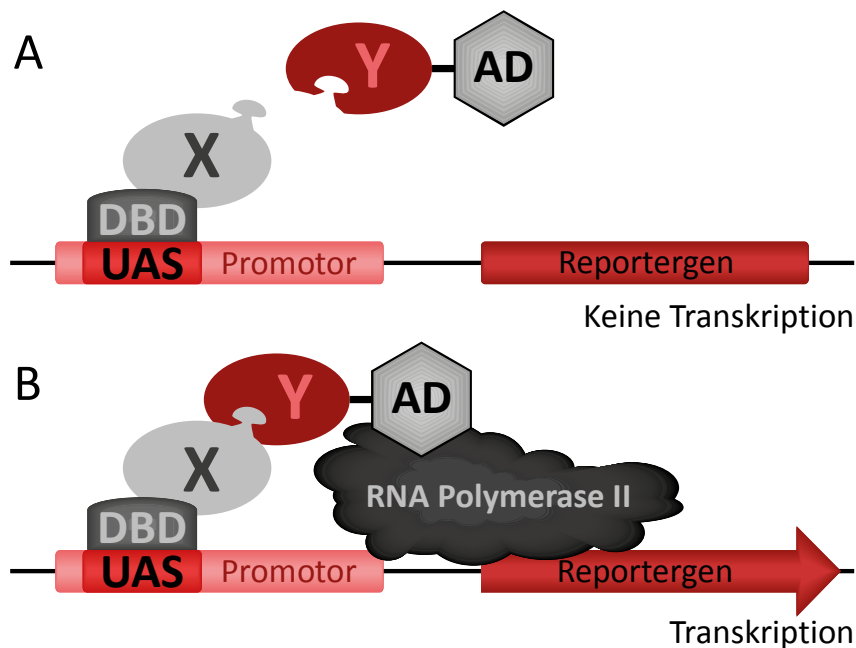
<b>10X TE (Tris/EDTA-Puffer)</b>	100 mM TE
<b>10X LiAc (Lithiumacetat)</b>	100 mM LiAc, pH mit Essigsäure auf 7,5
<b>PEG (Polyethylenglycol) 4000</b>	50 % PEG 4000 (w/v)

#### Arbeitslösungen:

<b>1X TE</b>	10X TE mit a.dest verdünnen 1:10
<b>1x TE/LiAc</b>	10X TE und 10X LiAc mit a.dest verdünnen 1:10
<b>1x TE/LiAc PEG 40</b>	10X TE und 10X LiAc mit 50 % PEG verdünnen 1:10

### 3.2.3.3 Hefe-zwei-Hybrid Assay

Der Hefe-zwei-Hybrid Assay nach Fields und Song [101] und Chien [102] ist eine *in-vivo* Methode um Protein-Protein-Interaktionen zu charakterisieren. Es kann sowohl die Bindung von vollständigen Proteinen als auch von Proteinfragmenten untersucht werden. Die Methode beruht auf einem Köder-Beute Prinzip, bei der ein Zielprotein als Köder (*bait*) mit einer Gal4-DNA-Bindedomäne („DBD“) fusioniert wird während der potentielle Bindepartner als Beute (*prey*) an die entsprechende Gal4-Aktivierungsdomäne („AD“) fusioniert wird (siehe Abb. 3.2.1). Die Fusion erfolgte über die Insertion des codierenden Bereiches des Zielproteins in den pGBKT7-(Köder-)Vektor bzw. pGADT7-(Beute-)Vektor. Die DBD bindet an Gal4-*upstream activating sequences* (UAS) und TATA-Boxen. Kommt es zu einer Interaktion der zu untersuchenden Proteine, nähern sich auch die Fusionsdomänen an und können so interagieren und die Transkription von vier in das Genom des verwendeten Hefestammes inserierten Reportergenen (ADE2, HIS3, lacZ und MEL1) aktivieren. Der Hefestamm AH109 wird im Matchmaker Gal4 Two Hybrid System 3 von Contech verwendet und ist auxotroph für Adenin, Histidin, Tryptophan und Leucin.



**Abbildung 3.2.1: Schematische Darstellung des Hefe-zwei-Hybrid-Assay** (nach Brückner et al. 2009,[103]) A) Die DNA-Bindedomäne (DBD), die mit einem der Zielproteine (X) fusioniert ist, bindet an die *Upstream-Activation-Sequence* (UAS) stromaufwärts des Promotors. Dies reicht jedoch für die Aktivierung der Expression der Reportergene nicht aus. B) Erst wenn das zweite Zielprotein (Y), das an die Aktivierungsdomäne (AD) fusioniert ist, auch an das Zielprotein X bindet, kann die RNA-Polymerase II rekrutiert und die Transkription der Reportergene aktiviert werden.

Das bedeutet, dass die Hefen nur bei einer erfolgreichen Kotransformation beider Plasmide auf -2 SD-Platten (ohne Leucin und Tryptophan) und nur bei einer Interaktion der beiden Zielproteine auf -4 SD-Platten (ohne Leucin, Tryptophan, Adenin und Histidin) wachsen können.

Die Kotransformation der Hefen mit den beiden Expressionsplasmiden Insert-pGADT7 und Insert-pGBKT7 wurde wie in Absatz 3.2.3.2 beschrieben durchgeführt. Nach einer 3-4 tägigen Inkubation im Brutschrank bei 30 °C wurden jeweils 8 Hefeklone pro Transformation auf vorher unterteilte -2 SD und -4 SD Agarplatten ausgestrichen. Nach 7-14 Tagen konnte nun differenziert werden, welche Hefen wachsen (=positive Protein-Interaktion) und nicht wachsen (=keine Protein-Interaktion). Um sicherzugehen, dass auch bei nicht-wachsenden Hefen beide Fusionsproteine exprimiert werden, wurden gegebenenfalls Westernblot-Analysen durchgeführt (siehe 3.2.3.4 und 3.2.6.4).

<b>10x -2 SD Dropout Solution</b>	6,4 g/l DO supplement -Leu/-Trp
<b>10x -4 SD Dropout Solution</b>	6 g/l DO supplement -Ade/-His/-Leu/-Trp
<b>SD-Medium (Selektionsmedium)</b>	6,7 g/l Yeast Nitrogen Base w/o aa nach dem Autoklavieren: 1x Dropout Solution -2 SD / -4 SD 20 g/l Glucose
<b>SD-Platten</b>	-2 SD / -4 SD-Medium 20 g/l Agar

#### 3.2.3.4 Proteinextraktion aus Hefen

Um eine erfolgreiche Kotransformation der Hefen zu überprüfen, wurde eine 3 ml Flüssigkultur in -2 SD-Selektionsmedium angeimpft und für 2-3 Tage bei 30 °C im Schüttelinkubator kultiviert. Dann wurden 1,5 ml der Kultur in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und bei 3000 rpm für 5 min pelletiert. Das Sediment wurde in 70-100 µl 4x SDS-Probenpuffer resuspendiert und die Hefen durch eine Inkubation bei 95 °C für 10 Minuten aufgeschlossen sowie die Proteine denaturiert. Darauf folgend wurde das Lysat mittels SDS-PAGE und Westernblot analysiert (siehe Abschnitt 3.2.5.4f).

## 3.2.4 Molekularbiologische Methoden

### 3.2.4.1 Extraktion und Aufreinigung von DNA

#### Mini-Präparation von Plasmiden

Als Grundlage der Mini-Präparationen dienten 2 ml Übernachtskulturen die mit je einer transformierten *E.coli* Kolonie inokuliert wurden. Für die Präparation wurden 1,5 ml einer Kultur für 5 min bei 5000 rpm pelletiert, das Sediment wurde in 300 µl Mini-Puffer 1 resuspendiert. Durch Zugabe von 300 µl Mini-Puffer 2 und eine 3-minütige Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Bakterien mittels alkalischer Lyse aufgeschlossen. Die Neutralisation des Lysats und gleichzeitige Präzipitation von RNA und Proteinen erfolgte durch 300 µl eiskalten Mini-Puffer 3. Nach einem Zentrifugationsschritt von 15 min bei 10 000 rpm und 4 °C wurde der wässrige Überstand in 500 µl eiskaltes Ethanol überführt. Der Überstand enthielt die Plasmid-DNA, welche durch Ethanol ausgefällt wurde. Durch eine erneute Zentrifugation von 20 min bei 14 000 rpm und 4 °C wurde die DNA pelletiert. Anschließend wurde die DNA mit 300 µl 70 % Ethanol gewaschen und dann in einer SpeedVac getrocknet. Die DNA wurde anschließend in 15 µl HPLC-Wasser gelöst. Zur Kontrolle des Restriktionsprofils auf eine erfolgreiche Ligation des gewünschten Inserts wurde im Anschluss ein Restriktionsverdau (siehe Abschnitt 3.2.4.7) durchgeführt und das Plasmid gegebenenfalls durch Sequenzierung auf Mutationen im Insert geprüft.

<b>Minipräparation-Puffer 1</b>	10 mM EDTA 10 50 mM Tris-HCl, pH 8,0 100 µg/ml RNase
<b>Minipräparation-Puffer 2</b>	0,2 M NaOH 1 % SDS
<b>Minipräparation-Puffer 3</b>	CH <sub>3</sub> COO-K 3 M pH 5,5 einstellen mit CH <sub>3</sub> COOH

#### Midi-Präparation

Für den Einsatz von Expressionsplasmiden in funktionellen Analysen wurden diese in einem mittleren Maßstab aus Bakterien extrahiert. Dafür wurde eine 50 ml Übernachtskultur mit entsprechend transformierten *E.coli* angeimpft und die Expressionsplasmide mittels Qiagen Plasmid Midi Kit nach Herstellerprotokoll isoliert. Anschließend wurde die DNA-Konzentration des Eluats bestimmt (siehe 3.2.4.2).

### **Gelextraktion**

Die Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen wurde mit dem QIAquick Gel Extraktion Kit von Qiagen nach Herstellerprotokoll durchgeführt. Je nach Stärke der mit einem Skalpell aus dem Gel ausgeschnittenen DNA-Bande wurde diese mit 15-20 µl HPLC-Wasser eluiert.

### **Aufreinigung von DNA/Chromatin („Input-Kontrolle“)**

Um die gesamt-DNA/Chromatin als Input-Kontrolle für eine Chromatin-Immunpräzipitation (Abschnitt 3.2.4.9f) aufzureinigen, wurden 20-50 µl formaldehyd-fixiertes Chromatin (siehe Abschnitt 3.2.4.9) über Nacht bei 65 °C inkubiert, um das *Crosslinking* aufzuheben. Anschließend erfolgte eine 2 stündige Inkubation mit je 1 µl Proteinase K und Glycogen, um DNasen zu verdauen und die DNA-Ausbeute zu erhöhen. Die DNA-Lösung wurde in einem 5-fachen Volumen PB-Puffer (Quiagen) aufgenommen und mit dem QIAquick Gel Extraction Kit von Quiagen nach Herstellerprotokoll aufgereinigt. Abschließend wurde die DNA in 100 µl DNase-freiem Wasser zweimal eluiert. Für folgende PCR und qPCR-Analysen wurde 1 µl Input-DNA je Probe eingesetzt.

### **Aufreinigung von Plasmiden**

Mittels Restriktionsenzym linearisierte Plasmide wurden mit Millipore Centrifugal Filter Units nach Herstellerprotokoll aufgereinigt.

### **Aufreinigung von Sequenzierproben**

Sequenzierproben wurde nach der Sequenz-PCR mittels Gelfiltration aufgereinigt, um überschüssiges BigDye zu entfernen. Bei einer Anzahl von bis zu acht Proben wurden diese über das „DyeEx 2.0 Spin Kit“ von Qiagen nach Herstellerangaben aufgereinigt. Eine größere Anzahl Sequenzierproben wurde über Illustra Sephadex G-50 Fine DNA Grade (GE Healthcare) in Multiscreen-Filterplatten (Millipore) aufgereinigt.

### **3.2.4.2 Extraktion und Aufreinigung von RNA aus humanen Zellen**

Um die gesamte RNA aus Zellen zu isolieren wurde das RNeasy Mini Kit der Firma Qiagen verwendet. Für RNA-Analysen wurden die Zellen mit 300.000 bis 500.000 Zellen pro Well in 6-Well Platten ausgesät und nach 48-72 h für die RNA-Extraktion geerntet. Optional wurden die Zellen 24 h nach der Aussaat transient transifiziert (Abschnitt 3.2.1.5). Für die Extraktion wurden die Zellen auf Eis einmal mit kaltem PBS gewaschen und dann mit einem Zellschaber in 500 µl kaltem PBS abgelöst und in ein Reaktionsgefäß überführt. Bei 1500xg wurden die Zellen für 5 min bei 4 °C pelletiert. Das Zellsediment konnte bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C

gelagert werden. Danach erfolgte die RNA-Extraktion nach Herstellerprotokoll. Die isolierte RNA wurde zweimal mit 40 µl RNase-freiem Wasser eluiert und nach der Konzentrationsbestimmung bei -80 °C gelagert.

### 3.2.4.3 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäurelösungen

Die Konzentration und Reinheit von Nukleinsäure-Lösungen wurde mittels Eppendorf BioPhotometer®D30 bestimmt. Es wurden 2 µl einer Nukleinsäure-Lösung auf die Nanoküvette pipettiert und die Absorption bei 260 nm und 280 nm Wellenlänge gemessen. Die Absorption bei 260 nm ergibt die Konzentration der Nukleinsäuren in Lösung, eine Absorptionseinheit A260 ergibt 50 µg dsDNA/ml bzw. 40 µg ssRNA/ml. Der Quotient aus der Absorption von 260 nm und 280 nm gilt als Indikator für eine Verunreinigung durch Proteine. Ein Wert zwischen 1,8-2,0 (A260 nm/A280 nm) gilt als optimal für DNA-Lösungen, für RNA-Lösungen sollte der Absorptionsquotient bei 1,9-2,1 liegen.

### 3.2.4.4 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Polymerasekettenreaktion ermöglicht eine Amplifikation von spezifischen DNA-Fragmenten. In dieser Arbeit wurden verschiedene Polymerasen und Oligonukleotide (Primer) für verschiedene Versuchsansätze verwendet. Das Resultat der PCR kann durch verändern von *Annealing*-Temperatur, Elongationszeit, Zyklenzahl und die eingesetzte Menge an *Template*-DNA optimiert werden. Soweit nicht anders vermerkt wurden alle genannten Polymerasen nach Herstellerprotokoll verwendet.

#### **PCR mit *Taq*-Polymerase**

Für PCRs von DNA-Fragmente bis zu einer Größe von 1,5 kb wurde eine hitzebeständige *Taq*-Polymerase von MP-Biomedicals, 5'Prime oder Qiagen nach Herstellerangaben eingesetzt. Diese trifft für die Sequenzierung von Patienten-DNA und PCRs nach einer CHIP zu.

<b>Temperatur</b>	<b>Zeit</b>	
96 °C	2-3 min	} 25-35 Zyklen
96 °C	30 s	
48-60 °C	30 s	
72 °C	30 s – 4 min	
72 °C	7 min	

### PCRs mit *high fidelity* Polymerase (Takara)

Da für Klonierungen ein mutationsfrei amplifiziertes DNA-Fragment benötigt wird, wurden Amplifikationen von DNA-Fragmenten zur anschließenden Insertion in Expressionsplasmide mit der *high fidelity* Polymerase PrimeSTAR GXL von Takara durchgeführt. Als Template dienten hier Sequenz-verifizierte Vektoren oder *human fetal brain* cDNA. Diese Polymerase hat sich durch eine extrem geringe Fehleranfälligkeit bei PCRs für Klonierungen bewährt. Anders als die *Taq*-Polymerase erzeugt die PrimeSTAR GXL keinen Adenin-Überhang am 3'-Ende des Amplikons, so dass das PCR-Produkt für eine Ligation (siehe 3.2.4.5) in einen Shuttlevektor nochmals für 20-30 Minuten bei 72 °C mit der *Taq*-Polymerase von MP-Biomedicals inkubiert wurde.

Temperatur	Zeit	
96 °C	2-3 min	} 25-35 Zyklen
96 °C	30 s	
48-60 °C	30 s	
68 °C	30 s – 4 min	
68 °C	7 min	

### PCR mit *Expand-Long-Range* DNA Polymerase (Roche)

Für die Amplifikation von großen DNA-Fragmenten ab 2 kb, insbesondere für Klonierungen, wurde das *Expand-Long-Range* Kit der Firma Roche verwendet. Hier wird eine Kombination aus zwei Polymerasen eingesetzt, zum einen eine *Taq*-Polymerase und zum anderen eine Polymerase mit Exonuklease-*proofreading*-Aktivität. Letztere minimiert Fehler bei der Amplifikation und sorgt auch bei langen Fragmenten für ein mutationsfreies Amplikon.

Temperatur	Zeit	
92 °C	2 min	} 10 Zyklen
92 °C	10 s	
48-60 °C	15 s	
68/72 °C	1 min/kb	
92 °C	10 s	} 15-25 Zyklen
48-60 °C	15 s	
68/72 °C	1 min/kb + 20s	
68/72 °C	7 min	

### Mutagenese an Vektoren

Im Rahmen dieser Arbeit wurden verschiedene Gene und die funktionellen Änderungen durch krankheitsursächliche Mutationen untersucht. Um gezielt Mutationen in ein Insert einzufügen, das bereits in einem Expressionsplasmid vorliegt, wurde das „QuikChange Site directed Mutagenesis Kit“ von Stratagene nach Herstellerprotokoll eingesetzt.

Temperatur	Zeit	
95 °C	1 min	} 20 Zyklen
95 °C	30 s	
55 °C	1 min	
68 °C	1 min/kb	

Im Anschluss an die Mutagenese-PCR wurde das PCR-Produkt mit 1µl des Restriktionsenzym *DpnI* versetzt und 1 Stunde bei 37 °C inkubiert. *DpnI* ist methylierungssensitiv und verdaut selektiv ausschließlich methylierte Template-DNA mit der wildtyp-Sequenz, so dass die Plasmide mit der gewünschten Mutation übrig bleiben. Anschließend wurden DH5α-Bakterien mit 1-10 µl des Mutagenese-Ansatzes transformiert (siehe 3.2.2.3). Die positiv transformierten Klone wurden mittels Mini-Präparation (siehe 3.2.4.1) und anschließender Sequenzierung (siehe 3.2.4.8) auf eine erfolgreiche Mutagenese untersucht.

### Reverse Transkriptase PCR

Da RNA im Vergleich zu DNA sehr schnell degradiert, wurde die aus kultivierten Zellen und Patientenblut extrahierte RNA für weitere Analysen mittels Reverser Transkriptase PCR (RT PCR) in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben. Die cDNA wurde mit dem SuperScript III RNase H Reverse Transcriptase Kit von Invitrogen synthetisiert. Dazu wurden 0,5 bis 5 µg RNA mit 500 ng Random Hexamer Primern und 0,5 mM dNTPs in einem Volumen von 10 µl gemischt und für fünf Minuten bei 65 °C inkubiert. Nach dem Abkühlen der Proben auf Eis wurde ein Mastermix aus 5XFirst Strand Puffer, 10 mM DTT und 2 Units RNaseOut zugegeben. Es erfolgte eine Inkubation für 10 min bei 25 °C zur Anlagerung der Primer, 50 min bei 50 °C in denen die cDNA synthetisiert wird und abschließend eine Hitzeinaktivierung für 5 min bei 85 °C. Um die RNA aus den Proben zu entfernen wurde 1µL RNaseH zugegeben und für 20 min bei 37 °C inkubiert. Die synthetisierte cDNA wurde für Genexpressionsanalysen mittels qPCR 1:1 mit Wasser verdünnt und für normale PCR-Analysen und Sequenzierungen unverdünnt eingesetzt. Eine Lagerung erfolgte bei -20 °C.

### Quantitative Real Time PCR

Die quantitative RealTime PCR (qPCR) ist eine Methode zur Quantifizierung von DNA und cDNA. Im Rahmen dieser Arbeit TaqMan-Assays zur Messung der Genexpression sowie zur Quantifizierung von CHIP-DNA eingesetzt. Durch den Einsatz von sequenzspezifischen Hydrolyse-Sonden ist diese Methode spezifischer als eine konservative qPCR. Die Hydrolytischen Sonden binden komplementär an die Ziel-DNA und tragen am 5'-Ende einen Reporterfluorochrom. Dieses wird durch einen Quencher am 3'-Ende der Sonde detektiert und so die Fluoreszenz des Reporterfluorochroms durch die sterische Nähe der Moleküle unterdrückt. Im Reaktionsgemisch liegt eine Taq-Polymerase mit 5'-3'Exonukleaseaktivität vor, die bei der Amplifikation der Ziel-DNA das Reporterfluorochrom von der Sonde abspaltet. Die Fluoreszenz wird nun nicht mehr durch den Quencher unterdrückt, so dass ein Anstieg der Fluoreszenz in der Probe detektiert werden kann. Für die Taqman-Assays wurden Primer-Sonden-Mischungen von LifeTechnologies zusammen mit dem qPCRBIO Probe Mix Hi-ROX der Firma PCR Biosystems verwendet.

Reagenzien	Volumen [µl]	
2x qPCRBIO Probe Mix Hi-ROX	10	
20x Taqman Gene Expression Assay (Sonde)	1	
cDNA	2	
oder CHIP-DNA	5-7	
oder Input-DNA	2	
H <sub>2</sub> O	ad 20 µl	
<b>Temperatur</b>	<b>Zeit</b>	
96 °C	2-3 min	
96 °C	5 s	} 40 Zyklen
60 °C	30 s	

Für Expressionsanalysen wurden Sonden für die „Housekeeping“-Gene MAPK1 oder GAPDH als interne Kontrolle sowie zur Normierung der Messwerte eingesetzt. Unbehandelte Proben bzw. Proben aus Zellen mit „wildtyp Gensequenzen“ galten als Kontrolle. Bei transient transfizierten Zellen wurden zusätzlich Sonden für Neomycin zur Bestimmung der Transfektionseffizienz gemessen. Die Auswertung der Messwerte erfolgte mit der Herstellersoftware (Applied Biosystems) sowie mit Microsoft Excel anhand folgender Formel:

$$\begin{aligned} C(t)_{\text{Housekeeper}} - C(t)_{\text{Zielgen}} &= dC(t) \\ dC(t)_{\text{Kontrolle}} - dC(t)_{\text{Probe}} &= ddC(t) \\ 2^{-ddC(t)} &= \text{relative Expression des Zielgens} \end{aligned}$$

Bei quantitativen CHIP-Analysen diente die Input DNA zur Normierung. Als Kontrolle galt entweder die unbehandelte Probe oder die mit dem wildtyp-Gen transfizierte Probe. Anhand folgender Formel wurde die relative Anreicherung des Zielpromotors in den CHIP-Proben berechnet:

$$C(t)_{\text{Input}} - C(t)_{\text{CHIP-DNA}} = dC(t)$$

$$dC(t)_{\text{Kontrolle}} - dC(t)_{\text{Probe}} = ddC(t)$$

$$2^{-ddC(t)} = \text{relative Anreicherung des Zielpromotors}$$

Alle Proben und Kontrollen wurden als Triplikate durchgeführt und gemessen.

### 3.2.4.5 Agarose-Gelelektrophorese

Um DNA-Fragmente aus PCR-Reaktionen oder ein Plasmid nach Restriktionsverdau anhand ihres Molekulargewichts aufzutrennen, wurde eine Agarose-Gelelektrophorese durchgeführt. Je nach Fragmentlänge wurden 1-2 %ige Agarosegele verwendet. Dafür wurden 1-2 % Agarose in 1x TBE Puffer unter aufkochen gelöst und mit 0,33 µl/ml des DNA-Interkalators Ethidiumbromid oder 0,06 µl/ml Midori Green Advanced DNA Farbstoff (Nippon Genetics) versetzt. Durch Anlegen eines elektrischen Feldes wandert die negativ geladene DNA zur positiv geladenen Anode. Je nach Fragmentgröße wurde diese Elektrophorese für 20 bis 90 Minuten bei einer Spannung von 120 mV durchgeführt. PCR-Produkte wurden mit DNA-Ladepuffer im Verhältnis 1:3 versetzt während Restriktionsansätze in einem Puffer vorlagen, der zusätzlich als Ladepuffer dient. Als Größenstandard wurde parallel zu den Proben die *Hyper ladder* von Bioline oder die *Low Mass Ladder* von Invitrogen auf das Gel aufgetragen. Die Dokumentation der Elektrophorese erfolgte entweder auf einem UV-Tisch mit der CCD Black and White Video Camera von SONY (Ethidiumbromid-Gele) oder mit dem FastGene FAS Digi Dokumentationssystem von Nippon Genetics (Midori Green Advanced).

<b>DNA-Ladepuffer</b>	0,1 % Bromphenolblau 0,1 % Xylen Cyanol 25 % Glycerin 10 mM EDTA
<b>TBE-Puffer (Laufpuffer)</b>	445 mM Tris-Base 445 mM Borsäure 10 mM EDTA

<b>Agarosegellösung</b>	1 – 2 % (w/v) Agarose
	1 x TBE-Puffer
	0,33 µg/ml Ethidiumbromid
	Oder 0,06 µl/ml Midori Green Advanced

### 3.2.4.6 Ligation

#### Ungerichtete TA-Klonierung

Vor der Insertion eines DNA-Fragments in ein Expressionsplasmid erfolgte nach der Amplifikation zunächst eine initiale Insertion in einen Shuttle-Vektor. Hierzu wurde der linearisierte pGEM®-T Easy der Firma Promega verwendet. Durch die Inkubation mit der Taq-Polymerase (siehe 3.2.4.3) wird das PCR-Amplikon mit einem Adenin-Überhang am 3'-Ende versehen, so dass es von der T4-Ligase in den Vektor inseriert werden kann. Man bezeichnet diese Ligation als ungerichtet, da beide Enden des PCR-Produktes einen solchen Adenin-Überhang aufweisen während in der *multiple cloning site* (MCS) des linearisierten Shuttlevektors ein Thymin Überhang vorliegt. Die Ligationsansätze wurde nach Herstellerangaben pipettiert, wobei mit einem Vektor zu *Insert* Verhältnis von 1:3 gearbeitet wurde. Die optimale Temperatur für eine T4-Ligase liegt bei 17 °C, so dass der Ligationsansatz für mindestens 1 Stunde bei 17 °C inkubiert wurde. 5 µl des Ligationsansatzes wurden für eine Transformation von DH5α eingesetzt (siehe 3.2.2.3).

#### Gerichtete Klonierung

Nachdem die Zielsequenzen im Shuttlevektor durch DNA-Sequenzierung als mutationsfrei klassifiziert werden konnten, erfolgte mittels Restriktionsverdau (Abschnitt 3.2.4.6) ein „Ausschneiden“ der Zielsequenz und eine anschließende Ligation mit entsprechend vorbereitetem Expressionsvektor. Hierfür wurde die T4-Ligase von Roche verwendet.

Durch die Verwendung von zwei verschiedenen Restriktionsenzymen entstehen an beiden Seiten des Inserts unterschiedliche *sticky ends*. Um kompatible Enden zu generieren, wurde der Zielvektor mit den gleichen Restriktionsenzymen geschnitten wie das *Insert*, so kann es ausschließlich eine gerichtete Insertion in den Vektor erfolgen. Nach Herstellerangaben wurden 10 µl Ligationsansätze pipettiert und mindestens 1h oder über Nacht bei 17 °C inkubiert. 5 µl des Ligationsansatzes wurden für eine Transformation von DH5α eingesetzt.

### **Gibson Assembly**

Bei Klonierungen mittels Gibson Assembly kann das zu klonierende Insert in einer isothermalen Reaktion direkt in den Expressionsvektor ligiert werden. Die zu verbindenden DNA-Fragmente müssen dafür an ihren Enden überlappende Sequenzen aufweisen, die durch entsprechende Primer während der Amplifikation an das *Insert* angefügt werden. Der verwendete Mastermix (Gibson Assembly® Master Mix, New England Biolabs) enthält eine Exonuklease, die einige Basen des DNA-Strangs vom 5'Ende verdaut, so dass *sticky ends* entstehen. Die homologen Einzelstränge können sich aneinander anlagern, während eine Polymerase fehlende Basen ergänzt. In einem dritten Schritt werden die DNA-Fragmente von einer Ligase verbunden. Nach Herstellerangaben wurde ein Reaktionsansatz mit einem Volumen von 20 µl angesetzt, Insert und Vektor wurden in einem Verhältnis von 1:5 eingesetzt. Die Reaktion erfolgte in einer Inkubation bei 50 °C für 60 Minuten. Von diesem Ansatz wurden 10µl in eine Transformation von DH5α eingesetzt.

#### **3.2.4.7 Restriktionsverdau**

Um Plasmide zu linearisieren, Inserts auszuschneiden und das Restriktionsprofil von Plasmiden zu überprüfen wurden sogenannte Restriktionsenzyme verwendet. Es handelt sich um bakterielle Endonukleasen, die spezifische, oft palindromische Nukleotidsequenzen erkennen und die Doppelstrang-DNA an definierten Stellen schneiden. Je nach Enzym können stumpfe Enden (*blunt ends*) oder Enden mit einem Überhang von Nukleotiden (*sticky ends*) entstehen. Für eine gerichtete Klonierung werden zwei verschiedene Restriktionsenzyme verwendet, die *sticky ends* erzeugen, um eine spezifische Anlagerung von DNA-Fragmenten zu ermöglichen. Im Rahmen dieser Arbeit wurden Restriktionsenzyme des Herstellers Fermentas verwendet und nach Herstellerprotokoll eingesetzt. Für Ligationen wurden Plasmide standardmäßig in einem 30 µl Ansatz mit universellem 10x Restriktionspuffer für 3h bei 37 °C verdaut und mittels Gelfiltration aufgereinigt (Abschnitt 3.2.4.1). Zur Überprüfung von Restriktionsprofilen wurde ein 15 µl Ansatz mit dem grünen 10x Restriktionspuffer angesetzt. Dieser enthält einen DNA-Ladepuffer, so dass die Restriktions-Ansätze direkt nach der Inkubation auf ein 1 %iges Agarosegel aufgetragen werden konnten.

#### **3.2.4.8 Sequenzierung nach Sanger**

Alle für diese Arbeit durchgeführten Sequenzierungen erfolgten nach der Kettenabbruchmethode nach Sanger [104]. Der PCR-Ansatz enthält zusätzlich zu normalen Nukleotiden (dNTPs) vier verschiedene Fluoreszenz-markierte Didesoxy-Nukleotide (ddNTPs). Wird bei der Amplifikation des zu Sequenzierenden DNA-Fragments ein solches Didesoxy-

Nukleotid eingebaut, bricht die Amplifikation an dieser Stelle ab (Kettenabbruch). Es entstehen unterschiedlich lange DNA-Fragmente, dessen letzte Base immer ein spezifisch Fluoreszenzmarkiertes Didesoxy-Nukleotid ist. In einem Kapillarsequenzierer werden diese Fragmente der Länge nach aufgetrennt, ein Laser regt das Fluorochrom an während ein Detektor das emittierte Licht aufnimmt. Diese Daten werden in ein Elektropherogramm des sequenzierten DNA-Fragments umgewandelt. Für die Amplifikation wurde BigDye® Terminator v.1.1 und 3.1 von Applied Biosystems verwendet.

Für alle Sequenzierungen halten die gleichen PCR-Bedingungen:

Temperatur	Zeit	
96 °C	1 min	
96 °C	10 s	} 25 Zyklen
48-55 °C	5 s	
60 °C	30 s – 3 min	

Nach der Amplifikation wurden die Sequenzierproben wie in Abschnitt 3.2.4.1 beschrieben aufgereinigt. 15 µl der aufgereinigten Probe wurden mit 5 µl Formamid (HiDi-Formamid) in einer 96-Wellplatte vermischt und im Kapillarsequenzierer 3130X/Genetic Analyser (Applied Biosystem) aufgetrennt und detektiert. Die erhaltenen Sequenzen wurden abschließend unter Verwendung der Programme SeqMan, Editseq (DNA Star) und Chromas (Technelysium Phy Ltd) abgeglichen und analysiert.

### **Sequenzierung von genomischer DNA oder cDNA**

Zur Identifizierung von Mutationen bei Patienten sowie zur Analyse von Mutationen auf RNA-Ebene wurde die Sequenzierung nach Sanger an genomischer DNA bzw. an cDNA durchgeführt. Um eine bestimmte Genregion zu sequenzieren war es notwendig die Zielsequenz mittels Standard-PCR (Abschnitt 3.2.4.3) anzureichern und das PCR-Produkt mittels Agarosegelelektrophorese auf Spezifität und Produktmenge zu überprüfen. Des Weiteren wurden durch den enzymatischen Verdau mit ExoSAP (GE Healthcare) die nicht verwendeten Primer und dNTPs aus dem PCR-Produkt entfernt. Diese Komponenten können die Sequenzierung stören und somit zu nicht auswertbaren Elektropherogrammen führen. Für den Verdau wurden 5 µl PCR-Produkt mit 2 µl ExoSAP gemischt und 20 Minuten bei 37 °C inkubiert, anschließend wurde das Enzym durch eine 15-minütige Inkubation bei 80 °C inaktiviert. Darauf erfolgte die eigentliche Sequenz-PCR wie im beschrieben nach folgendem Schema:

<b>Reagenzien</b>	<b>Volumen [µl]</b>
ExoSAP-Verdau	1
Sequenzierprimer	0,5
5x Sequenzierpuffer	1,5
BigDye® Terminator . 1.1/3.1	0,5
H <sub>2</sub> O	Ad 10 µl

### Sequenzierung von Plasmiden

Um *Inserts* während der Klonierung auf Mutationen oder neue Mutagenesen auf ihre Richtigkeit zu überprüfen wurden auch Plasmide sequenziert. Da diese durch die Vervielfältigung in den Bakterien im Extrakt bereits in hoher Zahl vorliegen, konnte auf eine gezielte Amplifikation der Zielsequenz verzichtet werden. Die Sequenz-PCR wurde direkt an der Plasmid-DNA nach folgendem Schema durchgeführt:

<b>Reagenzien</b>	<b>Volumen [µl]</b>
DNA aus Mini- oder Midi- Präparation	0,5-1 1-2
Sequenzierprimer	1
5x Sequenzierpuffer	2
BigDye® Terminator . 1.1/3.1	Ad 10 µl
H <sub>2</sub> O	

### 3.2.4.9 Extraktion und Fragmentierung von Chromatin aus humanen Zellen

Für die Chromatin-Immunpräzipitation (Abschnitt 3.2.4.10) musste das zu untersuchende Chromatin zuerst quervernetzt („*crosslink*“) und dann aus den humanen Zellen extrahiert werden. Die Zellen wurden in 15 cm Zellkulturschalen ausgesät und bei Bedarf nach 24 Stunden mit THAP1 3x Konstrukten bzw. einem leeren FLAG-Expressionsplasmid als Negativkontrolle wie beschrieben transfiziert (Abschnitt 3.2.1.5). Am zweiten Tag nach Aussaat wurde das Medium mit 2 ml einer Formaldehyd-haltigen *Crosslinking*-Lösung versetzt. Formaldehyd vernetzt die Proteine der Zelle reversibel miteinander und mit der DNA

<b><i>Crosslinking</i>-Lösung</b>	11 % Formaldehyde
	0,1 M NaCl
	2,7 mM KCl
	1 mM EDTA
	0,5 mM EGTA
	50 mM HEPES, pH 8,0

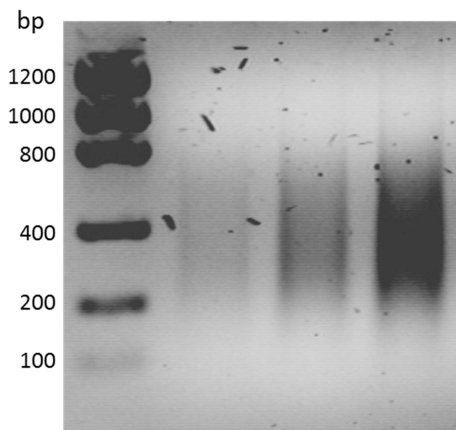
Die *Crosslinking*-Reaktion wurde mit 2,5 M Glycin gestoppt (Endkonzentration 125 mM) und die Zellen wurden mittels Zellschaber abgelöst und als Suspension in ein 50 ml Reaktionsröhrchen überführt. Ab hier erfolgten alle Arbeitsschritte auf Eis, um eine Degradation des Chromatins zu verhindern. Die Zellen wurden bei 2000xg und 4 °C für 10 Minuten pelletiert. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit eiskaltem PBS gewaschen und bis zum weiteren Vorgehen bei -80 °C gelagert.

Der nächste Schritt war die Extraktion und Fragmentierung des Chromatins. Die Extraktion erfolgte mittels eines 3-stufigen Lysepuffersystems, bei dem zuerst die Zellkerne und anschließend das Chromatin extrahiert wurden. Das Zellpellet wurde zuerst in 15 ml Lysepuffer 1 mit frisch zugesetztem PIC (1:250) resuspendiert und für 10 Minuten bei 4 °C auf einem Überkopfschüttler inkubiert. In einem Zentrifugationsschritt wurden die nun freigesetzten Zellkerne für 10 Minuten bei 4 °C und 3500xg pelletiert. Dieser Vorgang wurde mit 10 ml Lysepuffer 2 plus PIC (1:1250) bei Raumtemperatur wiederholt, um die Zellkerne aufzuschließen. Das Sediment wurde schließlich je nach Größe in 150-300 µl Lysepuffer 3 aufgenommen und in ein Ultraschall-Reaktionsgefäß der Firma Diagenode überführt.

<b>Lysepuffer 1</b>	0,05 M HEPES, pH 7,5 0,14 M NaCl 1 µM EDTA 10 % Glycerin 0,5 % NP-40 0,25 % TritonX-100
<b>Lysepuffer 2</b>	2 0,2 M NaCl 1 µM EDTA 0,5 µM EGTA 10 µM Tris, pH 8,0
<b>Lysepuffer 3</b>	1 µM EDTA 0,5 µM EGTA 10 µM Tris, pH 8,0 0,5 % SDS

Um das Chromatin auf eine Größe von etwa 100-800 bp zu fragmentieren erfolgte eine Ultraschallbehandlung im Bioruptor pico (Diganode). Die Proben wurden 10x für eine Dauer von 30s on/off bei 4 °C sonifiziert. Um die Zellfragmente zu pelletieren wurden die Proben im Anschluss bei 10.000xg und 4 °C für 10 Minuten zentrifugiert. Der Überstand mit dem fragmentierten Chromatin wurde in frische Reaktionsgefäße überführt, zusätzlich wurden 20-35 µl für die Input-Kontrolle abgenommen. Das Chromatin wurde bei -80 °C gelagert.

Um die Fragmentgröße und die DNA-Konzentration zu überprüfen wurde die DNA aus der Input-Probe extrahiert (Abschnitt 3.2.4.1) und je 2  $\mu$ l, 4  $\mu$ l und 6  $\mu$ l davon in einem 1 %igen Agarosegel mittels Elektrophorese aufgetrennt.



**Abbildung 3.2.2: Fragmentiertes Chromatin** Das sonifizierte Chromatin der Input-Kontrolle wurde nach der DNA-Präparation in drei verschiedenen Konzentrationen in einem 1 %igen Agarosegel aufgetrennt. Hier wird exemplarisch die Elektrophorese einer Probe gezeigt. Die Sonifizierung hat das Chromatin in 200-800 Basenpaare (bp) lange Fragmente gebrochen. Der Großteil der Fragmente ist zwischen 250 und 600 bp lang.

#### 3.2.4.10 Chromatin-Immünpräzipitation (ChIP)

Die Chromatin-Immünpräzipitation ist eine Methode zum spezifischen Nachweis von Protein-DNA-Interaktionen [105]. In dieser Arbeit wurde hiermit die DNA-Interaktion der Transkriptionsfaktoren THAP1, HCFC1 und HDAC3 an spezifischen Promotorregionen sowie die Acetylierung dieser Promotorregionen untersucht. Hierfür werden Proteine und DNA mittels einer Formaldehyd-haltigen Lösung quervernetzt und nach der Extraktion und der Ultraschallfragmentierung mit einem spezifischen Antikörper präzipitiert. Es wurden sowohl Antikörper gegen transient exprimierte FLAG-markierte Proteine verwendet als auch Antikörper gegen native Proteine. Als Negativkontrolle wurde entweder ein anti-IgG Antikörper eingesetzt oder eine mit einem Leer-Vektor (3xFLAG-Expressionsvektor) transfizierte Probe.

##### **ChIP modifiziert nach Myers (Myers Lab ChIP-Seq-Protocol, 2010)**

Für die ChIP mit Antikörpern gegen natives THAP1, THAP1 3xFLAG Konstrukte sowie gegen acetyliertes Histon 3 (acH3) wurde ein modifiziertes Protokoll nach Myers und Paul verwendet (*ENCODE ChIP-Seq experiments, 2010*). Hierfür wurde zuerst wie in 3.2.4.8 beschrieben fragmentiertes Chromatin hergestellt. Am ersten Tag wurden 100 $\mu$ l *Affi-Prep<sup>®</sup> ProteinA Resin* Beads (Biorad) je Probe zur Aktivierung dreimal mit TBST und zweimal mit PBS/BSA (5mg/ml) gewaschen. Über Nacht wurden die Beads in 500 $\mu$ l PBS/BSA mit 5 $\mu$ l Antikörper (anti-THAP1, anti-FLAG, anti-AcH3) bzw. 1 $\mu$ l anti-IgG als Negativkontrolle bei 4 °C auf dem Überkopfschüttler inkubiert, um die Antikörper an den Beads zu immobilisieren. Am nächsten

Tag wurden die Beads-Antikörper-Komplexe dreimal mit PBS/BSA gewaschen, um ungebundene Antikörper zu entfernen. Zu diesem Beads-Antikörper-Komplex wurde nun nach folgendem Ansatz ein Bindepuffer-Chromatin-Gemisch zugegeben und über Nacht auf dem Überkopfschüttler bei 4 °C inkubiert:

<b>CHIP Ansatz</b>	100 µl <i>Affi-Prep® ProteinA Resin</i>
	100 µl Chromatin
	70 µl 10X RIPA
	420 µl PBS/BSA (5mg/ml)
	10µl Lachs-Sperma DNA
	3 µl PIC
<b>10X RIPA</b>	
	10x PBS
	10 % NP-40
	5 % sodium deoxycholate
	1 % SDS

Am nächsten Tag wurden das an die Beads gebundene Chromatin sechsmal mit dem LiCl-Waschpuffer gewaschen, dafür wurde 1 ml Waschpuffer zugegeben, für 3 Minuten bei 4 °C auf dem Überkopfschüttler inkubiert und die Beads durch Zentrifugation bei 2000xg und 4 °C für 1 Minute pelletiert. Abschließend erfolgte noch ein Waschschrift mit TE-Puffer. Um das Chromatin von den Beads zu eluieren wurden die Chromatin-Beads-Komplexe mit 200 µl Elutionspuffer versetzt und für 1 h bei 1000 rpm bei 65 °C inkubiert. Nach einer Zentrifugation für 3 Minuten bei 10 000xg wurde der Überstand mit dem Chromatin in ein neues 1,5 ml Reaktionsröhrchen überführt und nun über Nacht bei 65 °C inkubiert, um die Quervernetzungen zu lösen („*reverse Chrosslink*“). Nach 24h wurden 600 µl 100 % Ethanol (EtOH) zugegeben und die Proben für einige Sekunden gevortext um die DNA auszufällen. Um die Ausbeute zu erhöhen wurden die Proben über Nacht bei -20 °C inkubiert. Am letzten Tag wurde die ausgefällte DNA in einem 30-minütigen Zentrifugationsschritt bei 16.000xg und 4 °C pelletiert und noch einmal 5 min bei 16.000xg mit 70 % EtOH gewaschen und dann in der SpeedVac getrocknet. Die getrocknete DNA wurde in einer 120 µl Proteinase K –Lösung resuspendiert und für 4 Stunden bei 37 °C inkubiert. Zum Schluss wurde die ChIP-DNA mit dem QIAquick Gel Extraktion Kit von Qiagen nach Herstellerprotoll aufgereinigt und in 50 µl DNase-freiem Wasser zweimal eluiert.

<b>LiCl Waschpuffer</b>	100mM Tris pH 7,5 500 mM LiCl 1 % (v/v) NP-40 1 % (w/v) sodium deoxycholate
<b>Elutionspuffer</b>	1 % (v/v) SDS 0,1 M NaHCO <sub>3</sub>
<b>Proteinase K Lösung</b>	195 µl DNase-freies Wasser 25 µl Proteinase K 25 µl 10X TE 5 µl Glycogen

### 1-Day-Chip (Diagenode)

Um die DNA-Interaktionen des Transkriptionskomplexes von THAP1 und HCFC1 zu untersuchen wurde das 1-Day-ChIP Kit von der Firma Diagenode verwendet. Das Chromatin hierfür wurde hergestellt wie beschrieben (3.2.4.8). Pro CHIP wurden 80 µl Chromatin mit 200 µl Diagenode ChIP-Buffer verdünnt, es wurden 20 µl HCFC1-Antikörper (Bethyl), 5 µl anti FLAG M2 (Sigma) oder 2 µl anti-IgG (Diagenode) eingesetzt. Die Durchführung erfolgte nach Herstellerprotokoll. Nach Durchführung der Immunpräzipitation wurde die DNA zweimal in je 70 µl DNase-freiem Wasser eluiert.

Die CHIP-DNAs wurde sowohl in normalen PCR-Analysen als auch in quantitativen Real Time PCRs mit spezifischen Primern und Sonden gegen die Zielpromotoren untersucht. Für einen Reaktionsansatz wurden 5 µl (Myers Lab) bzw. 7 µl (Diagenode) der präzipitierten DNA bzw. 1-2 µl Input-DNA als Kontrolle eingesetzt.

## 3.2.5 Proteinbiochemie

### 3.2.5.1 Herstellung von Zelllysaten aus humanen Zellen

Zur Gewinnung von Zelllysaten für Proteinanalysen wurden humane Zellen chemisch mit dem Radioimmunpräzipitationsassay-Puffer (RIPA) chemisch aufgeschlossen. RIPA Puffer enthält Detergenzien um die Zellmembran aufzuschließen, Lithiumchlorid um die Ionenstärke aufrecht zu erhalten und EDTA als Komplexbildner für Protease aktivierende, zweiwertige Kationen. Zusätzlich wird dem RIPA-Puffer frischer Proteaseinhibitorcocktail (PIC, Mini Protease Inhibitor Cocktail, Roche) im Verhältnis 1:250 zugesetzt. Es wurden sowohl frisch geerntete Zellen als auch gefrorene Zellpellets aufgeschlossen. Je nach Größe des Zellsediments wurde dieses in 50-500 µl RIPA-PIC-Puffer resuspendiert und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Um das proteinhaltige Lysat von den Zelltrümmern zu trennen wurde dieses für 5 min bei 10.000 –

13.000xg und 4 °C zentrifugiert. Das Lysat wurde bei -80 °C gelagert und für Westernblot-Analysen und Immunpräzipitationen verwendet.

<b>RIPA-Puffer</b>	50 mM HEPES, pH 7,6 1 mM EDTA 1 % (v/v) NP-40 0,5 M Lithiumchlorid pH mit NaOH auf 7,6 einstellen
frisch zur Arbeitslösung zufügen	250:1 Proteinase Inhibitor

### 3.2.5.2 Proteinkonzentrationsbestimmung mittels Bichinoninsäure Assay

Beim Bicinchoninsäure-(BCA)-Assay handelt es sich um ein biochemisches Verfahren zur Bestimmung der Proteinkonzentration einer Lösung. Es beruht auf einer temperaturabhängigen, durch Aminosäurereste und Peptidbindungen vermittelten Reduktion von  $\text{Cu}^{2+}$  zu  $\text{Cu}^+$ . Mit den reduzierten Kupferionen bildet die Bicinchoninsäure Chelatkomplexe, die eine violette Färbung der Lösung bewirken. Die Umsetzung vom bläulichen  $\text{Cu}^{2+}$  zu den violetten Chelatkomplexen ist abhängig von der vorhandenen Proteinmenge.

#### **Pierce® BCA Protein Assay Reagent A**

Bicinchoninsäure

jeweils Thermo Scientific, USA

#### **Pierce® BCA Protein Assay Reagent B**

Kupfersulfat

Mit einer Verdünnungsreihe von Proben mit bekannter Proteinkonzentration wird eine Standardkurve erstellt. Die Proteinreihe wurde mit BSA hergestellt. Alle Proben wurden bei einer Absorption von 562 nm in einem Plattenreader (LB 942 TriStar<sup>2</sup>, Berthold Technologies) gemessen, anhand des Standards wurde die Proteinkonzentration der unbekanntenen Proben berechnet.

Die Stammlösung des Standards wurde mit 5 mg/μl angesetzt. Für die Standardkurve wurde die Stammlösung mit Lysepuffer auf folgende Konzentrationen verdünnt:

2000 μg/μl, 1500 μg/μl, 1000 μg/μl, 750μg/μl, 500 μg/μl, 250 μg/μl, 125 μg/μl und 62,5 μg/μl

Als Leerwert wurden 25 μl Lysepuffer eingesetzt.

Die Proteinproben wurden je nach Extraktionszeitpunkt und Zelldichte vor Extraktion in Lysepuffer in einem Verhältnis 1:3 bis 1:10 verdünnt. Die Standardproben wurden ebenfalls in Lysepuffer angesetzt und zusammen mit den Proteinproben unbekannter Konzentration in Duplikaten mit 25 μl pro well in eine 96 well-Platte pipettiert. Kupfersulfat (ReagentB) und

Bicinchoninsäure (ReagentA) wurden nach Herstellerangaben verdünnt und eingesetzt. Nach 30 min Inkubation bei 37 °C wurde die Absorption bei einer Wellenlänge von 526 nm in einem Plattenreader gemessen.

### 3.2.5.3 *In vitro* Translation und Transkription

Mittels *in vitro* Translation und Transkription (IVTT) können größere Mengen Protein in einem zellfreien Hintergrund synthetisiert werden. Diese Proteine wurden unter anderem in GST-Pulldown-Analysen (Abschnitt 3.2.5.7) und Westernblot-Analysen (Abschnitt 3.2.5.5) eingesetzt. Die Proteinsynthese erfolgte mit dem TNT® *Quick coupled Transcription/Translation System* von Promega nach Herstellerangaben. Es wurde je nach Verwendung das im Kit enthaltene nicht-radioaktive Methionin oder das radioaktiv markierte Methionin ([S35] L-Methionine 18,5Mbq (500µCi) in 50 µl, Hartmann Analytic) eingesetzt. Als Matrize zur *in vitro* Synthese ausgewählter Proteine bzw. von Proteinfragmenten dienten pcDNA 3.1 Expressionsplasmid, in denen die entsprechenden codierenden Sequenzen inseriert wurden.

### 3.2.5.4 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die SDS-PAGE ist eine Methode um Proteine anhand ihres Molekulargewichtes in einem Polyacrylamidgel aufzutrennen. In dieser Arbeit wurde die diskontinuierliche Methode nach Laemmli durchgeführt. Je nach Molekulargewicht des Zielproteins wurden 4 %ige Sammelgele und 8-12 %ige Trenngele verwendet (Zusammensetzung siehe unten). Die Zelllysate wurden mit einer entsprechenden Menge an SDS-Probenpuffer versetzt und für 5 Minuten bei 95 °C denaturiert, die dem Puffer zugesetzten Reagenzien DTT und β-Mercaptoethanol spalten zusätzlich die Disulfidbrücken der Proteine. Ein definiertes Volumen der Proteinproben wurde auf das Polyacrylamidgel aufgetragen und bei 80 V im Sammelgel mit neutralem pH aufkonzentriert. Nach etwa 10 Minuten wurde die Spannung auf ca. 120 V erhöht und die Proteine werden anhand des Molekulargewichts im basischen Trenngel aufgetrennt.

<b>4x SDS-Probenpuffer nach Laemmli</b>	62 mM Tris-Base, pH 6,8 2 % (w/v) SDS 10 % (v/v) Glycerin 5 % (w/v) DTT 5 % (v/v) β-Mercaptoethanol 0,025 % (w/v) Bromphenolblau
<b>10x SDS-Laufpuffer</b>	2 M Glycin 1,34 M Tris-Base 1 % (w/v) SDS

**4x SDS Trenngelpuffer**      1,5 M Tris-Base, pH 8,8  
0,4 % (w/v) SDS

**4x SDS-Sammelgelpuffer**      0,5M Tris-Base, pH 6,8  
0,4 % (w/v) SDS

Das SDS-Gel wurde nach der Elektrophorese entweder mit kolloidalem Coomassie gefärbt oder für Westernblotanalysen weiterverwendet. Die Gele für den GST-Pulldown wurden immer mit einer 45 %igen Coomassie-Färbelösung gefärbt.

<b>Trenngel</b>	<b>8 %</b>	<b>10 %</b>	<b>12 %</b>	<b>Sammelgel</b>	<b>4 %</b>
Trenngel-Puffer	2,5 ml	2,5 ml	2,5 ml	Sammelgel-Puffer	1,25 ml
Acrylamid 30 %	1,8 ml	3,33 ml	4,2 ml	Acrylamid 30 %	0,65 ml
H <sub>2</sub> O	4,6 ml	4,0 ml	3,2 ml	H <sub>2</sub> O	3,1 ml
10 % APS	150 µl	150 µl	150 µl	10 % APS	75 µl
TEMED	15 µl	15 µl	15 µl	TEMED	7,5 µl

Coomassie-Färbelösung      10 % (v/v) Essigsäure  
0,75 mM Coomassie R250

Coomassie-Entfärbelösung      30 % (v/v) Methanol

Coomassie-Färbelösung, kolloidal      10 % (v/v) Ethanol  
2 % (v/v) Ortho-Phosphorsäure  
5 % (w/v) Aluminiumsulfat-(14-18)-Hydrat  
0,02 % (w/v) Coomassie G250

Coomassie, kolloidal-Entfärbelösung      10 % (v/v) Ethanol  
45 % (v/v) Ethanol      2 % (v/v) Ortho-Phosphorsäure

### 3.2.5.5 Westernblot im Semi-Dry Verfahren

Die zuvor mittels SDS-Page (Abschnitt 3.2.5.4) aufgetrennten Proteine wurden zur Detektion mit verschiedenen Antikörpern durch Anlegen eines elektromagnetischen Feldes auf eine PVDF-Membran (Roche) übertragen. Die PVDF-Membran wurde zunächst in 100 %igem EtOH aktiviert und anschließend zusammen mit dem SDS-Gel in Transferpuffer äquilibriert. Das Whatmanpapier wurde zusätzlich in Transferpuffer getränkt. Das Blotting der Proteine erfolgte mittels Semi-Dry Transfer Cell (BioRad), hierfür wurden die Komponenten wie folgt angeordnet:

(-) Anode  
3 Lagen Whatmanpapier  
SDS-PAGE Gel  
PVDF-Membran  
2 Lagen Whatmanpapier  
(+) Kathode

Je nach Proteingröße erfolgte der Proteintransfer bei 1-1,3 A (25V) für 15-35 min. Größere Proteine (z.B. HACE1, ~100 kDa) erforderten eine höhere Stromstärke sowie eine längere Laufzeit. Um Methanol-Reste und den Transferpuffer zu entfernen wurde die Membran für 10 Minuten auf dem Schüttler mit PBS gewaschen und anschließend in einer 4 %igen Magermilch-PBS-Lösung (w/v) für 1-2 h bei Raumtemperatur inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen auf der Membran zu blockieren. Anschließend wurde der Primärantikörper, entweder in 4 %iger Magermilchlösung oder TBST mit 5 % BSA verdünnt, auf die Membran gegeben und über Nacht auf dem Schüttler bei 4 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Membran dreimal für 10 Minuten in TBST gewaschen und anschließend für 1-2 h mit dem spezifischen Sekundärantikörper, 1:20 000 verdünnt in 4 %iger Magermilchlösung, inkubiert. Nach erneutem Waschen mit TBST erfolgte die Detektion der Zielproteine über die Meerrettichperoxidase, welche an den Sekundärantikörper konjugiert ist. Das *Enhanced Chemiluminescence* (ECL)-Kit (SuperSignal West Femto Chemiluminescent Substrate, Thermo Scientific) wurde nach Herstellerangaben verwendet. Die Lumineszenz wurde mit dem Chemilumineszenzsimager MF ChemiBIS 2.0 (DNR Bioimaging Systems) detektiert und dokumentiert.

<b>Transferpuffer Semi-Dry Verfahren</b>	48 mM Tris-Base
	39 mM Glycin
	0,05 % (w/v) SDS
	20 % Methanol

### 3.2.5.6 Immunfluoreszenzfärbung

Eine Immunfluoreszenzfärbung ermöglicht die Untersuchung der Lokalisation von endogenen oder ektopisch exprimierten Proteinen oder auch die Betrachtung von Protein-Protein-Interaktionen innerhalb der Zellen. Ein proteinspezifischer Primärantikörper bindet an ein Epitop der Zielstruktur. Durch Zugabe eines Sekundärantikörpers, an den ein Fluorochrom gekoppelt ist und der spezifisch an die schwer Seitenkette des Primärantikörpers bindet, kann der Protein-Antikörper-Komplex nachgewiesen werden. Hierzu wird das Signal des Fluorochroms über ein Fluoreszenz Mikroskop angeregt.

Die Zellen wurden in 24 well-Platten auf Deckgläschen kultiviert und bei Bedarf innerhalb der exponentiellen Wachstumsphase mit entsprechenden Expressionsplasmiden transfiziert (siehe Abschnitt 3.2.1.5) und weitere 24-48 h kultiviert. Nach Fixierung der Zellen in 100 % Methanol wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und dann in einem Permeabilisierungspuffer für die Antikörper zugänglich gemacht. Um unspezifische Bindungsstellen abzusättigen erfolgte eine 30-minütige Inkubation im Equilibrationspuffer. Dann wurden die Deckgläschen mit 500 µl des entsprechenden Primärantikörpers in Equilibrationspuffer überschichtet und für 1 h bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4 °C in einer feuchten Kammer inkubiert. Um Reste des Primärantikörpers zu entfernen, wurden die Deckgläser anschließend 3x mit 1 ml Waschpuffer über 10 min auf dem Schüttler gewaschen. Die Inkubation mit dem Sekundärantikörper erfolgte in einer feuchten, lichtgeschützten Kammer für eine Stunde bei Raumtemperatur. Das DAPI wurde direkt in die Sekundärantikörper-Verdünnung gegeben. Abschließend wurden die Deckgläser in der 24 Well-Platte noch viermal über 10 min mit Waschpuffer gewaschen und schließlich mit etwa 20 µl Mowiol/Dabco auf Objektträgern eingedeckt. Um unspezifische Bindungen und Hintergrundfärbung des Sekundärantikörpers beurteilen und ausschließen zu können, wurde ein Deckglas nicht mit Erstantikörper inkubiert, sondern in der Blocklösung belassen.

Für die Immunfluoreszenzfärbung wurden folgende Reagenzien benutzt:

<b>Permeabilisierung</b>	0,3 % Triston-X-100 in PBS	
<b>Equilibrationspuffer</b>	10 mM TRIS (1M Stock, pH 7,5) 100 mM NaCl 10 % FCS 1 % BSA	
<b>Waschpuffer</b>	1 % BSA 0,5 % Tween®20 in PBS	
<b>Erstantikörper</b>	M2 anti-FLAG (mouse)	1:500 in Equilibrationspuffer
<b>Sekundärantikörper</b>	Goat IgG anti- mouse ALEXA 594	1:1000 in Equilibrationspuffer

<b>DNA-Farbstoff</b>	4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI)	1:5000 in Equilibrierungspuffer
<b>Eindeckmedium</b>	Mowiol/Dabco	

### 3.2.5.7 GST-Pulldown-Analysen

Der GST-Pulldown (Glutathion-S-Transferase-Pulldown) ist eine *in vitro* Methode zum Nachweis von Protein-Protein-Interaktionen. Für den Nachweis der Interaktion wurde zunächst ein rekombinantes GST-Fusionsprotein (Siehe Absatz 3.2.2.4) an Glutathion-Sepharose (GE Healthcare) immobilisiert. Hierfür wurden je nach Protein-Konzentration pro Probe 0.5-1 ml GST-Fusionsprotein-Suspension oder GST-Protein-suspension über Nacht mit 100 µl Glutathion-Sepharose bei 4 °C auf dem Überkopfschüttler inkubiert. Die Sepharose wurde zuvor zweimal mit PBS-KM gewaschen. Um die Proteine zu stabilisieren und um unspezifische Bindungen abzusättigen wurden dem Ansatz PIC (Proteinase Inhibitor Cocktail, Roche) und 2 mg/ml BSA zugefügt. Nach dieser Inkubation wurden die Protein-Sepharose Komplexe dreimal mit PSB-KM gewaschen und schließlich in 0,5 ml PBS-KM pro Probe resuspendiert. Die Menge des gebundenen Proteins im Westernblot überprüft. Pro Zielprotein 500 µl der Sepharosesuspension in ein sauberes 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt, bei 3200 rpm und 4 °C für 5 min zentrifugiert und anschließend in 200 µl NETN-Puffer resuspendiert. Zu diesem Ansatz wurden dann 5µl einer *in vitro* Transkription-Translation (IVTT, siehe Abschnitt 3.2.5.3) des potentiellen Interaktionspartners zugegeben und erneut über Nacht bei 4 °C inkubiert. Je nach Experiment wurde entweder [35S]-markiertes Protein oder ein Fusionsprotein mit 3xFLAG-Tag verwendet.

Am nächsten Tag wurden die Proben sechsmal mit 500 µl stringentem Waschpuffer gewaschen. Für den letzten Waschschrift wurden die Proben in ein 1,5 ml Safe-Lock-Reaktionsgefäß überführt und anschließend in 30 µl SDS-Probenpuffer für 5 min bei 95 °C eluiert und denaturiert. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt wurden 15 µl des Eluats auf in einem 10 %iges SDS-PAGE-Gel aufgetragen aufgetrennt (siehe Abschnitt 3.2.5.4).

Bei Experimenten mit [35S]-markiertes Proteinen wurde das Gel zunächst mit Coomassie gefärbt, dokumentiert und schließlich auf einem Vakuumtrockner bei 80 °C getrocknet. Die Detektion der Proteine erfolgte nach Exposition gegen eine Imaging Platte (BNAS-MP-2040S, 20x40 cm, Fuji Photofilm CO., Ltd) für 16h und anschließender Aufnahme mit dem Phosphorimager CR35B (Dürr Medical).

Wurden nicht-radioaktive, 3x-FLAG markierte Proteine eingesetzt, erfolgte die Detektion mittels Westernblot (siehe Abschnitt 3.2.5.5) mit einem M2 anti-FLAG Antikörper (Sigma).

<b>PBS-KM 1 x PBS</b>	1 x PBS 1mM MgCl <sub>2</sub> 3mM KCl
<b>NETN-Puffer</b>	25mM Tris-HCl, pH 7,5 100mM NaCl 0,2mM EDTA 0,2 % NP-40 zur Arbeitslösung hinzugeben: 1:1000 DTT (1M Stock) 1:250 Protease-Inhibitor-Cocktail (PIC) 1 mg BSA in PBS
<b>Stringenter Waschpuffer</b>	25mM Tris-HCl, pH 7,5 250mM NaCl 0,2mM EDTA 1mM CaCl <sub>2</sub> 0,5 % NP-40 zur Arbeitslösung hinzugeben: 1:1000 DTT (1M Stock) 1:250 Protease-Inhibitor-Cocktail (PIC)

### 3.2.5.8 *Active RAC1-Pulldown*

Um die Menge an aktivem, GTP-gebundenem RAC1 in Patientenfibroblasten zu messen wurde das kommerzielle *Active Rac1 Pull-Down and Detection Kit* von ThermoFischer nach Herstellerprotokoll verwendet. Das Kit basiert auf einer spezifischen Bindung von GTP-gebundenem RAC1 durch ein Fusions-Protein aus GST und der *p21-binding domain* (PBD) der humanen *P21 activated protein kinase 1* (PAK1) und einer anschließenden Detektion von RAC1 mittels eines anti-RAC1 Antikörpers im Westernblot. Für das Experiment wurden humane Fibroblasten mit einer Zahl von  $2 \times 10^6$  Zellen in 10 cm Petrischalen ausgesät und 24 h unter physiologischen Bedingungen kultiviert. Vor der Ernte wurden die Zellen über Nacht in serum-freiem Medium inkubiert. Es wurde einmal mit eiskaltem TBS gewaschen um tote Zellen und Mediumreste zu entfernen. Der Lysepuffer wurde direkt auf den Zellrasen gegeben, anschließend wurden die Zellen mit einem Zellschaber abgelöst und in ein gekühlte 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt, kurz gevortext und 5 min auf Eis inkubiert. Nach der Inkubation wurde das Lysat 15 min bei 4 °C und 16.000xg zentrifugiert um Zelltrümmer zu entfernen.

20 µl des Überstandes wurden als „Input“-Probe abgenommen, der restliche Überstand wurde zusammen mit PBD-GST und gewaschenen Glutathion-Beads in ein neues Reaktionsgefäß überführt und anschließend für 1 h bei 4 °C auf einem Schüttler inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Glutathion-Beads mit Lysepuffer gewaschen (400µl Lysepuffer, Zentrifugation bei 6000xg für 20 sec) und die Proteine für eine Analyse mittels SDS-Page und Westernblot schließlich in 50 µl SDS-Probenpuffer versetzt mit beta-Mercaptoethanol für 5 min bei 95 °C

eluiert und denaturiert. Die Detektion des Input (totales RAC1) und des aktiven RAC1 erfolgte mit einem dem Kit beiliegenden anti-RAC1 Antikörper.

### 3.2.5.9 Messung von oxidativem Stress mittels CellROX Färbung

Zur Detektion von oxidativem Stress in Form von reaktiven Sauerstoffmolekülen (*reactive oxygen species*, ROS) wurde der Farbstoff CellROX® Deep Red von Thermo Fisher Scientific nach Herstellerangaben verwendet. Das Protokoll sieht sowohl eine optische Auswertung unter dem Mikroskop als auch eine quantitative Auswertung mittels Durchflusszytometrie vor.

Für die Experimente wurden die Zellen in definierter Zellzahl ( $2 \times 10^4$ /well in einer 24-well-Platte zum Mikroskopieren oder  $2 \times 10^6$  in 10 cm Petrischalen für Durchflusszytometrie) ausgesät und für 24 h kultiviert um ein Anheften an die Oberfläche der Petrischale zu ermöglichen.

Eine Stunde vor Beginn der Färbung wurde eine Schale der wildtyp Fibroblasten als Positivkontrolle mit 300 nM Tert-butyl-Hydroperoxid (TBH) behandelt. Dann erfolgte die Färbung mit 250  $\mu$ M *CellROX Deep Red Staining* (Verdünnung je 1  $\mu$ l CellROX auf 9  $\mu$ l DMSO) für 45 Minuten im Brutschrank bei 37 °C. Für die Auswertung unter dem Mikroskop wurden die Zellen direkt mit 4 % Formaldehyd fixiert und mit einem Eindeckmedium eingedeckt. Die Auswertung am Mikroskop erfolgte unmittelbar danach, da das Färbereagenz sonst verblasst (Anregungswellenlänge 644nm / Emissionswellenlänge 665 nm).

Für die Durchflusszytometrische Untersuchung wurden die Fibroblasten nach der Färbung einmal mit PBS gewaschen, dann mit 500  $\mu$ l Trypsin/EDTA überschichtet und somit von der Petrischale abgelöst. Die Reaktion wurde mit 1000  $\mu$ l DMEM abgestoppt und die Zellsuspension in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Dann wurden die Zellen zweimal mit 500  $\mu$ l PBS gewaschen und schließlich in 500  $\mu$ l PBS resuspendiert. Für eine genaue Messung wurde darauf geachtet, die Zellen sorgfältig zu vereinzeln. Die Messung erfolgte direkt am BD LSRII Durchflusszytometer (BD Bioscience) mit den angegebenen Filtern. Als Negativkontrolle wurden ungefärbte Fibroblasten jeder Zelllinie verwendet.

*Forward-Scatter:* (FSC) Anregung mit 488 nm Laser, Absorption ohne Filter

*Sideward-Scatter:* (SSC) Anregung mit 488 nm Laser, Absorption mit 488/10 nm Breitbandfilter

Detektion des CellROX-Signals: APC Anregung mit 488 nm Laser, Absorption mit 660/20 nm Breitbandfilter

Detektion der Autofluoreszenz: FITC Anregung mit 488 nm Laser, Absorption mit 530/30 nm Breitbandfilter

### 3.2.6 Statistische Auswertung

Alle Experimente mit quantitativen Auswertungen wurden mindestens dreimal in unabhängigen Versuchsansätzen wiederholt und zur Ermittlung der Signifikanz statistisch ausgewertet. Da alle Experimente mehr als zwei Versuchsgruppen beinhalteten, wurde zur Auswertung nicht der *students t-test*, sondern die ein- bzw. zweifaktorielle Varianzanalyse (*one-* bzw. *two-way ANOVA*) durchgeführt. Die *one-way ANOVA* wurde angewendet, wenn eine Bedingung zu verschiedenen Zeitpunkten oder verschiedene Bedingungen zu einem Zeitpunkt miteinander verglichen werden sollten. Bei Studien mit mehreren Bedingungen, die zu verschiedenen Zeitpunkten verglichen wurden, wurden die Daten mittels *two-way ANOVA* analysiert. Die Varianzanalyse untersucht ob die Zeit oder die verschiedenen Versuchsbedingungen insgesamt einen Einfluss auf das beobachtete Ergebnis haben. Um alle Bedingungen miteinander zu vergleichen wurde anschließend der Bonferroni Post-test durchgeführt.

Eine Aussage über die Signifikanz der Ergebnisse wird mit den angegebenen p-Werten getroffen. Ein p-Wert ist ein Maß für die Wahrscheinlichkeit, mit der ein gemessener Unterschied in Wirklichkeit nicht vorhanden ist. Bei einem p-Wert von  $p > 0,05$  wird von einem signifikanten Unterschied (\*) ausgegangen, bei  $p > 0,01$  ist der Unterschied sehr signifikant (\*\*) und bei einem p-Wert von  $p > 0,001$  wird von einem extrem signifikanten Unterschied (\*\*\*) ausgegangen.

Für die statistische Auswertung der Experimente wurde die Software GraphPad Prism verwendet.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Funktionelle Charakterisierung von THAP1

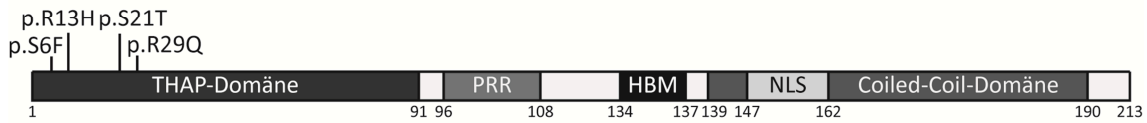
#### 4.1.1 THAP1 reguliert seine eigene Expression

In verschiedenen Studien konnten bereits mehrere Zielgene des Transkriptionsfaktors THAP1 identifiziert werden, darunter das Dystonie-assoziierte *TOR1A* [25, 26], aber auch *RRM1* (*ribonucleotide reductase catalytic subunit M1*), *MAD2* (*mitotic arrest deficient2*), *BIRC5* (*survivin*), *HMMR* (*hyaluronan-mediated motility receptor*), *RRM2* (*ribonucleoside-diphosphate reductase large subunit2*), *CDC2* (*cell division cycle 2*), *CyclinB1* und *DLG7* (*disks larke homolog 7*) [55].

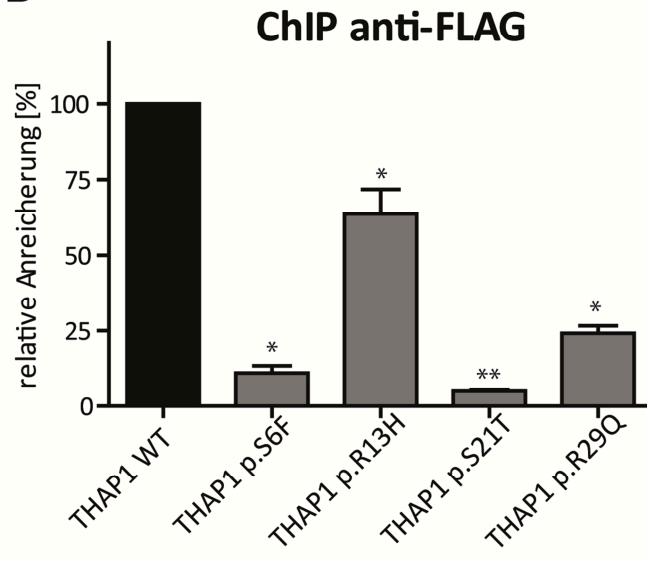
In Vorarbeiten von Dr. Alev Richter konnten zudem erste Hinweise auf eine autoregulatorische Aktivität von THAP1 identifiziert werden. Diese beruhte auf der Beobachtung einer stets erhöhten *THAP1*-Expression in Fibroblasten aus Hautbiopsien von *DYT-THAP1*-Patienten. Zur funktionellen Analyse einer möglichen Autoregulation von THAP1 wurde zunächst mittels *in silico* Vorhersagen die *THAP1*-Promotor-Region definiert und die entsprechende genomische Region mittels Luciferase-Reportergen-Analysen auf einen Kernpromotor eingegrenzt. Zusätzlich konnte die DNA-Bindung von THAP1 an den identifizierten *THAP1*-Kernpromotor mittels EMSA- und CHIP-Analysen verifiziert werden. Aufgrund des Fehlens eines ausreichend spezifischen anti-THAP1-Antikörpers konnten für diese Analysen ausschließlich ein THAP1-FLAG-Fusionsprotein verwendet werden. In Luciferase-Reportergen-Analysen konnte ferner nachgewiesen werden, dass THAP1 seine eigene Expression reprimiert und dass diese THAP1-vermittelten Repression durch *DYT-THAP1*-verursachende Mutationen vermindert wird.

Im Rahmen meiner Doktorarbeit wurde der Einfluss von *DYT-THAP1*-verursachenden Mutationen innerhalb der THAP-Domäne auf die DNA-Bindung mittels quantitativer CHIP-Analysen untersucht (siehe Abschnitt 3.2.4.10). Dazu wurden die vier verschiedene *Missense*-Mutationen p.S6F [106], p.R13H [107], p.S21T [108] und p.R29Q [109] ausgewählt (Abbildung 4.1.1 A) und mittels PCR-basierter *in vitro* Mutagenese in ein THAP1 3x FLAG Expressionsplasmid eingefügt (siehe Abschnitt 3.2.4.4). Für die CHIP-Analysen wurden SH-SY5Y Zellen transient mit den mutanten THAP1-Konstrukten p.S6F, p.R13H, p.S21T und p.R29Q transfiziert (siehe Abschnitt 3.2.1.5,) und die Expression mittels Westernblot verifiziert. Nach 24 h Inkubation erfolgte durch die Zugabe von Formaldehyd eine reversible Verknüpfung von Chromatin und DNA-bindenden Proteinkomplexen (*Crosslink*). Über spezifische Zellyse-Prozesse wurde das Chromatin aus den Zellkernen isoliert und mittels Ultraschall in circa 200-800 bp große Fragmente gespalten (Abschnitt 3.2.4.9).

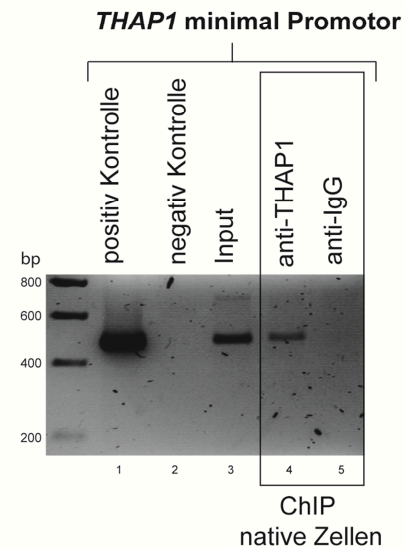
A



B



C

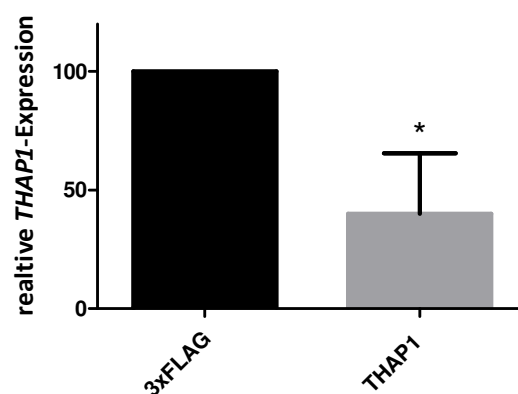


**Abbildung 4.1.1: THAP1 bindet seinen eigenen Promotor**

A) Schematische Darstellung des THAP1-Proteins mit den funktionellen Domänen (THAP-Domäne, Prolin-Reiche-Region (PRR), HCFC1-Binde-Motiv (HBM), Nukleus-Lokalisations-Signal (NLS), Coiled-Coil Domäne) und den vier untersuchten Mutationen p.S6F, p.R13H, p.S21T und p.R29Q in der THAP-Domäne. B) Quantitative ChIP mit anti-FLAG Antikörper an Chromatin aus transient mit THAP1 3XFLAG Konstrukten transfizierten SH-SY5Y Zellen. Die qPCR an der präzipitierten DNA wurde mit spezifischen TaqMan Primern und Sonden für den *THAP1*-Minimalpromotor durchgeführt. Die Anreicherung des *THAP1*-Minimalpromotors wurde an der Input-DNA normiert und für wildtyp THAP1 gleich 100 % gesetzt. Die Mutanten p.S6F, p.S21T und p.R29Q zeigen nur noch eine DNA-Affinität von 10-25 %, die Bindefähigkeit der Mutante P.R13H ist auf 60 % reduziert. Die Messung erfolgte in Triplikaten, gezeigt sind Mittelwert und Standardabweichung von zwei unabhängigen Experimenten, die Sterne markieren einen signifikanten Unterschied zum Wildtyp (\* =  $p > 0,05$ , \*\* =  $p > 0,01$  *one-way* ANOVA). C) ChIP durchgeführt an untransfizierten HEK293 Zellen mit einem anti-THAP1 Antikörper. Die PCR Amplifikation mit spezifischen Primern für den THAP1-Minimalpromotor konnte den Promotor in der positiv-Kontrolle (1) sowie in der Input DNA (3) und der ChIP-Probe mit dem anti-THAP1-Antikörper präzipitierten DNA (4) nachweisen, aber nicht in der Probe, die mit einem anti-IgG Antikörper präzipitiert wurde (5). Gezeigt ist ein repräsentatives Ergebnis von drei unabhängigen Experimenten.

Aus einem Aliquot des fragmentierten Chromatins wurde eine Input-Kontrolle generiert (siehe Abschnitt 3.2.4.1). Die Chromatinlösung wurde mit einer anti-ProteinA M2 FLAG-Antikörper-Matrix inkubiert und THAP1-Chromatinkomplexe spezifisch präzipitiert. Die so erhaltenen DNA-Fragmente wurden mittels quantitativer PCR und spezifischen Primern und Sonden gegen den *THAP1*-Promotor analysiert. Eine Normierung der ChIP-DNA erfolgte durch die Quantifizierung der Input-DNA. Durch die hier beschriebenen Analysen konnte für alle untersuchten *Missense*-Mutationen eine reduzierte Bindung des THAP1-Transkriptionsfaktors

zum *THAP1*-Promotor aufgezeigt werden. Hierfür wurde die relative DNA-Bindung des wildtyp *THAP1* als 100 % gesetzt und die einzelnen Bindekapazitäten der „mutierten Konstrukte“ in Vergleich gesetzt. Für alle untersuchten Mutanten wurde eine signifikant reduzierte DNA-Bindung festgestellt, das *THAP1*-Protein p.S6F zeigte nur noch 10 % der DNA-Bindekapazität, p.R13H 65 %, p.S21T 6 % und p.R29Q 25 % vergleichend zum wt *THAP1* (Abbildung 4.1.1 B). Um auch die Bindung des endogenen *THAP1* an seinen eigenen Promotor nachzuweisen, wurden zusätzliche Analysen unter Verwendung nicht transfizierten SH-SY5Y Zellen durchgeführt. Die Präzipitation der endogenen *THAP1*-Chromatin-Komplexe erfolgte durch einen spezifischen anti-*THAP1*-Antikörper (Santa Cruz Biotechnology), der bereits zuvor erfolgreich in ChIP-Experimenten verwendet wurde. Als Spezifitätskontrolle erfolgte eine weitere ChIP-Analyse unter Verwendung eines anti-IgG Antikörpers. In sich daran anschließenden PCR-Analysen an den präzipitierten und aufgereinigten DNA-Fragmenten konnte der minimale *THAP1*-Promotor ausschließlich in den mittels des anti-*THAP1*-Antikörpers präzipitierten genomischen Fragmenten nachgewiesen werden (Abbildung 4.1.1 C). Die Bindung des Transkriptionsfaktors an seinen eigenen Promotor konnte somit sowohl für ein ektopisch exprimiertes *THAP1*-3xFLAG-Fusionsprotein, als auch für das endogene *THAP1*-Genprodukt bestätigt werden. Nachdem die Bindung von *THAP1* an seinen Promotor bestätigt werden konnte, sollte im nächsten Schritt überprüft werden, ob *THAP1* seine eigene Expression aktiviert oder reprimiert. Hierzu wurde die Expression des endogenen *THAP1*-Gens in transient mit *THAP1*-3xFLAG transfizierten SH-SYS5 Zellen mittels qPCR untersucht. Die transfizierten Zellen wurden 48 Stunden nach Transfektion geerntet und die RNA, wie in Abschnitt 3.2.4.2 beschrieben, mit dem RNAeasy Kit von Qiagen extrahiert.



**Abbildung 4.1.2: Ektopisch exprimiertes *THAP1* reprimiert die Expression des *THAP1*-Gens**

Quantitative Real-Time-PCR des endogenen *THAP1* in transient mit *THAP1* 3xFLAG oder FLAG-Leervektor transfizierten HEK293 Zellen. Die Expression von endogenem *THAP1* wurde mit Primern und Sonden spezifisch für die 3'UTR gemessen und auf die Expression von *MAPK1* normiert. Die mit *THAP1* 3xFLAG transfizierten Zellen zeigen eine signifikant um 60 % reprimierte Expression ( $p < 0.05$ , T-Test). Die Messungen erfolgten in Triplikaten. Der Graph zeigt Mittelwert und Standardabweichung von sieben unabhängigen Experimenten ( $n=7$ ).

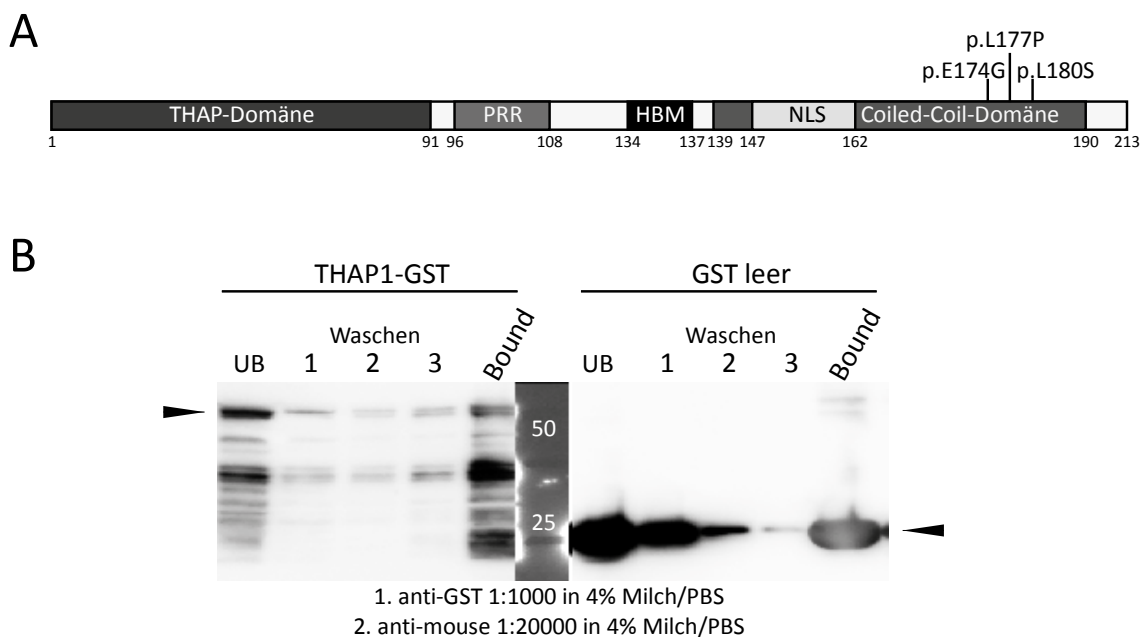
Anschließend wurden 0,5-2 µg der RNA mit dem SuperScript III cDNA-Synthese Kit von Invitrogen unter der Verwendung von *Random Hexamer* Primern in cDNA umgeschrieben. Diese wurde für eine qPCR (*quantitative Real Time PCR*, siehe Abschnitt 3.2.4.4) eingesetzt, um die Menge des endogenen *THAP1*-Transkriptes zu quantifizieren. Um endogen exprimiertes *THAP1* von der plasmid-generierten mRNA unterscheiden zu können, wurden die Primer und spezifische Sonden für einen Bereich innerhalb der 3'UTR (*Untranslated-Region*, nicht translatierte Sequenz) verwendet, der im ektopisch exprimierten Transkript nicht vorhanden ist. Zur Normierung der relativen Transkriptmengen wurden die Expressionslevel des Haushaltsgens *MAPK1* verwendet. Zellen, die mit *THAP1* 3xFLAG transfiziert wurden, zeigen im Vergleich zu Zellen, die nur mit einem leeren 3xFLAG Plasmid transfiziert wurden, eine um 60 % reduzierte Expression des *THAP1*-Gens (Abbildung 4.1.2). Diese Analysen zeigte erstmalig eine Funktion von *THAP1* als Repressor der *THAP1* Expression *in vivo*.

## 4.1.2 THAP1 als Interaktionspartner

In den unter 2.5 beschriebenen Vorarbeiten von Dr. Alev Richter konnten mehrere direkte potentielle Interaktionspartner des THAP1-Proteins identifiziert werden. Im Rahmen der hier vorgestellten Arbeit sollten weitere Analysen zur funktionellen Charakterisierung dieser putativen Protein-Protein-Interaktionen durchgeführt und deren Relevanz für die Aktivität von THAP1 aufgeklärt werden.

### 4.1.2.1 Der Einfluss von Mutationen in der *Coiled-Coil*-Domäne auf die THAP1-Homodimerisierung

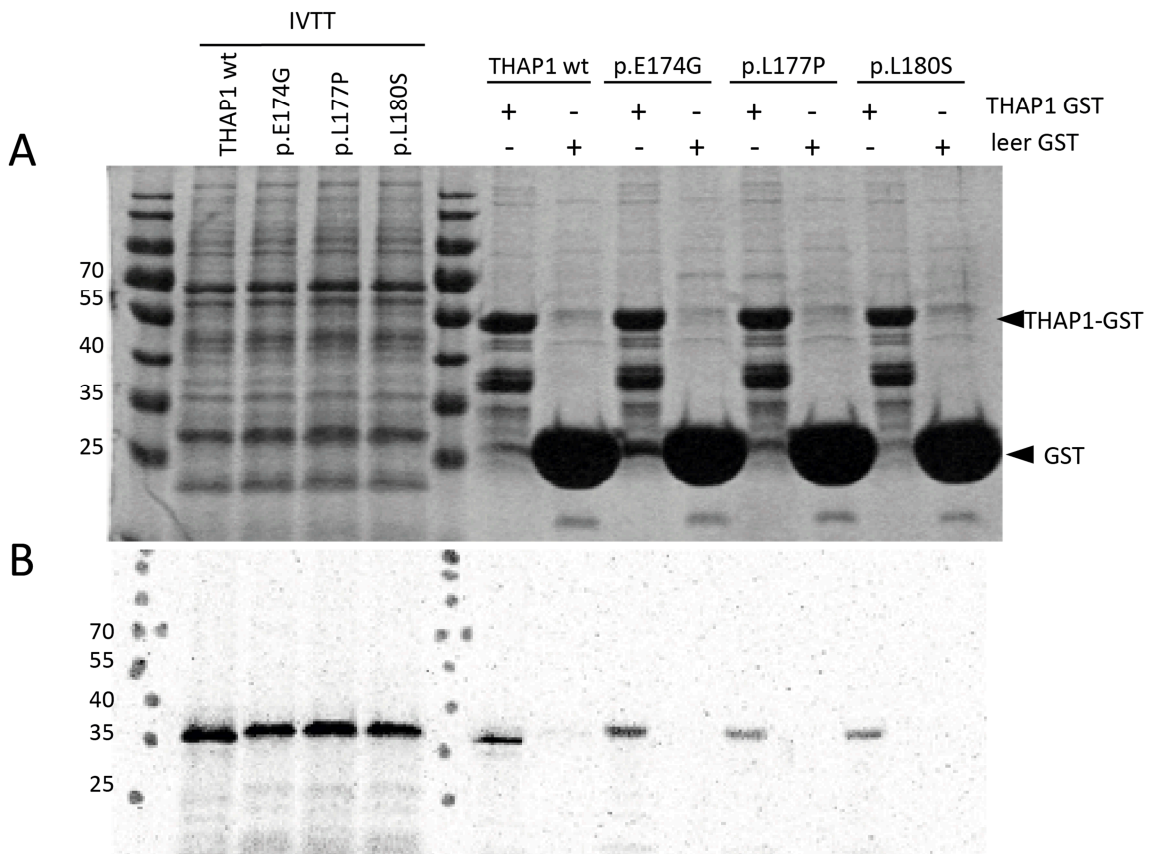
Innerhalb der aufgeführten Vorarbeiten von Frau Dr. Alev Richter, konnte eine Homodimerisierung von THAP1 nachgewiesen werden. Durch die Verwendung verschiedener trunkierter THAP1-Proteine konnte die für die THAP1-THAP1-Interaktion kritische Region auf die *Coiled-Coil*-Domäne (CCD) eingegrenzt werden. Unmittelbar zu Beginn meiner Doktorarbeit konnte drei neue DYT6-ursächliche *Missense*-Mutationen p.E174G [110], p.L177P [111] und p.180S [112] in Patienten identifiziert werden, die zur Substitution einzelner Aminosäurereste innerhalb der CCD führen (Abbildung 4.1.3 A).



**Abbildung 4.1.3: Untersuchte THAP1 Mutationen der *Coiled-Coil*-Domäne und Beladung der Glutathion-Sepharose**

A) Schematische Darstellung des THAP1-Proteins mit den funktionellen Domänen (THAP-Domäne, Prolin-Reiche-Region, HCFC1-Binde-Motiv, Nukleus-Lokalisations-Signal, *Coiled-Coil*-Domäne) und den vier untersuchten Mutationen p.E174G, p.L177P und p.L180S in der *Coiled-Coil*-Domäne. B) Nach der Überexpression der GST-Fusionsproteine (THAP1-GST, 50 kDa, links; GST ohne THAP1, 25 kDa, rechts) wurden diese an Glutathion-Sepharose immobilisiert. Die erfolgreiche Beladung der Sepharose („Bound“) nach drei Waschschrritten wurde mittels Westernblot durch Detektion mit einem anti-GST Antikörper überprüft. UB = Ungebunden (*Unbound*)

Ziel des hier vorgestellten Teilprojektes war es den Einfluss der drei Aminosäuresubstitutionen auf die Homodimerisierung von THAP1 zu untersuchen. Hierzu wurden zuerst mittels *in-vitro* Mutagenese alle drei Mutationen in THAP1 3xFLAG Expressionsplasmide eingefügt. Danach wurden rekombinante, in *E. coli* synthetisierte GST-THAP1-Fusionsproteine, an einer Glutathion-Sepharose immobilisiert und mit *in vitro* synthetisiertem [<sup>35</sup>S]-markiertem Wildtyp oder mutantem THAP1 Protein („IVTT“, siehe Abschnitt 3.2.5.3) inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Proteinkomplexe stringent gewaschen und mit SDS-Probenpuffer von der Glutathion-Sepharose eluiert. Anschließend wurden die Proteine zusammen mit den Input-Proben auf einem SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt (siehe Abschnitt 3.2.5.4). Zur vergleichenden Analyse der Bindung der drei mutierten Konstrukte und des Wildtyp-THAP1 Proteins an das immobilisierte GST-THAP1 wurde das Gel zuerst mit Coomassie-Blau gefärbt (Abbildung 4.1.4 A).



**Abbildung 4.1.4: GST-Pulldown zur Untersuchung des Effekts von THAP1-Mutationen auf die Homodimerisierung**

A) Coomassie-Färbung zur Qualitätskontrolle der *in vitro* synthetisierten Proteine (IVTT, linke Spalte) und der *Pulldown*-Proben nach Auftrennung mittels SDS-PAGE (rechte Spalte). B) Detektion der radioaktiv-markierten THAP1-Proteine nach GST-*Pulldown*. Eine spezifische Bande zeigt eine bestehende Protein-Protein-Interaktion zwischen dem wt THAP1-GST-Fusionsprotein und dem radioaktiv markiertem THAP1-Konstrukt (rechte Spalte). Links: Kontrolle der *in vitro* Synthese der [<sup>35</sup>S]-Markierten Proteine. Als Negativ-Kontrolle wurde für jede untersuchte Interaktion eine Probe mit GST ohne THAP1 mitgeführt. Gezeigt ist ein repräsentatives Ergebnis von zwei unabhängigen Experimenten.

Anschließend wurde das Gel getrocknet und zur Detektion der radioaktiven Proteine gegen eine Imaging Platte exponiert. Die erfolgreiche Immobilisierung der GST-Fusionsproteine („Bound“) wurde mittels Westernblot überprüft (Abbildung 4.1.3 B) und ein GST-Protein ohne Fusion mit THAP1 zur Überprüfung der Bindspezifität eingesetzt. In den durchgeführten Analysen konnte keine funktionelle Relevanz der drei untersuchten Varianten auf die Homodimerisierung von THAP1 nachgewiesen werden. Das mittels *Imager* detektierte Signal aller drei mutanten THAP1-Konstrukte entspricht dem des Wildtyp-Proteins (Abbildung 4.1.4 B).

#### 4.1.2.2 HDAC3 als Interaktionspartner von THAP1

##### Vorarbeiten

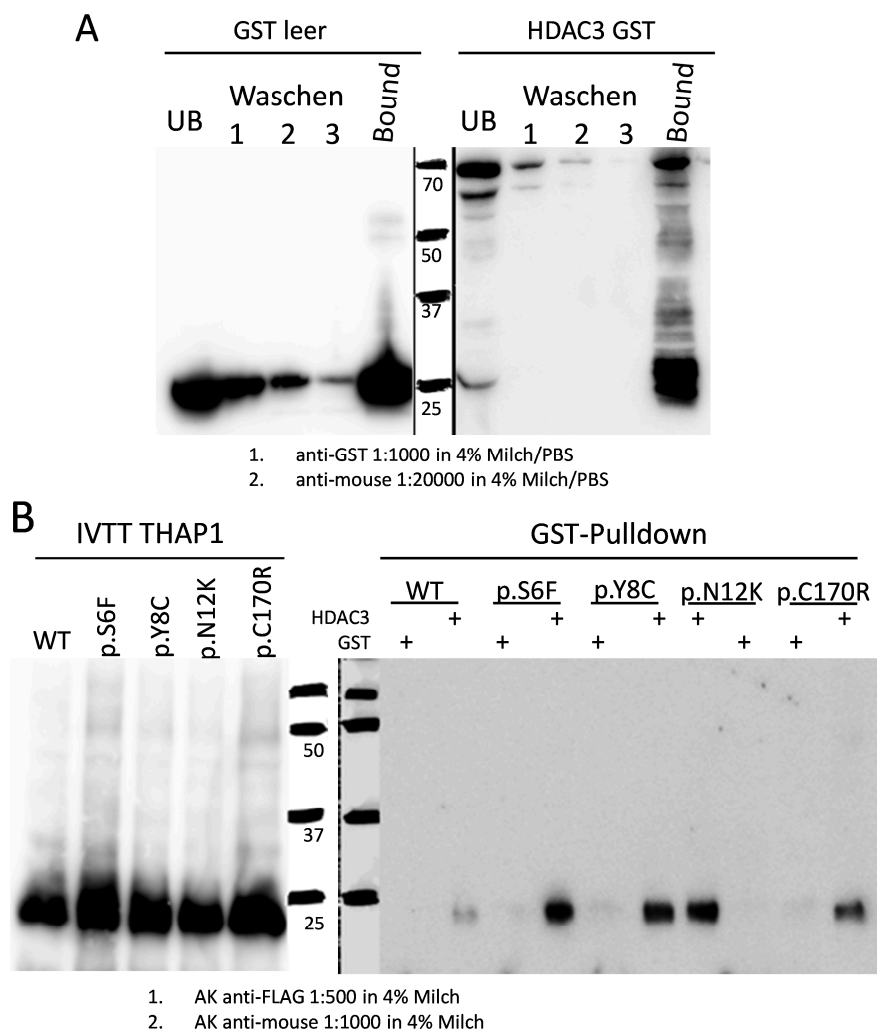
Ein weiterer in Vorarbeiten identifizierter Bindepartner ist die Histon Deacetylase 3 (HDAC3). Durch die Verwendung trunkierter überlappender THAP1-Konstrukte in Hefe-Zwei-Hybrid-Analysen, wurde die Bindestelle für HDAC3 auf die N-terminale THAP-Domäne eingegrenzt. Die Mehrheit der bisher beschriebenen Dystonie-verursachenden *Missense*-Mutationen in *THAP1* führen zu Veränderungen innerhalb der DNA-bindenden N-terminalen THAP-Domäne.

##### Charakterisierung der Interaktion

Zur Untersuchung, ob DYT-*THAP1*-ursächliche Mutationen einen Einfluss auf die Interaktion von THAP1 und HDAC3 haben, wurden verschiedene Analysen durchgeführt. Zuerst wurden in einer vorbereitenden Studie im Hefe-2-Hybrid-System die Interaktion von HDAC3 und den THAP1 Mutanten p.Y8C [106], p.N12K [108], p.H23P [107], p.P26L [107], p.R29Q [109] und p.F81L [39] untersucht. Hierfür wurden mittels *in vitro* Mutagenese und Subklonierung die THAP1 Mutanten in pGADT7-Expressionsplasmide eingefügt. Die proteincodierende DNA-Sequenz (ORF, *Open reading frame*) von HDAC3 wurde mittels PCR an humaner cDNA aus fetalem Gehirn amplifiziert und in ein pGBKT7-Expressionsplasmid inseriert. In diesen Vorversuchen konnte keine Veränderung der Protein-Protein-Interaktion durch die untersuchten Mutationen festgestellt werden. Daher wurde für weitere Untersuchungen eine alternative Methode ausgewählt. Hierfür wurden die THAP1-Mutanten p.S6F, p.Y8C, p.N12K und als Kontrolle p.C170R in 3xFLAG Expressionsplasmide subkloniert, der ORF von HDAC3 wurde in das Überexpressionsplasmid pGEX-4T2 ligiert, um ein HDAC3-GST Fusionsprotein herstellen zu können. Wie in Abschnitt 3.2.2.3 beschrieben, wurden kompetente Bakterien mit diesem Plasmid transformiert um eine Überexpression zu induzieren (Abschnitt 3.2.2.4). Nach der Lyse der Bakterien wurde das GST-HDAC3-Fusionsprotein an Glutathion-Sepharose immobilisiert. Die Beladung der Sepharose nach drei Waschschritten wurde im Westernblot überprüft (Abbildung 4.1.5 A). Die Protein-Sepharose Komplexe wurden über Nacht mit *in vitro*

translatierten THAP1 3XFLAG Konstrukten (IVTT, siehe Abschnitt 3.2.5.3) inkubiert und nach einem stringenten Waschvorgang mittels SDS-Page und Westernblot analysiert. Zusätzlich wurden die THAP1-Konstrukte zur Überprüfung einer effizienten *in vitro* Synthese auf das Gel aufgetragen. Die Detektion erfolgte mittels M2 anti-FLAG Antikörper.

Obwohl auch in den hier durchgeführten Experimenten die Interaktion von THAP1 mit HDAC3 bestätigt werden konnte, zeigte keines der mutierten THAP1-Konstrukte einen Verlust bzw. eine eingeschränkte Bindeaffinität zu HDAC3 (Abbildung 4.1.5 B).



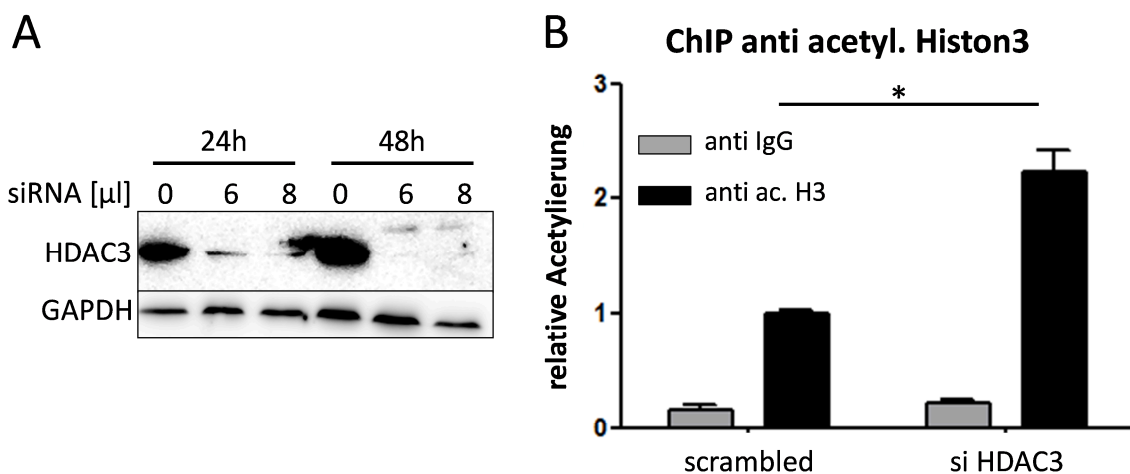
**Abbildung 4.1.5: Der Einfluss von THAP1-Mutationen auf die Interaktion mit HDAC3**

A) Qualitätskontrolle und Kontrolle der Immobilisierung der rekombinanten GST-Fusionsproteine (empty GST, 25 kDa, links; HDAC3-GST, ca. 70 kDa, rechts) an Glutathion-Sepharose mittels Westernblot-Analyse. Gezeigt sind ist das ungebundene Protein (UB, *unbound*), die Proteinmenge in den Waschschrritten (Waschen 1-3) sowie die gebundene Fraktion (*Bound*). Die Detektion erfolgte mit einem anti-GST Antikörper. B) Qualitätskontrolle der *in vitro* synthetisierten THAP1 3XFLAG Konstrukte im Westernblot mit einem M2 anti-FLAG Antikörper (linke Spalte „IVTT THAP1“). Die Detektion des GST-Pulldowns erfolgte ebenfalls im Westernblot, eine spezifische Bande zeigt die Interaktion zwischen wt THAP1 3xFLAG bzw. den THAP1 Mutanten p.S6F, p.Y8C, p.N12K und p.C170R. Als Negativkontrolle wurde für jede untersuchte Interaktion eine Probe mit GST ohne HDAC3 mitgeführt. Gezeigt ist ein repräsentativer Westernblot von zwei unabhängigen Experimenten.

### Funktionelle Analyse von HDAC3

In seiner Funktion als Histondeacetylase ist HDAC3 ein wichtiger Kofaktor zahlreicher Transkriptionsfaktoren. Dabei wird HDAC3 über den Sequenz-spezifischen Transkriptionsfaktor an die Zielsequenz rekrutiert und katalysiert die Deacetylierung benachbarter Histonproteine. Innerhalb von Promotorregionen führt diese Deacetylierung zu einer Repression und damit verbundenen Reduktion der Gen-Expression.

Zur Überprüfung, ob eine über THAP1 vermittelte Rekrutierung von HDAC3 zu einer Repression bekannter THAP1-Zielgene führt, erfolgte zunächst eine über siRNA induzierte Reduktion von HDAC3. Dazu wurden SH-SY5Y Zellen mit 6 bzw. 8  $\mu$ l eines Gemisches verschiedener spezifischer siRNAs gegen *HDAC3* transfiziert und die Menge an HDAC3 mittels Westernblot analysiert. Für beide verwendeten Konzentrationen konnte bereits 24 h nach Transfektion eine deutliche Reduktion von HDAC3 nachgewiesen werden. Nach einer 48-stündigen Inkubationszeit konnte kein HDAC3 mehr nachgewiesen werden (Abbildung 4.1.6 A).



**Abbildung 4.1.6: siRNA-vermittelte Reduktion von HDAC3 führt zu einer verstärkten Acetylierung der Histone innerhalb des *THAP1*-Promotors**

Etablierung der siRNA-vermittelten Reduktion von HDAC3. HEK293-Zellen wurden transient mit zwei verschiedenen Dosen HDAC3 siRNA transfiziert und für 24 h und 48 h inkubiert. Nach Zellernte und Protein-Extraktion wurde das native HDAC3 Protein im Westernblot mit einem spezifischen anti-HDAC3 Antikörper detektiert. Als Ladekontrolle wurde ein anti-GAPDH Antikörper verwendet. Bereits nach 24 h zeigte sich eine deutliche Reduktion des HDAC3-Proteins. Gezeigt ist ein repräsentativer Westernblot von zwei unabhängigen Experimenten. B) Für die quantitative ChIP wurden HEK293-Zellen transient mit HDAC3 siRNA transfiziert. Die ChIP wurde mit einem anti-acH3 Antikörper durchgeführt. Als Negativkontrolle wurde ein anti-IgG Antikörper eingesetzt. Die Anreicherung des *THAP1*-Minimalpromotors wurde mit spezifischen Primern und Sonden gemessen, an der Input-DNA normiert und für Kontroll-siRNA (scrambled) gleich 1 gesetzt. An mit HDAC3 siRNA behandelten Zellen wurde doppelt so viel acetylierter *THAP1*-Promotor gemessen wie in Kontrollzellen. Die Messung erfolgte in Triplikaten, gezeigt sind Mittelwert und Standardabweichung von zwei unabhängigen Experimenten, der Stern markiert einen signifikanten Unterschied zur Kontrolle ( $p > 0.05$ , T-Test).

Um zu untersuchen ob ein Verlust von HDAC3 zu einer Veränderung der Acetylierung innerhalb der *THAP1*-Promotorregion führt wurden CHIP-Analysen durchgeführt. Hierzu wurden SH-SY5Y mit *HDAC3* siRNA bzw. kontroll-siRNA transfiziert und nach 48 h mit *Crosslinking*-Puffer fixiert. Nach Extraktion und Fragmentierung des Chromatins erfolgte eine CHIP unter Verwendung spezifischer Antikörper gegen acetyliertes Histon3 (Millipore). Anschließend wurden die präzipitierten und gereinigten genomischen DNA-Fragmente mittels qPCR auf das Vorhandensein des minimalen *THAP1*-Promotors untersucht. Hierbei zeigte sich, dass ein Verlust bzw. starke Reduktion von HDAC3 zu einer Verdopplung der Acetylierung des Histon 3-Proteins innerhalb der *THAP1*-Promotorregion führt (Abbildung 4.1.6 B).

#### 4.1.2.3 Untersuchung der Interaktion von THAP1 und YWHAE

##### Vorarbeiten

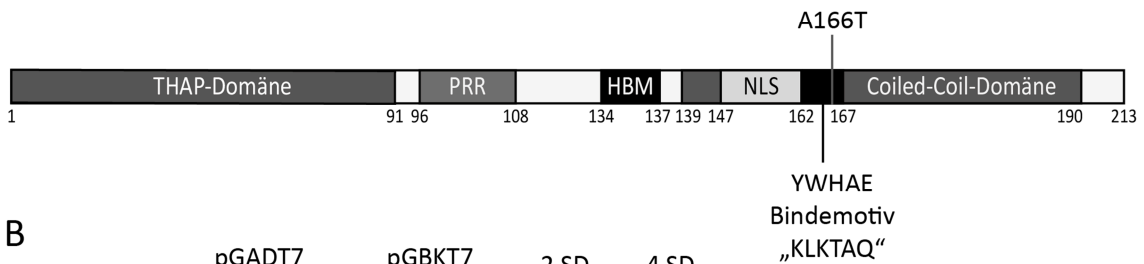
In einer massenspektrometrischen Analyse von angereicherten THAP1-Proteinkomplexen, konnte YWHAE (*Tyrosine 3-Monooxygenase/Tryptophan 5-Monooxygenase Activation Protein Epsilon*) als möglicher Interaktionspartner von THAP1 identifiziert werden. YWHAE gehört zur Familie der 14-3-3 Proteine und wird auch 14-3-3 $\epsilon$  genannt.

##### Interaktionsstudien

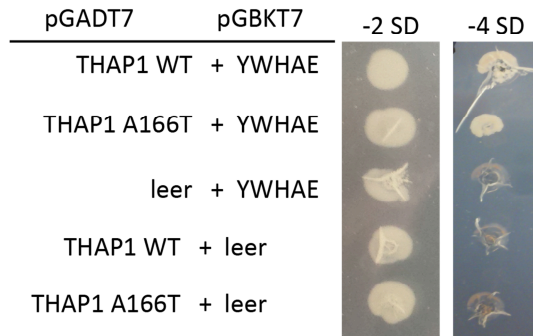
Um eine mögliche Interaktion von THAP1 mit YWHAE zu untersuchen, wurde zunächst der ORF von YWHAE an humaner cDNA aus fetalem Gehirn amplifiziert und für Interaktionsstudien in Hefen in das Expressionsplasmid pGBKT7 inseriert.

Analysen der Aminosäuresequenz von THAP1 zeigen ein sechs Aminosäuren umfassendes (AS 162-167) putatives YWHAE-Bindemotiv innerhalb der *Coiled-Coil*-Domäne von THAP1 (Abb. 4.1.7 A). In bisherigen Sequenzierungsanalysen in Patienten mit einer Dystonie, konnte eine Variante innerhalb des *THAP1*-Gens beschrieben werden (p.A166T, [113]), die zu einer Aminosäuresubstitution innerhalb des vorhergesagten Bindemotivs führt. Um einen Einfluss dieser Mutation auf die Bindung von THAP1 und YWHAE zu untersuchen, wurde mittels *site-directed* Mutagenese ein THAP1 p.A166T Konstrukt generiert. Kompetente Hefen (AH109) wurden mit THAP1 pGADT7 und YWHAE pGBKT7 Expressionsplasmiden transformiert und zur Überprüfung einer erfolgreichen Kotransformation mit beiden Plasmiden auf -2SD Agarplatten ausplattiert. Nach einer Inkubationszeit von 4-5 Tagen wurden einzelne Hefekolonien auf -4SD Platten überführt. Ein Wachstum der Hefen ist auf diesem Selektionsmedium nur möglich wenn es zu einer Interaktion des THAP1-Proteins mit dem YWHAE-Protein kommt. Wie in Abbildung 4.1.7 B dargestellt, konnten sowohl für das Wildtyp-THAP1 als auch für die mit THAP1 p.A166T transformierten Hefen ein Wachstum auf -4 SD Platten nachgewiesen werden.

A



B



**Abbildung 4.1.7: Charakterisierung der Interaktion zwischen THAP1 und YWHAE**

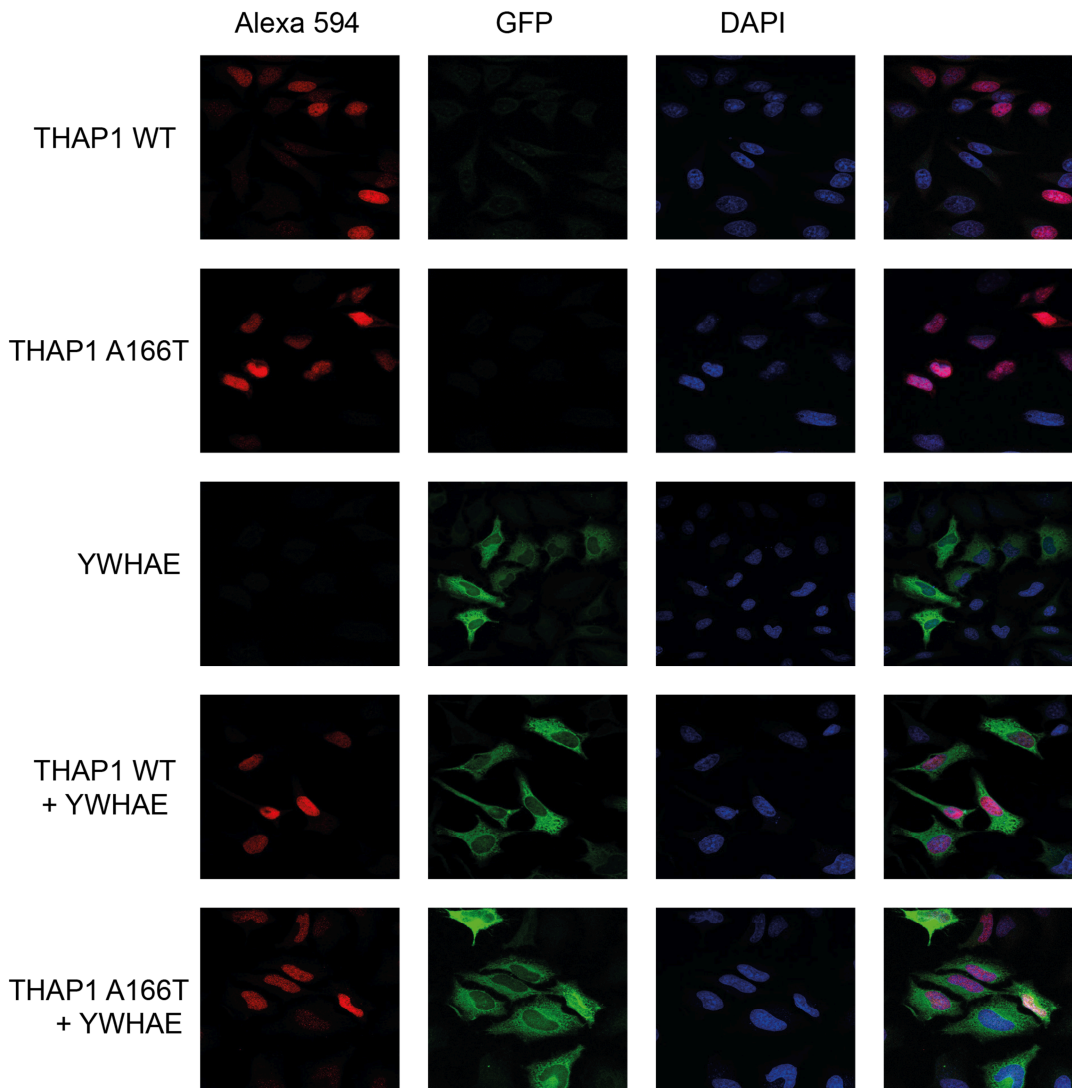
A) Schematische Darstellung des THAP1-Proteins mit den funktionellen Domänen. Das YWHAE-Bindemotiv ist bei den AS 162-167 lokalisiert. Die untersuchte Missense-Mutation betrifft die AS 166. B) Hefe-2-Hybrid Studien zur Untersuchung der Interaktion zwischen THAP1 und YWHAE. Die mit den entsprechenden pGADT7 und pGBKT7 Plasmiden kotransformierten Hefen des Stammes AH109 wurden auf Mangelmedium ausplattiert. Das Wachstum auf -2SD Medium zeigt eine erfolgreiche Kotransformation, das Wachstum auf -4SD Medium eine Interaktion der Proteine. Leer-Plasmide dienen als Negativkontrolle. Sowohl wt THAP1 als auch THAP1 p.A166T zeigen eine Interaktion mit YWHAE.

Die aufgeführten Ergebnisse konnten somit zwar die in den Vorarbeiten mittels massenspektrometrischer Analysen gezeigte Interaktion in einem unabhängigen Hefe-System bestätigen, allerdings konnte keine Hinweise auf eine Veränderung dieser Protein-Protein-Interaktion durch eine krankheitsursächliche Veränderung innerhalb des vorhergesagten Bindemotive gefunden werden.

### Funktionelle Analysen

Zur genaueren Charakterisierung der Interaktion von THAP1 und YWHAE wurden zusätzlich Immunfluoreszenz-Studien durchgeführt um eine mögliche Kolo-kalisation innerhalb der Zelle zu untersuchen (siehe Abschnitt 3.2.5.6). Hierfür wurden HeLa-Zellen mit YWHAE-GFP und THAP1 3XFLAG (wildtyp bzw. p.A166T) transfiziert und nach einer 48-stündigen Inkubationszeit mit 4 % Paraformaldehyd fixiert. Die Detektion der THAP1-Proteine erfolgte mittels eines anti-FLAG Primär- und eines Alexa 594 Fluorochrom-gekoppelten anti-Maus Sekundäntikörpers. Es zeigte sich, dass sowohl das wildtyp THAP1 3xFLAG als auch das THAP1 p.A166T 3xFLAG fast ausschließlich im Zellkern lokalisiert vorliegt, während YWHAE primär im Zytoplasma nachweisbar ist (Abbildung 4.1.8). Da es Hinweise darauf gibt, dass Proteine der 14-3-3-

Familie am nukleo-zytoplasmatischen Transport beteiligt sind [114], entstand die Hypothese, dass die Zielproteine bei einer Kotransfektion anders lokalisiert sind als bei einer Überexpression von nur einem der Zielproteine. Allerdings konnte kein Unterschied zwischen einfach-transfizierten Zellen und mit THAP1 und YWHAE kotransfizierten Zellen beobachtet werden. Auch die THAP1 Mutante p.A166T hat keinen Einfluss auf die Lokalisation von THAP1 oder YWHAE.



**Abbildung 4.1.8: Lokalisation von THAP1 und YWHAE in transient transfizierten HeLa Zellen**

Für die Immunhistochemie wurden HEK293 Zellen entweder nur mit wt oder mutantern THAP1 3xFLAG oder YWHAE-GFP transfiziert, oder mit einem THAP1-Konstrukt und YWHAE kotransfiziert. Nach 24 Stunden wurden die Zellen fixiert und die THAP1-Proteine zusätzlich über anti-FLAG Antikörper und einen entsprechenden Alexa 594 Fluorochrom-gekoppelten Sekundärantikörper detektiert. Die DNA wurde zusätzlich mit DAPI (blau) gefärbt. Während THAP1 (Alexa 594, rot) im Zellkern lokalisiert ist, liegt YWHAE-GFP (grün) hauptsächlich im Zytoplasma vor.

### 4.1.3 Funktionelle Studien der Interaktion von THAP1 und HCFC1

#### Vorarbeiten

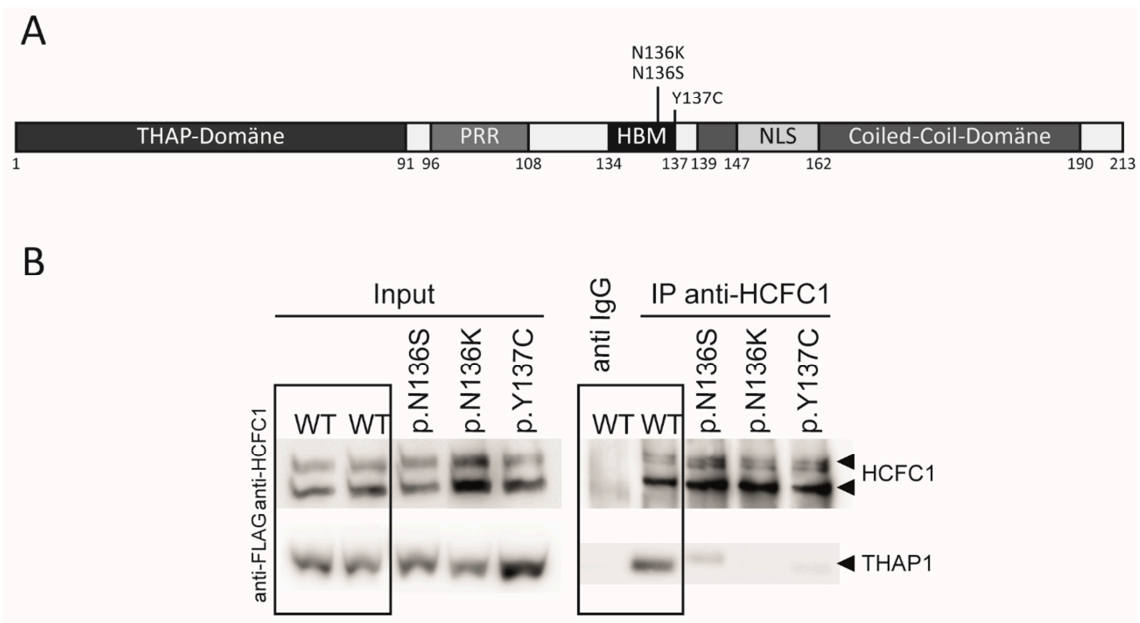
Mehrere Studien zeigen, dass HCFC1 mit verschiedenen Mitgliedern der THAP-Proteinfamilie interagiert, darunter auch THAP1. Diese Proteinbindung wird durch die hochkonservierte HBM-Domäne vermittelt. Bisher wurden drei Dystonie-verursachende Mutationen beschrieben, die zu einem Austausch einzelner Aminosäureseitenketten innerhalb dieser Bindedomäne führen: p.N136S [113], p.N136K [20] und p.Y137C [115] (Abbildung 4.1.10 A).

In parallel verlaufenden Studien von Herrn cand. med. Lucas Kötter konnte in Hefe-Zwei-Hybrid-Analysen für alle drei *Missense*-Mutationen ein vollständiger Verlust der Heterodimerisierung von THAP1 und HCFC1 gezeigt werden.

#### 4.1.3.1 Verlust der THAP1-Interaktion mit HCFC1 durch Dystonie-verursachende Mutationen

In diesem Teil der hier vorliegenden Arbeit sollte die zunächst in Hefe-Zwei-Hybrid-Studien untersuchte Bindung von THAP1 mit HCFC1 in einem humanen Zellsystem verifiziert werden. Hierzu wurden HEK293-Zellen mit einem wildtyp- oder entsprechend mutierten THAP1 3XFLAG-Expressionsplasmiden transfiziert.

Durch die Verwendung eines 3xFLAG-Fusionstag war es möglich, das überexprimierte THAP1-Protein vom endogenen Genprodukt zu unterscheiden. Zellextrakte der transfizierten Zellen wurden mit einem spezifischen HCFC1-Antikörper inkubiert und die HCFC1-Proteinkomplexe präzipitiert. Die gereinigten HCFC1-Komplexe wurden anschließend mittels SDS-PAGE aufgetrennt und im Westernblot analysiert. Während durch die Verwendung des spezifischen M2 anti-FLAG-Antikörpers die Interaktion des Wildtyp-THAP1 mit HCFC1 bestätigt wurde, zeigte sich auch in einem humanen Zellsystem, dass alle drei *Missense*-Mutationen zu einem Verlust der THAP1-HCFC1-Interaktion führen (Abbildung 4.1.9. B). Kontroll-Analysen konnten sowohl die Expression aller verwendeten THAP1-Konstrukte, also auch eine effiziente Präzipitation von HCFC1(-Proteinkomplexen) nachweisen.



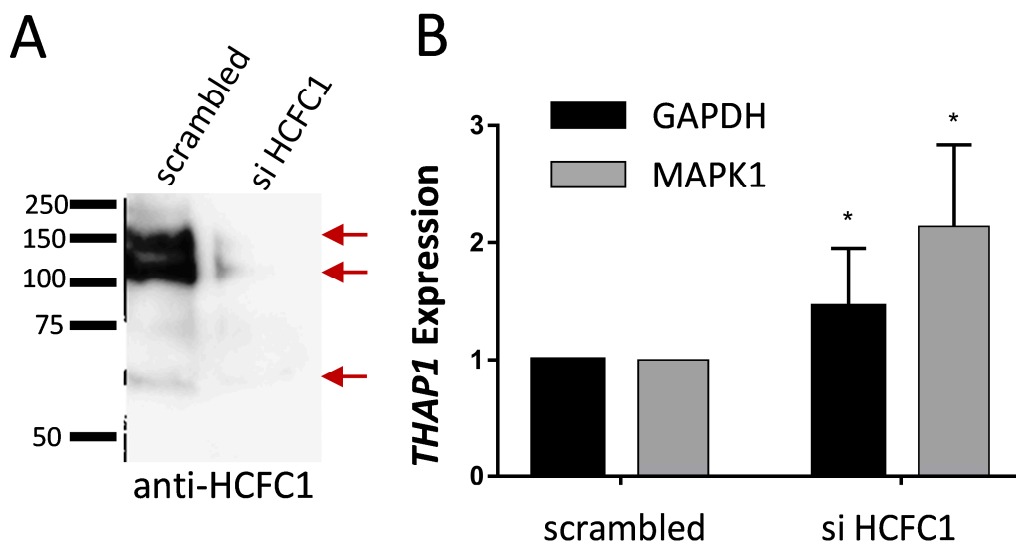
**Abbildung 4.1.9: Verlust der Interaktion von THAP1 und HCFC1 durch Mutationen in der Bindedomäne**

A) Schematische Darstellung des THAP1 Proteins und dessen funktionellen Domänen. Das HCFC1 Bindemotiv (HBM) betrifft die AS 134-137. Innerhalb dieses Bindemotivs wurden drei DYT-THAP1 assoziierte Missense-Mutationen beschrieben: p.N136K, p.N136S, p.Y137C. B) Für Koimmunpräzipitations-Assays wurden SH-SY5Y Zellen transient mit wt oder mutanten THAP1 3xFLAG Konstrukten transfiziert. Die Präzipitation erfolgte mit einem Antikörper gegen natives HCFC1. Als Negativ-Kontrolle wurde ein anti-IgG-Antikörper eingesetzt (rechte Spalte, erste Spur). Anschließend wurden die Proben mittels SDS-PAGE aufgetrennt und die Zielproteine im Westernblot detektiert (Primär-AK: Kaninchen anti-HCFC1-Antikörper, 1:1000 in 4 % Milch in PBS, bzw. Maus anti-FLAG Antikörper 1:1000 in PBS, Sekundär-AK: anti-Kaninchen-HRP 1:20.000 bzw. anti-Maus 1:20000 in 4 % Milch in 4 % Milch in PBS). Der anti-HCFC1 Antikörper erkennt verschieden große Spaltprodukte von HCFC1, so dass mehrere Banden sichtbar werden. Für eine Expressionskontrolle wurde im Westernblot ein Aliquot des verwendeten Zelllysats mitgeführt („Input“, linke Spalte). HCFC1 sowie die THAP1-Konstrukte wurden in allen Proben exprimiert. Während das wt THAP1 zusammen mit HCFC1 präzipitiert werden konnte (rechte Spalte, zweite Spur), wurde für keine der drei Mutanten ein Signal detektiert (rechte Spalte, Spur 3-5), obwohl ausreichend HCFC1 exprimiert wurde (rechte Spalte, obere Zeile). Der Westernblot zeigt ein repräsentatives Ergebnis aus drei unabhängigen Experimenten.

#### 4.1.3.2 HCFC1 ist essentieller Kofaktor für die THAP1-vermittelte Repression

HCFC1 ist ein bekannter Kofaktor für die Regulation der Transkription verschiedenster Gene und kann sowohl aktivieren als auch reprimieren [116–118]. Um die Rolle von HCFC1 bei der THAP1 vermittelten Autoregulation zu untersuchen, wurde die Menge an endogenem HCFC1 in SH-SY5Y Zellen mittels siRNA reduziert und anschließend mittels qPCR die Expression des *THAP1*-Gens untersucht. Diese Analysen erfolgten in enger Zusammenarbeit mit Herrn cand. med. Lucas Kötter. Die erfolgreiche und effiziente Reduktion der endogenen HCFC1-Proteinkonzentration konnte mittels Westernblot nachgewiesen werden (Abbildung 4.1.10 A). Aus den entsprechend behandelten Zellen wurden anschließend die Gesamt-RNA isoliert (siehe Abschnitt 3.2.4.2), in einer PCR mit reverser Transkriptase in cDNA umgeschrieben und

schließlich die Menge der mRNA der Ziel-Gene mittels quantitativer Real Time PCR (qPCR) gemessen (siehe Abschnitt 3.2.4.4). Da Untersuchungen zur Autoregulation von THAP1 in der Arbeitsgruppe bereits etabliert waren, erfolgten funktionelle Studien auf den Einfluss von HCFC1 auf die THAP1-vermittelte Autoregulation. In der qPCR wurden Sonden und Primer spezifisch für die 3'UTR von *THAP1* verwendet, um die Expression des endogenen *THAP1* zu detektieren. Die quantitativen Analysen der *THAP1* Expression zeigten eine signifikante Erhöhung der endogenen *THAP1*-Expression in den siRNA-behandelten Zellen. Zur Normierung der hier ermittelten Expressionslevel wurden die mRNA Mengen von zwei unterschiedlichen Haushaltsgenen gemessen. Hierbei zeigten sich eine 1,5-fache Zunahme der *THAP1*-Expression bei Normierung mit *MAPK1* bzw. eine 2-fache Erhöhung der Expression bei einer Normierung gegen *GAPDH* (Abbildung 4.1.10 B).



**Abbildung 4.1.10: siRNA-vermittelte Repression von HCFC1 führt zu einem Anstieg der *THAP1* Expression**

A) Etablierung der HCFC1 siRNA. HEK293-Zellen wurden transient mit HCFC1 siRNA und kontroll siRNA transfiziert und für 48h inkubiert. Nach Zellernte und Protein-Extraktion wurde die Menge an nativem HCFC1 Protein im Westernblot mit einem spezifischen anti-HCFC1 Antikörper detektiert. Der Antikörper detektiert neben dem vollständigen 150 kDa großen Protein auch Spaltprodukte von HCFC1, so dass Banden in unterschiedlicher Größe zu sehen sind (rote Pfeile). Nach 24 h zeigt sich eine deutliche Reduktion an HCFC1-Protein. Gezeigt ist ein repräsentativer Westernblot von zwei unabhängigen Experimenten. B) Für die qPCR zur Analyse der endogenen *THAP1* Expression wurden SH-SY5Y Zellen transient mit HCFC1 bzw. kontroll-*(scrambled)*-siRNA transfiziert. Nach 48 h wurde die totale RNA der Zellen extrahiert und mittels reverser Transkriptase PCR in cDNA umgeschrieben. Die endogene *THAP1* Expression wurde mit spezifischen Primern und Sonden für die 3'UTR von *THAP1* gemessen und auf die Expression von *GAPDH* und *MAPK1* normiert. Die Expression von *THAP1* in Kontrollzellen wurde gleich 1 gesetzt. Mit HCFC1-si RNA transfizierte Zellen zeigen eine 1,5-fach (*GAPDH*, schwarz) bis 2-fach (*MAPK1*, grau) erhöhte Expression von *THAP1* im Vergleich zu Kontrollzellen. Die Daten wurden in Triplikaten gemessen und sind als Mittelwert und Standardabweichung von sechs unabhängigen Experimenten angegeben (n=6, \* = p<0.05, \*\*\* = p<0.001, ungepaarter T-Test).

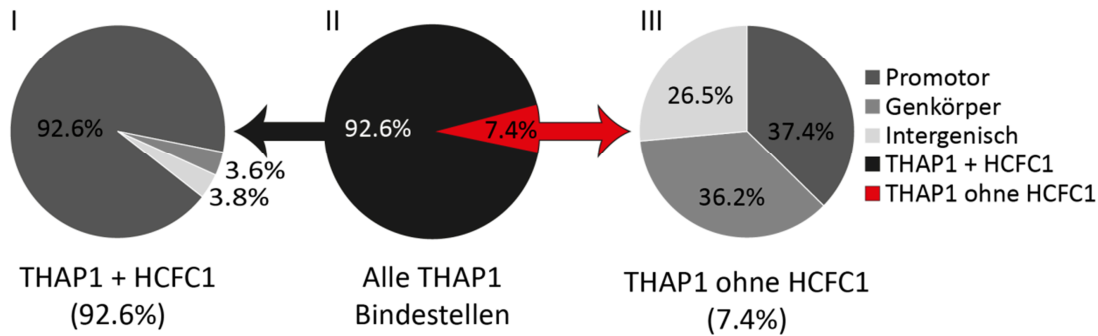
#### 4.1.3.3 THAP1 und HCFC1 binden gemeinsam an Zielpromotoren

Im Rahmen des ENCODE-Projekts (*The Encyclopedia of DNA Elements*, [119]) sind sowohl genomweite CHIP-Seq Daten für THAP1 als auch HCFC1 in K562-Zellen öffentlich verfügbar. Die visuelle Darstellung dieser Daten für bereits bekannte Promotoren im UCSC-Browser brachte erste Hinweise darauf, dass THAP1 und HCFC1 oftmals an dieselben Promotoren binden. Wie exemplarisch für den *THAP1*-Promotor (Abbildung 4.1.11) dargestellt zeigt sich eine starke Anreicherung von THAP1 und HCFC1 im Bereich des ersten Exons und der bekannten Promotoregion von *THAP1*. In Zusammenarbeit mit Herrn Dipl.-Biol. Benedikt Reiz (Institut für Kardiogenetik) erfolgten umfangreiche bioinformatische Analysen, in denen genomweit alle mittels CHIP-Seq ermittelten Bindestellen (ENCODE, [119]) von HCFC1 und THAP1 aufgelistet und verglichen wurden. Hierdurch konnten genomweit 3469 unabhängige THAP1-Bindestellen und mehr als 40.000 Bindestellen für HCFC1 in K562 Zellen identifiziert werden. Eine Überlagerung beide Datensätze ergab eine Kolo­kalisierung bzw. eine gemeinsame DNA-Bindung von HCFC1 an 3212 Stellen der insgesamt 3469 THAP1-Bindestellen, was einer Überlagerung von 92,6 % entspricht (Abbildung 4.1.12 A). Von diesen 3212 überlappenden Bindestellen liegen wiederum 92,6 % in einer als Promotor definierten Region und nur etwa 7 % in intergenischen Bereichen oder innerhalb codierender Gen-Regionen. Die nicht mit HCFC1 überlappenden THAP1-Bindestellen verteilen sich gleichmäßig auf Promotorregionen (37,4 %), Genregionen (36,2 %) und intergenische Bereiche des Genoms (26,5 %) (Abb. 4.1.12).



**Abbildung 4.1.11: Exemplarische Darstellung der überlappenden Bindestelle von HCFC1 und THAP1 am THAP1 Promotor**

Im UCSC Browser zeigen die CHIP-Seq Daten von ENCODE ein deutliches lokales Maximum (peak3802 und peak3923) der DNA-Bindung von THAP1 (K562 THAP1 V101 1 und V101 2) im Bereich des Minimalpromotors von *THAP1* und ebenso ein etwa 1000 bp überspannendes lokales Maximum für die DNA-Assoziation von HCFC1 (K562 HCFC1 IgR), dass das gesamte erste Exon von *THAP1* einschließt. Diese Bindestellen von THAP1 und HCFC1 überlappen im Bereich des THAP1 Promotors (blauer Kasten).



**Abbildung 4.1.12: Genom-weite *in-silico* Analyse der THAP1 und HCFC1 Bindestellen** (Nach Hollstein et al.)

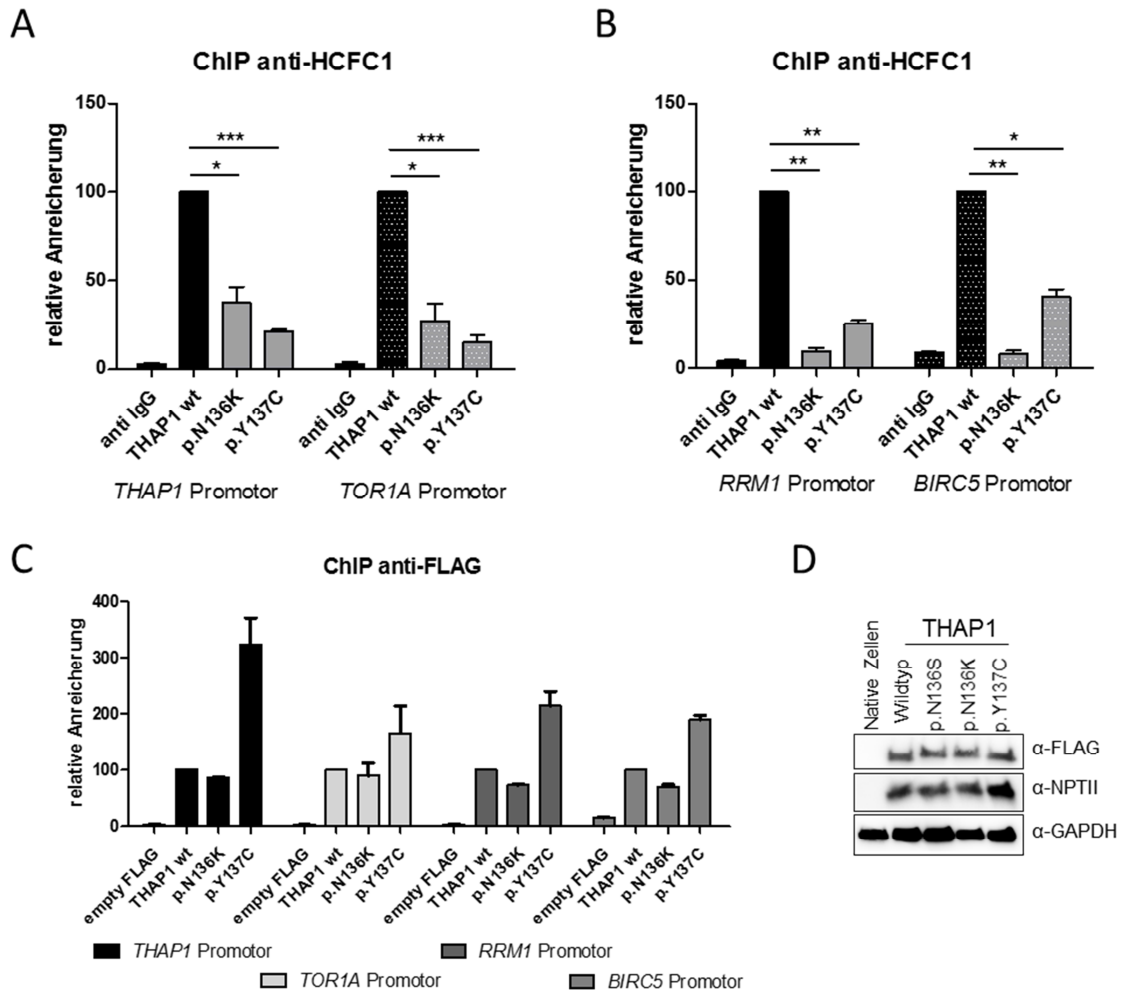
Die Mehrheit der THAP1 Bindestellen (96,2 %, schwarz) überlappt mit HCFC1 Bindestellen, davon sind 96,2 % als Promotor-Region definiert, 3,6 % als Gen-Körper und 3,8 % als intergenische Region (I). Von allen THAP1-Bindestellen im Genom überlappen nur 7,4 % (rot) nicht mit denen von HCFC1 (II). Von den Bindestellen, an denen THAP1 ohne HCFC1 bindet liegen 37,4 % in einer Promotor-Region, 36,3 % in einem Gen-Körper und 26,5 % in einer intergenischen Region (III).

#### 4.1.3.4 Dystonie-verursachende Mutationen inhibieren die THAP1 vermittelte Rekrutierung von HCFC1 zu Zielpromotoren

Während THAP1 über die N-terminale Zinkfingerdomäne spezifisch an DNA bindet, ist für HCFC1 keine eigene DNA-Bindung beschrieben. HCFC1 wird über die Interaktion mit anderen DNA-bindenden Proteinen an seine Zielsequenzen rekrutiert. Um zu untersuchen ob die drei aufgeführten Dystonie-verursachenden Mutationen, welche die Interaktion von THAP1 mit HCFC1 modulieren, einen direkten Einfluss auf die Rekrutierung von HCFC1 an THAP1-regulierte Promotoren haben, wurden quantitative ChIP-Analysen gegen HCFC1 und THAP1 durchgeführt.

Für diese ChIP-Analysen wurde Chromatin aus mit wildtyp oder mutierten THAP1 3xFLAG-Konstrukten transfizierten Zellen verwendet. Zur Untersuchung der THAP1-Bindung erfolgte eine Präzipitation mit Hilfe des anti-FLAG Antikörpers, HCFC1-Komplexe wurde durch einen HCFC1-Antikörper angereichert. Die genomischen DNA-Abschnitte der so anreicherten Regionen wurden aufgereinigt und mittels qPCR unter der Verwendung von spezifischen Primern und Sonden gegen verschiedene *THAP1*-Zielpromotoren analysiert.

Als Promotoren wurden die in Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe identifizierte von THAP1 reprimierte Gene *THAP1* und *TOR1A* ausgewählt [25, 26, 92]. Zusätzlich wurden mit *RRM1* und *BIRC5* zwei weitere, in Expressionsstudien identifizierte Zielgene ausgewählt, an denen THAP1 als Transkriptionsaktivator beschrieben wurde [55].



**Abbildung 4.1.13: THAP1-vermittelte Rekrutierung von HCFC1 an gemeinsame Zielpromotoren**

A-C) SH-SY5Y Zellen wurden transient mit wt oder mutanten THAP1 3xFLAG Expressionsplasmiden transformiert. Nach 24h wurden die Zellen geerntet und das Chromatin extrahiert und fragmentiert. Die quantitativen ChIP-Analysen wurden mit anti-HCFC1 Antikörper (A,B) und anti-FLAG Antikörper (C) durchgeführt. Als Kontrolle dienen mit FLAG-Leervektor transfizierte Zellen. Die Daten basieren auf dem Mittelwert und der Standardabweichung von Triplikaten. Die Ergebnisse stammen aus einem einzelnen Experiment, das repräsentativ für mindestens zwei unabhängige Experimente ist. Die Anreicherung der untersuchten Promotoren ist relativ zum Input, die wt THAP1 Probe wurde gleich 100 % gesetzt. Die qPCR-Analyse der ChIP-DNA wurde mit spezifischen Sonden und Primern für die Promotoren von *THAP1*, *TOR1A*, *RRM1* und *BIRC5* durchgeführt.

A+B) An allen untersuchten Promotoren führen beide THAP1 Mutanten p.N136K und p.Y137C zu einer signifikanten Verringerung der HCFC1-Bindung an die DNA von 10-40 % für p.N136K und 15-40 % für p.Y137C. Sternchen zeigen eine statistische Signifikanz im Vergleich zu wt THAP1 (\* =  $p < 0.05$ , \*\* =  $p < 0.01$ , \*\*\* =  $p < 0.001$ , ungepaarter T-Test). C) Die DNA-Bindung von THAP1 wird durch die beiden Mutationen in der HBM-Domäne an keinem der untersuchten Promotoren verschlechtert. Für p.Y137C wurde am *THAP1*-Promotor eine 3-fach höhere DNA-Bindung v, eine 1,5-fach erhöhte DNA-Bindung am *TOR1A* Promotor und eine doppelt so hohe DNA-Affinität an dem Promotoren von *RRM1* und *BIRC5* vergleichend zum wt THAP1 beobachtet. D) Lysate von transient mit wt oder mutantem THAP1 transfizierte SH-SY5Y Zellen wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und im Westernblot analysiert. Die Detektion mit einem anti-FLAG Antikörper zeigt eine gleichmäßige Expression der THAP1-Proteine. Die Expression von *NPTII* (anti-NPTII) und *GAPDH* wurde zur Kontrolle von Proteinkonzentration und Transfektionseffizienz detektiert. Native Zellen wurden als Negativkontrolle eingesetzt. Das gezeigte Ergebnis ist repräsentativ für drei unabhängige Experimente.

Diese quantitativen Analysen wurden in Zusammenarbeit mit Herrn cand. med. Lucas Kötter unter meiner Supervision durchgeführt. Zunächst wurde die Bindung von HCFC1 an die vier ausgewählten Promotoren untersucht. Dabei konnte eine Bindung von HCFC1 an allen vier Promotorregionen bestätigt werden. Das stärkste Signal ist dabei in den Zellen nachzuweisen, welche mit einem Wildtyp-THAP1-Konstrukt transfiziert wurden, wobei alle untersuchten Mutationen in THAP1 zu einer signifikanten Reduktion des Signals führten (Abbildung 4.1.13 A+B). Die Bindung von HCFC1 an alle vier Promotorregionen beträgt für THAP1 p.N136K im Vergleich zu wildtyp THAP1 nur 10-40 %, für THAP1 p.Y137C konnte ebenfalls nur eine HCFC1-DNA Bindung von 15-40 % gemessen werden. Um zu überprüfen ob die gezeigte Reduktion der HCFC1-Bindung durch eine abgeschwächte Bindung der mutierten THAP1-Proteine begründet werden kann oder ob diese Beobachtung auf die gestörte HCFC1-Interaktion mit THAP1 zurückzuführen ist, wurden quantitative ChIP-Analysen mit anti-FLAG M2 Antikörper durchgeführt. Dabei wurde die DNA-Bindung des Wildtyp-THAP1 und der verwendeten Konstrukte p.N136K und p.Y137C analysiert. Hier konnte gezeigt werden, dass sowohl Wildtyp-THAP1 als auch die beiden mutierten THAP1-Konstrukte keine reduzierte Bindung an die hier getesteten Promotoren zeigen. Für p.Y137C konnte sogar ein Anstieg der DNA-Affinität aufgezeigt werden (Abbildung 4.1.13 C). Eine gleichmäßige Expression aller THAP1-Konstrukte wurde ebenfalls mittels Westernblot nachgewiesen (Abbildung 4.1.13 D).



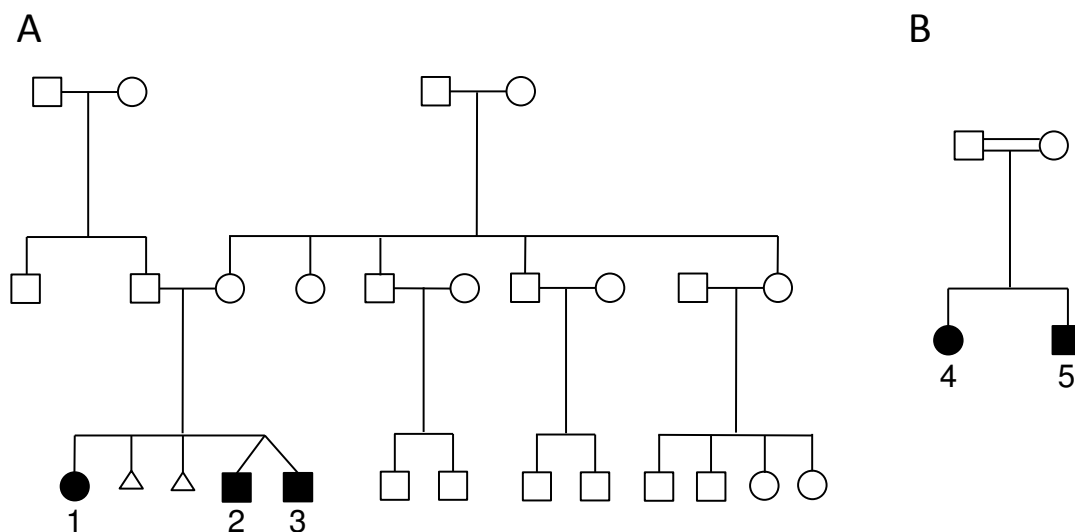
## 4.2 Mutationen im *HACE1*-Gen als Ursache für eine autosomal-rezessive neurologische Entwicklungsstörung

Im Rahmen einer *Whole-Exome-Sequencing* (WES) Studie wurden Geschwister mit einer neurologischen Entwicklungsstörung und auffälligem Gangbild untersucht. Es handelt sich um Kinder gesunder Eltern (Stammbaum siehe Abbildung 5.2.1 A), die alle eine moderate Intelligenzminderung, ein verwaschenes Sprachbild und ein sehr charakteristisches, breitbasiges, ataxisches Gangbild aufweisen. Die betroffenen Kinder entwickeln schon früh eine Hypotonie, zeigen eine generelle Beeinträchtigung der motorischen und psychischen sowie der sprachlichen Entwicklung. Einer der Patienten leidet an Epilepsie, sein Bruder zeigt ophthalmologische Auffälligkeiten wie Kurzsichtigkeit und Strabismus. Zwei der drei Kinder haben zusätzlich ein hypoplastisches Corpus Callosum und vergrößerte Ventrikel (Zusammenfassung der Symptome, siehe Tabelle 4.2).

In allen drei Betroffenen konnten compound heterozygote Mutationen in *HACE1* als die wahrscheinlich krankheitsursächlichen genetischen Varianten identifiziert werden.

- *HACE1*, c.2019\_2020insTTTAGGTATTTTATAGGTATT, p.P674Ffs\*5
- *HACE1*, c.2242C->T, p.R748\*

Während der Etablierungsphase der funktionellen Studien, wurde von Dr. David Bonthron (Section of Genetics, School of Medicine, University of Leeds) und Kollegen in einer Familie mit konsanguinem Hintergrund fünf weitere Patienten mit einer homozygoten *HACE1 Loss-of-Function* p.R219\* Variante identifiziert.



**Abbildung 4.2.1: Stammbäume *HACE1*-Defizienz**

A) Stammbaum der Familie A, die betroffenen Individuen wurden mit den Nummern 1-3 markiert.

B) Vereinfachter Stammbaum der Familie B, die betroffenen Individuen tragen die Nummern 4 und 5.

**Tabelle 4.1 Klinische Auffälligkeiten der Patienten von Familie A (nach Hollstein et. al)**

		Familie A		
Patient		1 (weiblich)	2 (männlich)	3 (männlich)
Schwangerschafts-woche bei Geburt		39	40	40
Geburtsgewicht (kg)		3.37 (normal)	3.4 (-0.9 SD)	3.2 (-1.5 SD)
Kopfumfang bei Geburt (cm)		33 (-1.2 SD)	34 (-1.8 SD)	34.5 (-1.1 SD)
Hypogenitalism		Nein	Nein	Nein
Untere Extremitäten				Bilateraler Spasmus
Obere Extremitäten		normal	Dystonische Haltung	normal
Epilepsie		Keine	Myoklone Krampfanfälle, Fokale Epilepsie	Keine
Aktuelle Entwicklung sdaten	Alter BMI OFC cm	10y 11m 24.8 kg/m <sup>2</sup> 54 (+0.5 SD)	7y 8m 21.17 kg/m <sup>2</sup> 53 (+0.2 SD)	7y 8m 19.32 kg/m <sup>2</sup> 53 (+0.2 SD)
Mobilität		Instabiles, wackelndes und breitbasiges Gangbild	Instabiles, wackelndes und breitbasiges Gangbild	Instabiles, wackelndes und breitbasiges Gangbild
Hörvermögen		Keine Auffälligkeit	Keine Auffälligkeit	Keine Auffälligkeit
Ophthalmologische Auffälligkeiten				Konvergenter Strabismus, bilaterale Myopie, Retina-dystrophie
Neurologische Untersuchungen CT= Computertomographie MRT= Magnetresonanztomographie EEG: Elektroenzephalografie		<b>MRT:</b> Hypoplastisches Corpus Callosum <b>EEG:</b> normal	<b>MRT:</b> Hypoplastisches Corpus Callosum <b>EEG:</b> übereinstimmend mit Myoklonus-epilepsie	<b>MTI:</b> vergrößerte Ventrikel <b>EEG:</b> normal
Skelett			Pes planus	Leichter Klumpfuß

Diese Patienten weisen einen ähnlichen, wenn auch deutlich schweren Phänotyp der Erkrankung auf. Zusätzlich zur Hypotonie zeigen die Patienten aus Leeds dystonische Krampfhaltungen, eine schwere Entwicklungsstörung ohne Sprachentwicklung und bilateralen Hörverlust, bei den männlichen Individuen liegt ein Hypogenitalismus vor. Bei allen Patienten bei denen eine Magnet-Resonanztomografie durchgeführt wurde, wurden zudem Veränderungen von Hirnstrukturen diagnostiziert, wie vergrößerte Ventrikel oder zerebrale Atrophie [120]. Nach Publikation der ersten beiden Familien wurden uns Daten einer weiteren Familie mit zwei *HACE1* Mutationsträgern von Professor Bernd Wollnik (Institut für Humangenetik, August Universität Göttingen) zugesendet. Bei den zwei Betroffenen einer türkischstämmigen Familie (Stammbaum siehe Abbildung 4.2.1 B) wurde eine homozygote *Nonsense*-Mutation p. R332\* in Exon 12 des *HACE1* Gens als Ursache für eine neurologische Entwicklungsstörung identifiziert.

## Das HACE1-Protein

Das Genprodukt HACE1 umfasst 909 Aminosäuren und ein berechnetes Molekulargewicht von circa 103 kDa. Das Protein ist hauptsächlich im Endoplasmatischen Retikulum und im Zytoplasma lokalisiert. Bisher sind für HACE1 zwei funktionelle Domänen beschrieben (schematische Darstellung siehe Abbildung 2.5.1): N-terminal weist das HACE1-Protein sechs Ankyrin-Wiederholungen auf (Aminosäuren 64-93; 97-126; 130-159; 163-192; 196-227; 228-257), welche Protein-Protein-Bindungen vermitteln, und es hat eine C-terminale katalytische HECT-Domäne (*Homologous to the E6-AP Carboxyl Terminus*; Aminosäure 572-909) [121].

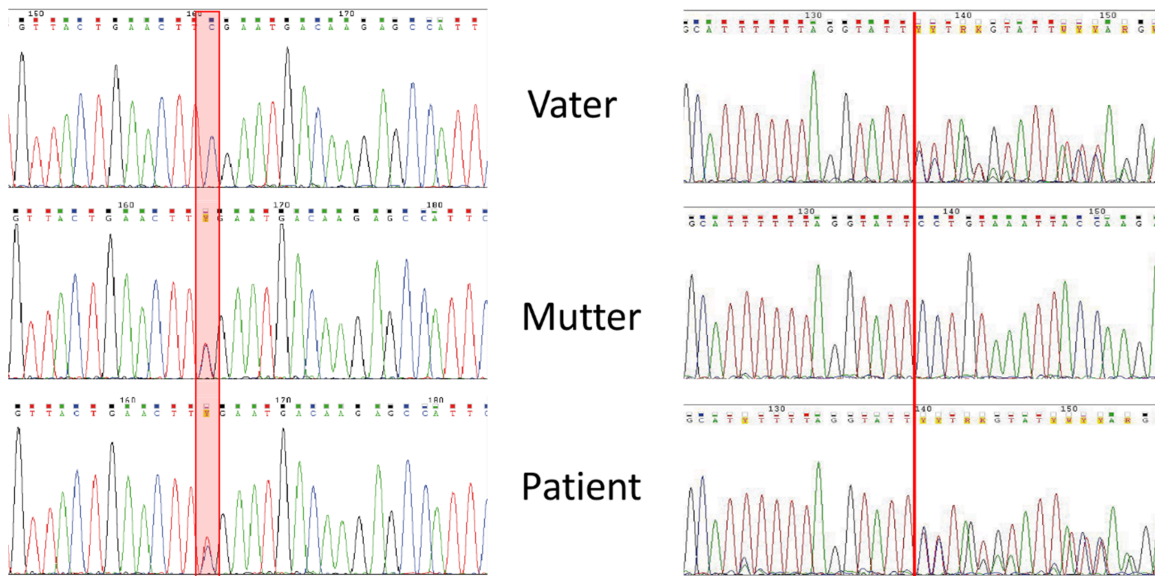


### **Abbildung 4.2.2: Schematische Darstellung des HACE1-Proteins mit den bekannten Mutationen**

Im N-Terminalen Bereich zwischen AS 64 und 257 liegen sechs Ankyrin-Wiederholungen. Die katalytische HECT-Domäne befindet sich am C-Terminalen Ende des Proteins von AS 525 bis 909.

#### **4.2.1 Verifikation der Mutationen mittels Sangersequenzierung**

Die Verifizierung der mittels Exom-Sequenzierung identifizierten Varianten erfolgte mittels Sangersequenzierung (siehe Abschnitt 3.2.4.8). Hierzu wurden sowohl die drei Patienten als auch die nicht-betroffenen Eltern der Familie A analysiert. Die Auswertung der Elektropherogramme ergab, dass die 20 bp große Insertion in Exon 19 von der Mutter vererbt wurde (Abbildung 4.2.3, rechte Spalte), während die *Nonsense*-Mutation in Exon 20 vom Vater stammt (Abbildung 4.2.3 linke Spalte). In den DNA Proben aller drei Patienten konnten beide Mutationen bestätigt werden. Um die im Genom nachgewiesenen Mutationen auch im *HACE1*-Transkript zu untersuchen, wurde aus Fibroblasten der Patienten RNA extrahiert und in cDNA umgeschrieben. Zur Inhibition einer möglichen Degradation der aberranten Transkripte durch *Nonsense-mediated mRNA Decay* (Nonsense-vermittelter Abbau der RNA) wurden die Zellen zusätzlich mit Cyclohexamid (CHX) behandelt. Mittels verschiedener Sets von Oligonukleotide wurden unterschiedliche Fragmente der von Mutationen betroffenen Exons des *HACE1*-Transkriptes amplifiziert (Abbildung 4.2.4 A). In der anschließenden Gelelektrophorese konnten neben den erwarteten PCR-Produkte zwei aberrante Amplifikationsprodukte identifiziert werden (Abbildung 4.2.4 B).



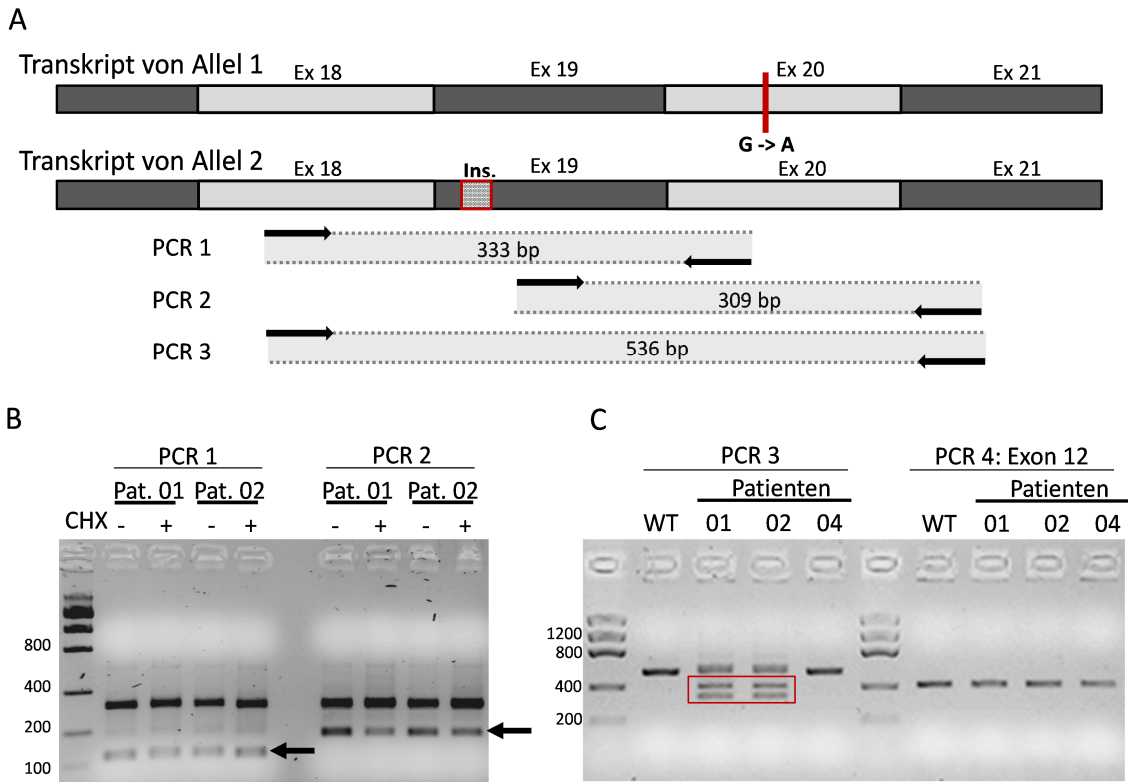
**Abbildung 4.2.3: Verifikation der WES-Daten mittels Sanger-Sequenzierung**

Elektropherogramme der Sanger-Sequenzierung von Exon 20 (links) und Exon 19 (rechts) von Vater, Mutter und Patient 1. Die *Nonsense*-Mutation in Exon 20 (rot hinterlegt) wurde von der Mutter vererbt, die 20 bp Insertion (Start: rote Linie) vom Vater.

Für die Oligonukleotide in den Exons 18 und 20 sollte das vorhergesagte PCR-Produkt 333 bp umfassen (PCR Strategie 1), für die Oligonukleotide in den Exons 19 und 21 wurde ein 309 bp großes Fragment erwartet (PCR Strategie 2). Zusätzlich wurden aber PCR-Produkte im Größenbereich von ca. 130 bp bzw. 200 bp detektiert (Abbildung 4.2.3 B, PCR 1 und 2, Pfeilmarkierung). Die PCR des beide „mutierten“ Exons überspannenden Fragments ergab neben dem erwarteten 536 bp großen Amplikon zwei zusätzliche, deutlich kleinere PCR-Produkte (siehe Abbildung 4.2.4 C, PCR 3, rote Markierung). Auch die mRNA von Patient 4 wurde auf die zusätzlichen Fragmente untersucht, hier konnte jedoch nur das erwartete, 536 bp große Fragment nachgewiesen werden. Als Kontrolle wurde schließlich noch eine PCR durchgeführt, die Exon 12 überspannt (Abbildung 4.2.3 C, PCR 4), in diesem Exon liegt die Mutation von Patient 4. Hier konnte für keinen der Patienten ein zusätzliches Amplifikat festgestellt werden.

Zur weiteren Charakterisierung der generierten PCR-Produkte, wurden diese aus dem Agarosegel ausgeschnitten, aufgereinigt und mittels Sangersequenzierung analysiert.

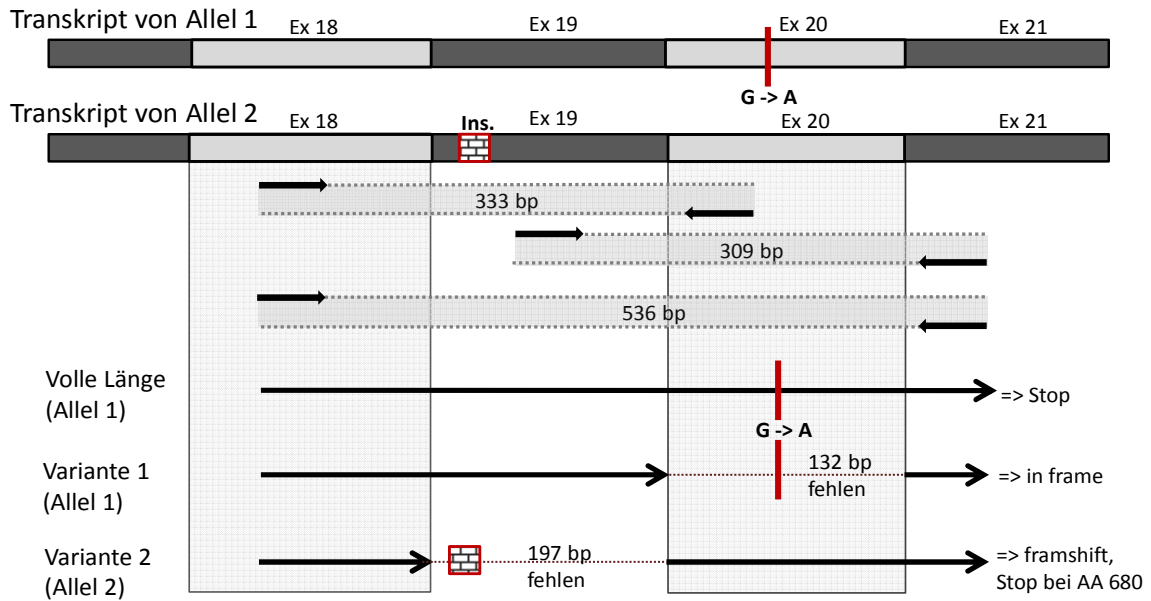
Die Sangersequenzierung der verschiedenen Fragmente konnte alle untersuchten PCR-Produkten eindeutig als Transkripte von *HACE1* identifizieren. Bei dem jeweils größten Fragment handelt es sich um das entsprechend der PCR-Strategie erwartete *HACE1*-Transkript. Die Sequenz-Analysen der zusätzlichen kleinen Fragmente haben gezeigt, dass es sich um aberrante Transkripte von *HACE1* handelt, in dem die codierende Sequenz des Exon 20 (Transkript von Allel 1) bzw. Exon 19 (Transkript von Allel 2) vollständig fehlt (siehe Abbildung



**Abbildung 4.2.4: Verifizierung der Mutationen auf RNA-Ebene**

A) Schematische Darstellung der erwarteten Transkripte der zwei mittels Sequenzierung identifizierten *HACE1*-Allele und der verwendeten PCR-Strategie. Das Allel 1 trägt die *Nonsense*-Mutation in Exon 20 und Allel 2 eine 20 bp Insertion in Exon 19. Die PCR-Strategie wurde so gewählt, dass die vorhergesagten Amplifikationsprodukte die jeweils „mutierten Exons“ der entsprechenden Transkripte überspannen (erwartetes Fragment in PCR 1, 333 bp; erwartetes Fragment in PCR 2, 309 bp) oder in anderer Kombination beide betroffenen Exons (erwartetes Fragment in PCR 3, 536 bp). B) Aus Fibroblastenkulturen von zwei Patienten wurde mRNA isoliert und mittels der PCR-Strategie PCR 1 und PCR 2 analysiert. Neben dem vorhergesagten Amplifikat wurden zwei weitere Fragmente nachgewiesen (Pfeilmarkierungen). C) PCR 3 wurde an cDNA Fibroblasten der Patienten 1, 2, 4 und einer gesunden Kontrollperson (WT) durchgeführt. In den Proben der Patienten 1 und 2 konnten zwei zusätzliche Amplifikationsprodukte (rote Markierung) nachgewiesen werden. Als Kontrolle wurde das Exon 12 mit entsprechenden Primern analysiert (PCR 4). Hier wurde in allen Proben nur ein einziges Fragment amplifiziert.

4.2.5). Auf der Grundlage der vorliegenden Transkriptanalysen konnte nachgewiesen werden, dass es durch beide exonischen Varianten zu einem alternativen Splicing der mRNA kommt, was zu einem Überspringen (*Skipping*) des jeweils „mutierten Exons“ führt. Der Verlust des Exon 20 führt innerhalb des aberranten Transkripts  $\Delta$ Ex20 führt zu keiner Verschiebung des Leserasters, so dass die Translation eines verkürzten HACE1-Proteins möglich ist. Der Verlust des Exon 19 hingegen führt zu einer Verschiebung des Leserasters, Veränderung der Aminosäuresequenz und einem vorzeitigen Translationsstopp nach Triplet 679.



**Abbildung 4.2.5: Mutationen in *HACE1* führen zu alternativen Transkripten**

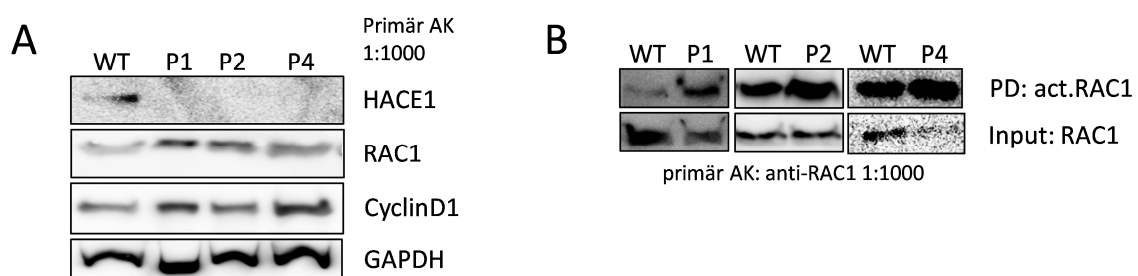
Schematische Darstellung der mutierten *HACE1* Allele mit Lokalisation der verwendeten Primer. Die Sequenzierung der PCR-Fragmente zeigte drei Transkripte: Ein Fragment mit der vollen Länge, das die *Nonsense*-Mutation trägt (Transkript von Allel 1), ein weiteres Transkript des Allel 1 mit der wt-Sequenz für Exon 19, in der das Exon 20 fehlt (Variante 1) und ein Transkript des Allel 2, das die wt-Sequenz für das Exon 20 trägt, aber in der das Exon 19 fehlt (Variante 2).

Der Verlust von Exon 20 verschiebt das Leseraster nicht, der Verlust von Exon 19 führt zu einem *frameshift* und einem vorzeitigen Translationsstopp bei Triplet 680.

## 4.2.2 Proteinstatus der Patienten

Bei den identifizierten Mutationen p.P674Ffs\*5 und p.R748\* der Familie A handelt es sich um postulierte Null-Allele, das heißt die aberranten Transkripte können nicht in ein aktives HACE1-Protein translatiert werden. Um dies zu überprüfen wurden Westernblotanalysen an Gesamtzelllysaten der Patientenfibroblasten durchgeführt. Zusätzlich zu den Fibroblasten von Familie A wurden Fibroblasten eines weiteren Patienten (Patient 4, Familie B) mit einer homozygoten *Nonsense*-Mutation c.994C>T, R332\* untersucht, die uns von Bernd Wollnik (Institut für Humangenetik, August Universität Göttingen) zur Verfügung gestellt wurden. Neben einem Antikörper gegen HACE1 und einem Antikörper gegen GAPDH als Ladekontrolle wurde mit RAC1 ein Protein analysiert, das als Zielproteine der HACE1-vermittelten Ubiquitinierung bekannt ist [122]. CyclinD1 ist ein nachfolgendes Zielprotein in einem von RAC1 regulierten Signalweg [123].

Die Westernblotanalysen ergaben ein deutliches Signal für HACE1 in Kontrollfibroblasten, während in keiner der Patientenproben HACE1 Protein detektiert werden konnte (Abbildung 4.2.5 A). Für RAC1 und Cyclin D1 wurde ein leichter Anstieg der Proteinmenge beobachtet. Da HACE1 spezifisch an eine aktive, GTP-gebundene Form des RAC1-Proteins bindet, wurden die Zellen zusätzlich auf eine erhöhte Menge an „aktivem RAC1“ getestet. Hierfür wurde das aktive RAC1 über an einer Matrix immobilisiertes *p21-binding domain* (PBD) der humanen *P21 activated protein kinase 1* (PAK1) gebunden und spezifisch angereichert. Im Westernblot zeigte sich eine deutliche Akkumulation von aktivem RAC1 in den Zellen von Patient 1, 2 und 4 im Vergleich zu den Fibroblasten gesunder Kontrollpersonen (Abbildung 4.2.5 B).



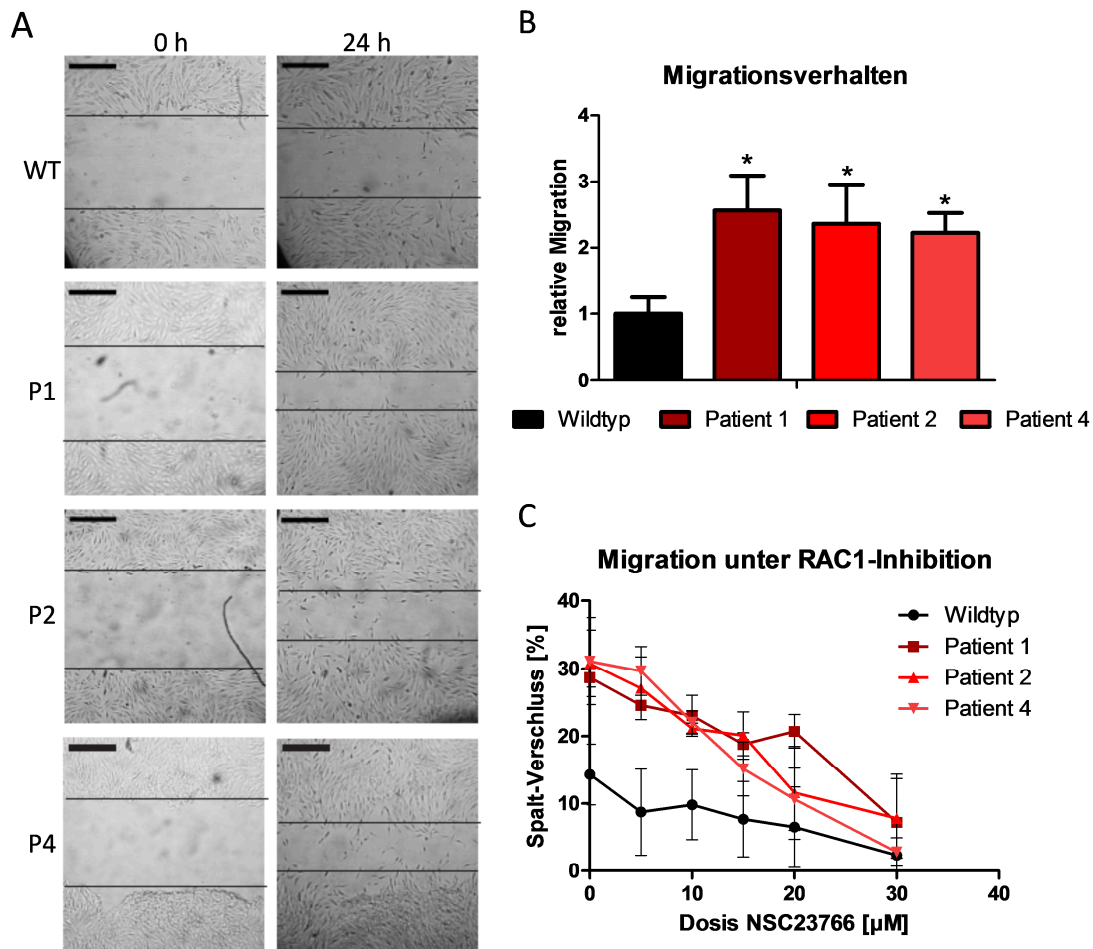
**Abbildung 4.2.5. Untersuchung der Proteinlevel in HACE1-defizienten Fibroblasten**

A) Westernblotanalyse an Proteinlysaten aus Fibroblasten der Patienten 1, 2, 4 und einer Kontrollperson. Nur in der wt Probe kann HACE1 Protein detektiert werden, aber in keiner der Patientenproben. Im Vergleich zur Kontrollperson zeigen alle drei Patienten einen leichten Anstieg an totalem RAC1 und Cyclin D1 Protein. GAPDH diente als Ladekontrolle. B) An den Lysaten wurde ein *Active RAC1 Pulldown Assay* (Thermo Fisher Scientific) nach Herstellerprotokoll durchgeführt. Ein Aliquot des Lysat („Input“) wurde als Ladekontrolle verwendet. Im Vergleich zur wt Kontrolle zeigen alle drei Patienten erhöhte Proteinmenge an aktivem RAC1. Die Abbildung zeigt ein repräsentatives Ergebnis aus drei unabhängigen Experimenten.

## 4.2.3 Funktionelle Konsequenzen der HACE1-Defizienz

### 4.2.3.1 Verändertes Migrationsverhalten durch aktives RAC1

Das wohl am besten charakterisierte Zielprotein der Ubiquitinligase HACE1 ist RAC1. RAC1 ist eine GTPase, die an der Regulation zahlreicher zellulärer Prozesse beteiligt ist. Unter anderem reguliert RAC1 über die Aktin-Filamente des Zytoskeletts die Zellmigration [121]. Da die Patienten mit HACE1-Defizienz verschiedene morphologische Auffälligkeiten des Gehirns aufweisen, wie vergrößerte Ventrikel, Gehirnatrophie oder ein hypoplastisches Corpus Callosum, wurden die Patienten-Fibroblasten mittels *Scratch-Assay* auf ihr Migrationsverhalten untersucht. Hierfür wurden die Zellen in definierter Zellzahl ausgesät und bis zur Konfluenz unter physiologischen Bedingungen kultiviert. In den Zellrasen wurde dann mit einer 1000 µl Pipettenspitze eine Wunde (*Scratch*) eingefügt und die Fläche der Wunde zum Zeitpunkt 0 h dokumentiert. Nach 24 h Inkubation im Brutschrank wurde die Fläche erneut dokumentiert und mit der Fläche des ersten Bildes verglichen. Der relative Wundverschluss wurde schließlich auf das Migrationsverhalten von Fibroblasten eines gesunden Spenders gleichen Alters normiert. Schon die Fotodokumentation des Wundverschlusses zeigt eine deutlich stärkere Migration der Patientenzelllinien 1, 2 und 4 im Vergleich zu Wildtyp-Fibroblasten als Kontrolle (Abbildung 4.2.6 A). Die quantitative Auswertung von vier Experimenten ergab, dass alle drei HACE1-defiziente Zelllinien eine 2 (Patient 4) bis 2,5-fach (Patient 1) höhere Migrationsrate haben als die Kontrollzellen (Abbildung 4.2.6 B). Um zu überprüfen ob diese erhöhte Migration tatsächlich auf eine Überaktivierung von RAC1 zurückzuführen ist, wurden das Experiment unter Zugabe des RAC1-Inhibitors NSC-23766 [124] durchgeführt. Hierfür wurden die Zellen unmittelbar nach dem Anbringen der Wunde mit 30 µM, 20 µM, 15 µM, 10 µM oder 5 µM NSC-23766 behandelt. Als Kontrolle wurden Zellen mit dem gleichen Volumen Wasser behandelt. Der Inhibitor verblieb für die ganze Versuchsdauer von 24 h auf den Zellen. Die Quantifizierung ergab eine dosisabhängige Verringerung des Migrationsverhaltens (Abbildung 4.2.6 C), bei einer Dosis von 15 µM (Patient 1 und 4) bzw. 20 µM (Patient 2) war der Unterschied zu den Zellen des gesunden Spenders nicht mehr signifikant, bei einer Dosis von 30 µM entsprach die Migration aller drei Patientenzelllinien der von unbehandelten Kontrollen. Für alle drei HACE1-defizienten Zelllinien wurde ohne Inhibitor ein Wundverschluss von ca. 30 % gemessen, bei den Kontrollzellen lag der Wundverschluss bei ca. 15 %. Nach 24 h Behandlung mit 30 µM RAC1-Inhibitor wurde für die Patientenzelllinien 1, 2 und 4 nur noch ein Wundverschluss von unter 10 % gemessen.



**Abbildung 4.2.6: Das Migrationsverhalten von Fibroblasten mit HACE1-Defizienz**

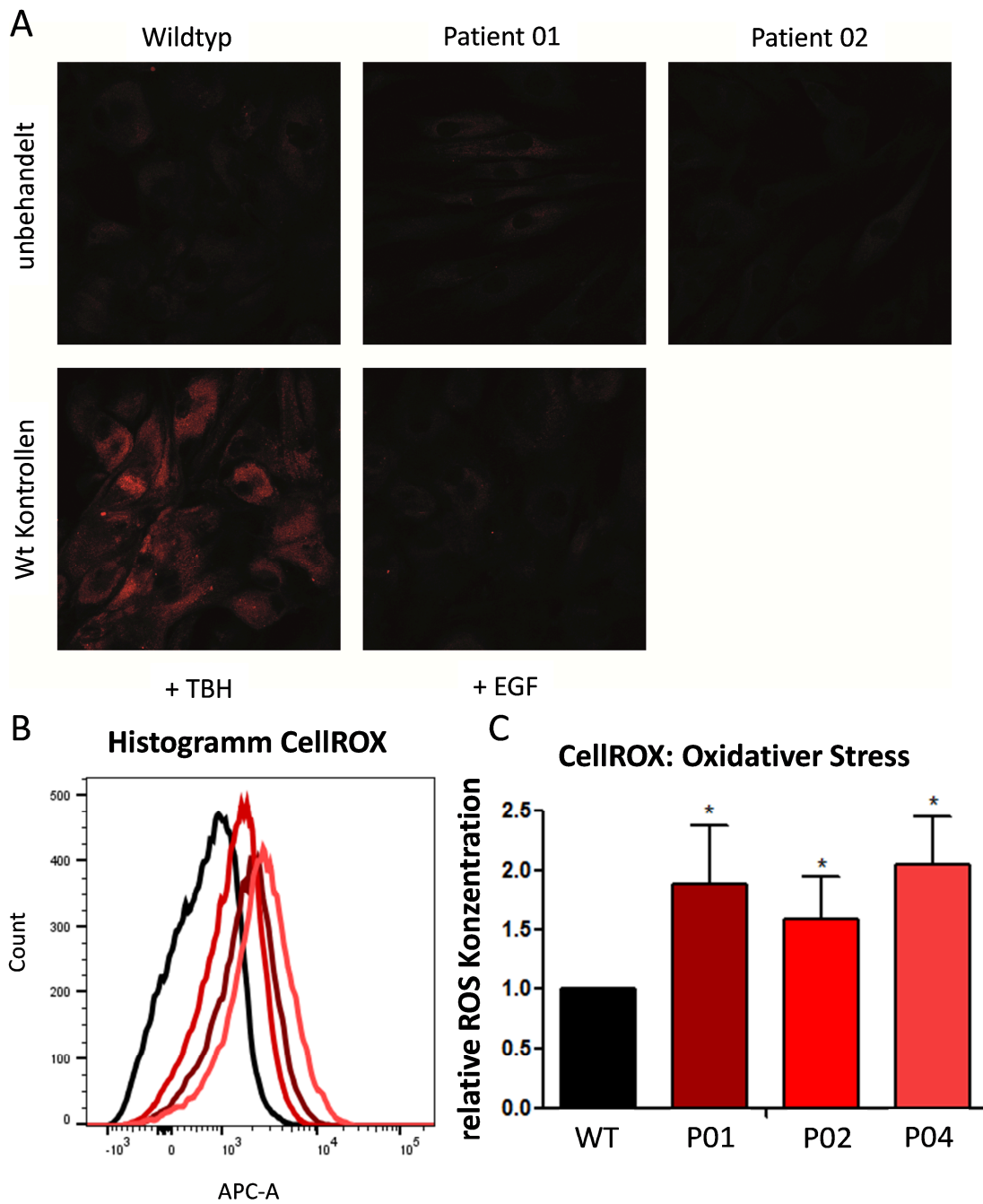
Fibroblasten von den Patienten 1, 2, 4 und einer gesunden Kontrollperson (WT) wurden in 24-well Platten ausgesät und bis zur Konfluenz inkubiert. Mit einer 1000  $\mu$ l Pipettenspitze wurde eine Wunde („scratch“) in den Zellrasen gekratzt. Die Fläche der Wunde wurde zu den Zeitpunkten 0h und 24h dokumentiert. A) Die Aufnahmen der Wunde zeigen, dass die Patientenfibroblasten einen größeren Teil des Spalts verschlossen haben als die Kontrollzellen. Messbalken 250  $\mu$ M B) Für die Quantifizierung wurde die Spaltgröße nach 24 h relativ zur Ausgangsgröße berechnet. Das Migrationsverhalten der Kontrollzellen wurde gleich 1 gesetzt. Es zeigt sich, dass alle drei Patientenfibroblastenlinien ein mehr als doppelt so hohes Migrationsverhalten im Vergleich zu den wt Zellen haben (KO vs. P1  $p=0.0082$ ; KO vs. P2  $p=0.0128$ ; KO vs. P4  $p=0.0098$ ;  $n=3$ ). C) Die Zellen wurden direkt nach Zufügen der Wunde mit 5, 10, 15, 20 oder 30  $\mu$ M des RAC1-Inhibitors NSC23766 behandelt. Mit steigender Dosis sinkt der Wundverschluss. (Signifikanz des Inhibitors, 0  $\mu$ M vs. 30  $\mu$ M: KO  $p=0.0357$ , P1  $p=0.0302$ , P2  $p=0.0062$ , P4  $p=0.0044$ ;  $n=3$ , One-way ANOVA). Durch den Einsatz des Inhibitors kann das Migrationsverhalten der Patientenzellen auf WT-Niveau gesenkt werden (Dosis für nicht signifikanten Unterschied zur Kontrolle,  $p<0.05$ : KO vs. P1 bei 0.15  $\mu$ M, KO vs. P2 bei 20  $\mu$ M, KO vs. P4 bei 15  $\mu$ M;  $n=3$ , One-way ANOVA).

#### 4.2.3.2 Überaktives RAC1 induziert eine Zunahme an oxidativem Stress

Verschiedene Vorarbeiten konnten zeigen, dass ein Verlust bzw. eine Inhibition der Ubiquitinligase HACE1 zu einem Anstieg der zellulären Konzentration von RAC1 führt, die eine Zunahme der reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) bewirkt [123].

In Kollaboration mit Frau Dr. Vanja Nagy (Ludwig Boltzmann Institute for Rare and Undiagnosed Diseases, Wien) konnten diese Ergebnisse auch in einem *Hace1-Knockout* Mausmodell verifiziert werden (persönliche Mitteilung Dr. Nagy). Mittels Dihydroethidium-Färbungen an Gehirnschnitten (DHE) von *Hace1 Knockout*-Mäusen wurden erhöhte Mengen an ROS nachgewiesen (Nagy et al., in Begutachtung).

Um zu überprüfen ob auch in den hier untersuchten Patientenzellen erhöhte ROS-Konzentrationen auftreten wurden Fibroblasten der Patienten und einer Kontrollperson mit dem Farbstoff CellROX® Deep Red von Thermo Fisher Scientific nach Herstellerprotokoll gefärbt. Dieser Farbstoff bindet an ROS und erlaubt auch eine quantitative Analyse des zellulären ROS-Levels. Als Positivkontrolle wurden Kontroll-Fibroblasten vor der Färbung für zwei Stunden mit 300 nM Tert-butyl hydroperoxide (TBH) behandelt. Für die Auswertung wurden die Zellen nach der Färbung mit 4 % Formaldehyd fixiert und direkt im Anschluss mit einem konfokalen Mikroskop betrachtet. Es konnte jedoch kein sichtbarer Unterschied zwischen den einzelnen Zelllinien festgestellt werden (Abbildung 4.2.7 A), nur die Positivkontrolle zeigt einen deutlich Anstieg von ROS im Vergleich zur den unbehandelten Proben. Zur weiteren Analyse wurden die mit CellROX® Deep Red gefärbte Fibroblasten mit dem Durchflusszytometer analysiert. Die durchflusszytometrische Messung ist sensitiver als die Auswertung am Mikroskop. Hierfür wurden  $2 \times 10^6$  Zellen in 10 cm Petrischalen ausgesät und nach 48 h bei einer Konfluenz von ca. 60-70 % nach Herstellerangaben für 45 min mit CellROX® Deep Red gefärbt, anschließend mit Trypsin abgelöst und zweimal mit 1 ml PBS gewaschen. Für die Messung im LSRII wurden die gefärbten Zellen in PBS resuspendiert. Pro Experiment und Probe wurden 50.000 Zellen mit dem APC-Filter gemessen. Die quantitative Auswertung erfolgte nach der Dubletten-Diskriminierung anhand des Medians des Histogramms der Intensität des APC-Signals. Bereits in der Darstellung des Histogramms der einzelnen Proben zeigt sich ein deutlicher Anstieg des Signals in den Patienten-Zellen im Vergleich zu den Fibroblasten des gesunden Donors (Abbildung 4.2.7 B). Die quantitative Auswertung von mindestens vier unabhängigen Experimenten pro Zelllinie zeigt einen signifikanten Anstieg der ROS Level in den Fibroblasten von Patient 1 um das 1,8-fache, für Patient 2 um das 1,5-fache und für Patient 4 um das 2-fache (Abbildung 4.2.7 C).



**Abbildung 4.2.7: Erhöhter oxidativer Stress in HACE1-defizienten Patientenzellen**

Für die Detektion von ROS wurde der Farbstoff CellROX® Deep Red von Thermo Fisher Scientific nach Herstellerprotokoll verwendet. Als Positivkontrolle wurden Fibroblasten einer gesunden Kontrollperson mit 300 nM TBH behandelt. A) Die mit TBH behandelten Zellen zeigen eine deutliche Färbung, während in den anderen Proben kein Signal detektiert werden konnte. B+C) Für die durchflusszytometrische Analyse wurden die mit CellROX® Deep Red gefärbten Fibroblasten mit Trypsin abgelöst, dreimal in PBS gewaschen und in PBS resuspendiert. Das Histogramm (B) zeigt ein stärkeres ROS-Signal in den Patientenzellen (rot) als in den Kontrollzellen (WT, schwarz). Die Quantifizierung zeigt einen signifikanten Anstieg auf das 1,5-fache (Patient 2) bzw. 2-fache (Patient 1 und 3) ROS-Level in den Patientenzellen im Vergleich zu den Kontrollzellen ( $p < 0.05$ ; Kontrolle, Patient1, Patient2  $n = 7$ , Patient4  $n = 3$ , One-way ANOVA).

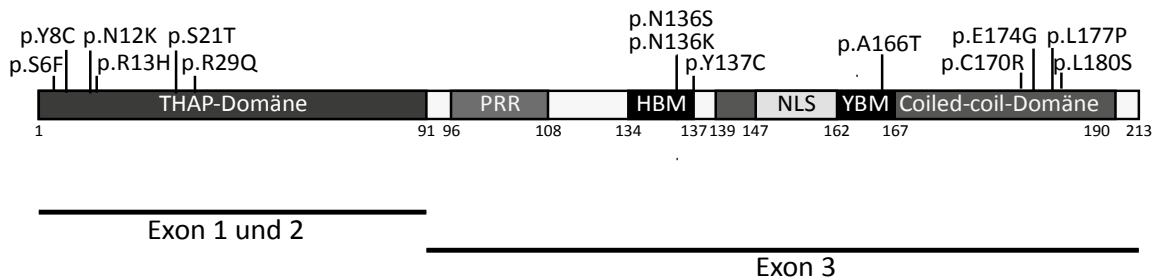


## 5 Diskussion

### 5.1 THAP1 und Dystonie

Nachdem Mutationen im *THAP1*-Gen im Jahr 2009 als genetische Ursache für Dystonie identifiziert wurden [39], konnten bisher mehr als 100 verschiedene *THAP1*-Mutationen in Dystonie Patienten identifiziert werden [7, 38, 107]. Diese Varianten umfassen die verschiedensten Mutationstypen, darunter kleine Deletionen und Insertionen, sowieso *Nonsense*- und *Missense*-Varianten die sich über das ganze Gen verteilen. Insbesondere *Missense*-Mutationen, die zu einem Austausch spezifischer Aminosäuren innerhalb des THAP1-Proteins führen, können zur Charakterisierung der Proteinfunktion verwendet werden. Der Austausch einzelner Aminosäuren muss nicht zwangsläufig zu seinem vollständigen Funktionsverlust des Proteins führen [125]. In dieser Arbeit wurden die funktionellen Konsequenzen verschiedener Mutationen innerhalb verschiedener Domänen von THAP1 untersucht (siehe Abb. 5.5.1).

Etwa ein Drittel aller bisher beschriebenen Mutationen sind *Missense*-Mutationen innerhalb der N-terminalen THAP-Domäne. Funktionelle Studien der THAP-Domänen innerhalb von THAP1 und anderen THAP-Proteinen zeigen eine DNA-Affinität der THAP-Domäne [58, 60]. Eine zentrale Fragestellung für ein besseres Verständnis der pathophysiologischen Relevanz des Transkriptionsfaktors THAP1 bzw. genetischer Varianten in *THAP1* für DYT-THAP1 ist die Identifizierung neuer Zielgene von THAP1 und die Funktion der THAP-Domäne.



**Abbildung 5.1.1:** Schematische Darstellung von THAP1 mit den in dieser Arbeit untersuchten Mutationen

### 5.1.1 Die Funktionen der THAP-Domäne 1: Autoregulation

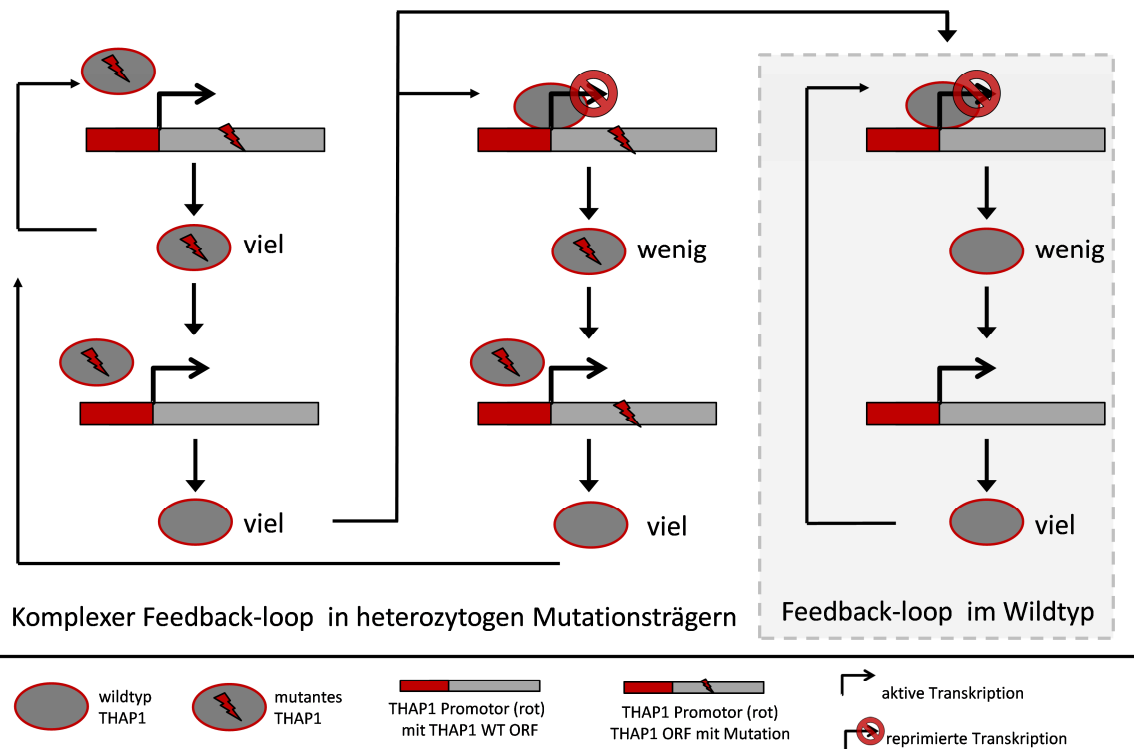
Bereits im Jahr 2007 durchgeführte Expressionsanalysen in retroviral transduzierten Epithelzellen mit ektopisch exprimiertem *THAP1* deuteten auf eine THAP1-bedingte Repression des endogenen THAP1-Gens hin [55]. In den im Rahmen meiner Doktorarbeit durchgeführten Analysen konnte durch die Überexpression eines plasmidcodierten THAP1-Konstruktes ebenfalls eine Repression des endogenen *THAP1*-Genproduktes in transient transfizierten HEK293-Zellen induziert werden. THAP1 reprimiert also seinen eigenen Promotor. Bereits in Luciferase-Reportergen-Studien von Frau Dr. Richter konnte gezeigt werden, dass ein über den *THAP1*-Minimalpromotor reguliertes Reportergen reprimiert wird, wenn THAP1 ektopisch überexprimiert wird. Hierfür wurde der *THAP1*-Minimalpromotor in ein Plasmid mit einem Luciferase-Reportergen eingefügt, so dass die Expression vom ektopisch überexprimiertem THAP1 unterschieden werden konnte. Diese THAP1-vermittelte Repression wird durch verschiedene untersuchte DYT-THAP1 assoziierte Mutationen verändert, allerdings nur durch Mutationen innerhalb der DNA-bindenden THAP-Domäne. Mutationen innerhalb der C-terminalen *Coiled-Coil*-Domäne hatten keinen Einfluss auf die transkriptionelle Repression. Diese Ergebnisse konnten zusätzlich in Patientenzellen bestätigt werden.

In Zusammenarbeit mit dem Institut für Neurogenetik wurden Expressionsstudien in aus iPS- (*induced pluripotent stem cells*)-Zellen generierten Neuronen von Patienten durchgeführt, welche die in den im Zellmodell bzw. *in vitro* durchgeführten Experimenten gewonnenen Erkenntnisse unterstützen [92]. Hierfür wurde in Zellen von zwei DYT-THAP1 Patienten im Vergleich zu Zellen von gesunden Spendern auf RNA-Ebene eine signifikant erhöhte Expression des endogenen *THAP1*-Transkriptes gemessen. Die beiden untersuchten Mutationen betreffen zum einen die THAP-Domäne (p.R13H) und zum anderen wird das Kernlokalisationsignal gestört (p.K158Nfs\*23). Für letztere konnte bereits gezeigt werden, dass die Mutation den Kern-Import des mutierten THAP1 stört [64]. Beide Mutationen führen zu einer verminderten Aktivität von THAP1 als Repressor der *THAP1*-Expression, so dass die Expression des *THAP1*-Gens hochreguliert wird. In den Zellen mit der *Frameshift*-Mutation wurde *THAP1* zudem deutlich stärker exprimiert als in den Zellen mit *Missense*-Mutation. Dies lässt sich dadurch erklären, dass ein Verlust des Kern-Lokalisationssignals zu einem vollständigen Verlust der Transkriptionsfaktor-Aktivität führt, während die *Missense*-Mutationen in den ChIP-Analysen noch eine DNA-Bindung von etwa 60 % aufweist.

Nach der Identifizierung und funktionellen Eingrenzung des *THAP1*-Minimalpromotors wurden im Rahmen dieser Arbeit zusätzlich ChIP-Analysen durchgeführt um zu zeigen, dass THAP1 tatsächlich direkt an den Promotor bindet.

Sowohl für ektopisch exprimiertes THAP1 3XFLAG als auch für natives THAP1 konnte die Bindung an den *THAP1*-Promotor nachgewiesen werden. Um die funktionelle Relevanz verschiedener Dystonie-verursachender Mutationen in *THAP1* auf die DNA-Bindung des THAP1-Proteins zu untersuchen, wurden quantitative ChIP-Experimente mit wildtyp und mutanten THAP1 3XFLAG Konstrukten durchgeführt. Dabei konnte gezeigt werden, dass die durch DYT6-ursächliche *Missense*-Mutationen bedingten Substitutionen der Aminosäuren p.S6F, p.R13H, p.S21T und p.R29Q innerhalb der DNA-bindenden THAP-Domäne die spezifische Bindung von THAP1 stark vermindern. Ähnliche Ergebnisse zur Analyse der THAP1-vermittelten Repression konnten innerhalb unserer Arbeitsgruppe bereits zuvor für den *TOR1A*-Promotor ermittelt werden [25]. Hier konnte mittels Reportergen-Analysen gezeigt werden, dass THAP1 die Expression des DYT1- bzw-*TOR1A* Gens reprimiert und dass DYT-*THAP1* assoziierte Mutationen innerhalb der THAP-Domäne diese Repression stören. Die in dieser Arbeit aufgeführten Experimente belegen somit eine durch THAP1 selbst vermittelte *THAP1*-Expressionskontrolle. Heterozygote genetische Varianten, die zu einer Einschränkung bzw. einem Verlust der Aktivität von THAP1 als Transkriptionsfaktor führen, können über diesen *Feedback-Loop* also zumindest teilweise kompensiert werden, indem sie zu einem generellen Anstieg der Expression des *THAP1*-Gens führen und insgesamt mehr THAP1 vorliegt (siehe Abbildung 5.1). In Eukaryoten ist eine solche Autoregulation ein bekanntes Phänomen und spielt eine wichtige Rolle bei der Aufrechterhaltung der zellulären Homöostase von Transkriptionsfaktoren [126, 127]. Störungen innerhalb dieser dosissensitiven Mechanismen können zu einer Destabilisierung von regulatorischen Kreisläufen innerhalb der Zelle führen, was zum Beispiel zu Erkrankungen wie dem Down Syndrom führt, verursacht durch eine Trisomie von Chromosom 21 [128]. DYT-*THAP1* wird durch heterozygote Mutationen im *THAP1*-Gen verursacht. Ohne ein Autofeedback wäre anzunehmen, dass die Mutationsträger nur 50 % funktionales THAP1 Protein hätten. Doch die Daten aus den aus iPS-Zellen generierten Neuronen zeigen, dass die relative Expression von *THAP1* in heterozygoten Mutationsträgern durch einen Verlust oder eine Verschlechterung der Repressorfunktion durch den autoregulatorischen Feedback-Loop bei 150-190 % liegt, im Vergleich zu Individuen mit zwei „wildtyp Allelen“ [92]. Geht man davon aus, dass es sich bei der Hälfte des synthetisierten Proteins um wildtyp THAP1 handelt, liegt der Anteil an funktionierendem THAP1 schließlich bei 75-95 %. Die Autoregulation führt also dazu, dass das Fehlen von funktionellem THAP1 durch eine höhere Expression zumindest teilweise ausgeglichen werden kann.

Allerdings beziehen sich die Daten der hier vorliegenden Expressionsstudien auf lediglich zwei Zelllinien mit unterschiedlichen Dystonie-verursachende *THAP1*-Mutationen.



**Abbildung 5.1.2: Modell der THAP1-Autoregulation in Trägern heterozygoter Mutationen** (Abbildung nach Erogullari et al.) Der Feedback-Loop in gesunden Personen ist in der grauen Box dargestellt (rechts). Wenn THAP1 an den eigenen Promotor bindet wird die Expression reprimiert, so dass die Menge an THAP1 Protein in der Zelle zinkt. Dies führt dazu, dass seltener THAP1 an den Promotor bindet, so dass die Expression wieder steigt. In heterozygoten Mutationsträgern ist dieser Feedback-Loop wesentlich komplexer. Mutantes THAP1 kann nicht an den Promotor binden, es kommt zu einer vermehrten Expression beider Allele (linkes Feld). Nur wildtyp THAP1 ist in der Lage die Expression zu reprimieren, sowohl am mutierten Gen (mittleres Feld) als auch an den wildtyp Promotor (rechtes Feld). Diese reprimierte Expression führt wiederum zu weniger THAP1 in den Zellen, gefolgt von einem Anstieg der Expression.

Ungeklärt ist bisher, ob und zu welchem Maß eine erhöhte Menge des *THAP1*-Transkriptlevels zu einem Anstieg des funktionellen THAP1-Proteins führt. Zusätzlich betrifft die DNA-Affinität nur einen Teil der bisher beschriebenen THAP1-Mutationen, die anderen DYT-THAP1 assoziierten Mutationen können zwar durchaus einen Einfluss auf die Transkriptionsregulation von THAP1 haben, allerdings über einen anderen Mechanismus wie etwa Protein-Protein-Interaktionen. Bisher liegen noch keine belastbaren funktionellen Daten vor, die aufzeigen, ob verschiedenen Mutationen in *THAP1* eventuell nur für die Aktivität von THAP1 bei der Regulation bestimmter Zielgene von besonderer Relevanz sind. So konnte in einer Studie von Daniel Ibrahim und Kollegen durch ChIP-Seq-Analysen nachgewiesen werden, dass Mutationen in dem Transkriptionsfaktor HOXD13 dazu führen, dass das Protein an völlig anderen Stellen im Genom bindet und andere Gene reguliert [129]. Ähnliche Effekte sind durchaus auch für THAP1 denkbar. Zusätzlich ist bekannt, dass bestimmte *THAP1*-Mutationen keine Reduktion der DNA-Bindung bewirken [125]. Hier ist es möglich, dass mutantes THAP1 Protein mit

wildtyp THAP1 um die Bindestellen konkurriert und so die Bindestellen für wildtyp THAP1 blockiert werden bzw. es zwar zu einer DNA-Bindung kommt, aber die Rekrutierung spezifischer Kofaktoren nicht mehr möglich ist, da Bindemotive durch Mutation verändert sind. Des Weiteren ist bekannt, dass es auch Mutationen gibt, die zu einer Instabilität und einer proteosomalen Degradation des Proteins führen [92, 125], es kann also auch mit der Zeit zu einer Aggregation von mutanten THAP1-Proteinen kommen welche die Homöostase der Zelle aus dem Gleichgewicht bringen.

Um verschiedene Mutationen nicht nur innerhalb der THAP-Domäne im Hinblick auf Expressionsrepression und endogene THAP1-Expression zu untersuchen wäre eine Option, die Mutationen mittels CRISPR/Cas9 heterozygot in eine etablierte neuronale Zelllinie einzubringen. Im Vergleich zu aus Patientenzellen generierte Neuronen hätte ein solcher Versuchsaufbau den Vorteil, dass alle Zelllinien den gleichen genetischen Hintergrund hätten und so die mutations-tragenden Zellen besser mit den wildtyp-Zellen und anderen Mutationen vergleichbar wären.

Untersuchungen der neuronalen *THAP1*-Expression in kranken und gesunden Mutations-trägern sowie ein Vergleich der *THAP1*-Expression, Erkrankungsalter und schwere der Symptome könnten allerdings Hinweise darauf liefern, ob die erhöhte *THAP1*-Expression aufrechterhalten werden kann und ob das unterschreiten eines Schwellenwertes von funktionellem THAP1-Protein die Erkrankung begünstigt. Allerdings wäre eine solche Studie stark abhängig von der Verfügbarkeit des Patientenmaterials.

Zusätzlich könnten in Expressionsstudien von THAP1-Zielgenen an Patienten-Material sowie an mittels CRISPR/Cas9 hergestellten Zelllinien mit heterozygoten *THAP1*-Mutationen eine nur geringfügig veränderte Menge von wildtyp-THAP1 eine Ursache dafür sein, dass die Expression der Zielgene nur sehr geringfügig verändert wird und je nach verwendeter Methode nur schwer zwischen natürlicher Variation von Expressionsleveln und pathophysiologisch relevanten Veränderungen unterschieden werden kann. Der Mechanismus der Autoregulation kann die THAP1-vermittelte Transkriptionsregulation auch in heterozygoten Mutationsträgern stabilisieren.



### 5.1.2 Die Funktionen der THAP-Domäne 2: HDAC3 als Kofaktor von THAP1

Etwa ein Drittel der DYT-THAP1 assoziierten Mutationen liegt innerhalb der THAP-Domäne, doch nicht alle diese Mutationen betreffen die DNA-Affinität von THAP1. Abhängig von ihrer spezifischen Funktion interagieren Transkriptionsfaktoren in Komplexen mit Kofaktoren, wie beispielsweise Histon-modifizierenden Proteinen und anderen Proteinen mit transkriptionsregulatorischen Eigenschaften. Die Zusammensetzung dieser Regulationskomplexe ist hochdynamisch und spezifisch für verschiedene Gewebetypen, Funktionen sowie verschiedene Stadien der Embryonalentwicklung. Daher wurde die Hypothese aufgestellt, dass diese Mutationen die Protein-Bindung von THAP1 an andere regulatorische Proteine verändert. Innerhalb dieser regulatorischen Multi-Proteinkomplexe finden sich häufig Proteine, die direkte katalytische Funktionen auf die lokale Chromatinstruktur haben. In Komplexen mit einer reprimierenden Funktion auf die Genaktivität kommen sehr häufig Histondeacetylasen vor. Ein Interaktionspartner von THAP7 und dem murinen THAP-Protein Ronin ist die Histondeacetylase 3 (HDAC3) [130, 131].

THAP1 hat als Transkriptionsfaktor sowohl eine reprimierende als auch eine aktivierende Funktion, welche Interaktionspartner für diese unterschiedlichen Funktionen entscheidend sind ist bisher nicht bekannt. In *GST-Pulldown*-Analysen und Hefe-2-Hybrid-Interaktionsstudien konnte von unserer Arbeitsgruppe bereits eine Interaktion zwischen THAP1 und HDAC3 nachgewiesen werden. Die THAP-Domäne wurde als essentiell für die Protein-Protein-Interaktion identifiziert. *In silico* und *in vivo* Studien zeigen, dass einige der DYT-THAP1 verursachende Mutationen, die direkte Auswirkungen auf die THAP-Domäne haben, deren DNA-Bindeaffinität verändern [25, 92, 125]. Jedoch zeigen manche Mutationen keine Veränderungen der DNA-Bindung. Hierzu zählen die Mutationen p.Y8C und p.N12K [125]. Im Rahmen meiner Doktorarbeit sollte geklärt werden, ob diese und andere Mutationen die Protein-Protein-Interaktion von THAP1 und HDAC3 in irgendeiner Weise beeinflussen. Um dies zu untersuchen wurden verschiedene THAP1 *Missense*-Mutationen in Hefe-2-Hybrid-Interaktionsstudien und GST-Pulldown-Assays auf ihre Bindeeigenschaft mit HDAC3 getestet. Hierzu wurden die Mutationen p.Y8C und p.N12K, die laut Campagne und Kollegen keine veränderte DNA-Bindung zeigten, eine Mutation p.S6F, die in der THAP-Domäne lokalisiert ist und eine veränderte DNA-Bindung zeigt, sowie eine in der *Coiled-Coiled*-Domäne lokalisierte Mutation p.C170R ausgewählt. Für keine der untersuchten DYT-THAP1 verursachenden Mutationen konnte allerdings mit keiner der verwendeten Methoden ein Effekt auf die Protein-Protein-Interaktion beobachtet werden. Allerdings ist zu beachten, dass die verwendeten Methoden aufgrund von mangelnder Sensitivität ein hohes Maß an falschpositiven Befunden aufweisen. Die experimentellen Bedingungen sind nicht

physiologisch und durch die Verwendung von sehr großen Mengen an zu analysierenden Proteinen sehr artifiziell. Durch das massive „Überangebot“ des Interaktionspartners kann es trotz einer Mutation, welche die Protein-Protein-Interaktion geringfügig schwächt, trotzdem zu einem deutlich positiven Signal kommen. Der Effekt der Mutationen auf die Protein-Bindung kann so gering sein, dass er nicht messbar ist. Zusätzlich kann weder in Hefe-2-Hybrid-Studien noch in GST-Pulldown-Analysen die Bindeaffinität zweier Interaktionspartner eindeutig quantifiziert werden. Und selbst wenn die Mutationen unter physiologischen Bedingungen nur einen geringen Effekt aufweisen, kann es sein, dass es nur durch eine stetige Akkumulation dieser Fehlfunktion im Organismus über einen längeren Zeitraum zum Ausbilden der ersten Dystonie-Symptome kommt. Zusätzlich ist das menschliche Genom, insbesondere in den nicht-codierenden Bereichen, extrem variabel. THAP1 interagiert über Kofaktoren nicht nur mit den Zielpromotoren, sondern auch mit *cis*-regulatorischen Elementen in diesen Bereichen. Varianten in THAP1-assoziierten *Enhancern* oder *Silencern* können einen starken Einfluss auf die Funktion von THAP1 haben. Beeinflusst durch solche genomischen Varianten der einzelnen Mutationsträger kann eine geringfügige Veränderung der THAP1-Funktion bei gleicher Mutation eine Erklärung für die reduzierte Penetranz der Erkrankung sein.

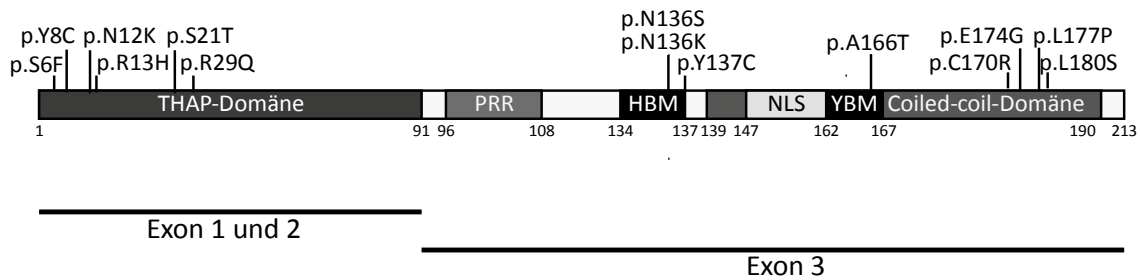
Ebenso ist es möglich, dass die untersuchten Mutationen tatsächlich keinen Einfluss auf die Bindung zu HDAC3 haben, sondern eher die Affinität zu einem anderen, vielleicht noch unbekanntem Bindepartner von THAP1 verändern. Zusätzlich sollten die Protein-Protein-Interaktion der THAP1 Mutanten und HDAC3 mit anderen, sensitiveren und weniger artifiziellen Methoden untersucht werden, wie zum Beispiel einer Immunpräzipitation von nativem HDAC3 und ektopisch exprimierten, mit einem FLAG-Tag markierten THAP1-Konstrukten oder sogar in mittels CRISPR/Cas9 veränderten Zelllinien, die homozygot für die jeweilige Mutation sind, so dass Interaktionsstudien an nativen Proteinen durchgeführt werden können.

Um die Interaktion zwischen THAP1 und HDAC3 weiter zu charakterisieren, wurde siRNA zum spezifischen *knock-down* von HDAC3 etabliert. An isoliertem Chromatin der mit HDAC3 siRNA transfizierten SH-SY5Y Zellen wurden quantitative ChIP Analysen mit einem Antikörper gegen acetyliertes Histon H3 durchgeführt. Die Acetylierung von Histon H3 an Lysin 27 (H3K27Ac) ist eine epigenetische Markierung für eine aktive genomische Region [132, 133], die durch Histondeacetylasen entfernt wird. Tatsächlich konnte in den mit HDAC3 siRNA transfizierten Zellen eine mehr als doppelt so hohe Acetylierung innerhalb des *THAP1*-Promotors gemessen werden wie in den mit kontroll-siRNA transfizierten Zellen. Dies deutet darauf hin, dass HDAC3 den *THAP1*-Promotor deacetyliert und so zusammen mit THAP1 an der Repression des Promotors beteiligt ist.

Interessanterweise wurde für THAP7 ein sehr ähnlicher Repressorkomplex zusammen mit HDAC3 und NCoR (*Nuclear hormone receptor corepressor*) beschrieben [130]. Eine eventuelle Beteiligung von NCoR an der THAP1-vermittelten Repression wurde bisher noch nicht beschrieben und Gegenstand derzeit laufender Analysen.



### 5.1.3 „Die goldene Mitte:“ THAP1 und das HCFC1-Binde-Motiv



**Abbildung 5.1.3: Schematische Darstellung von THAP1 mit den in dieser Arbeit untersuchten Mutationen**

Zwischen der N-terminalen THAP-Domäne und der C-terminalen Coiled-Coil-Domäne ist das nur vier Aminosäuren umfassende Host-cell-factor1-(HCFC1)-*Binding-Motif* (HBM) lokalisiert. In früheren Studien wurde bereits beschrieben, dass HCFC1 mit allen THAP-Proteinen außer THAP8 und THAP10 regulatorische Proteinkomplexe bildet [134, 135]. Interessanterweise liegen drei Dystonie-assoziierte Mutationen innerhalb dieses kurzen Bindemotivs. Das HBM kommt nicht nur in fast allen Mitgliedern der THAP-Familie vor, sondern ist auch evolutionär hoch konserviert.

HCFC1 ist ein wichtiger transkriptioneller Kofaktor [134, 136–138] und wird als Vorläuferprotein exprimiert, welches an sechs spezifischen Bruchpunkten proteolytisch aufgespalten wird [139–141]. Aus der N-terminalen Kette und der C-terminalen Kette entsteht ein nicht-kovalent gebundener Komplex mit mehreren funktionellen Domänen. Während die C-terminale Kette ein Kernlokalisierungssignal, ein Fibronectin-ähnliches Motiv sowie eine transkriptionsregulatorische Domäne beinhaltet, besteht die N-terminale Kette aus fünf sogenannten Kelch-Wiederholungen, auch Kelch-Domäne genannt. Diese Kelch Domäne ist zu einer sechs-blättrigen  $\beta$ -Propeller Struktur gefaltet, welche die Protein-Bindung an die HBM vermittelt [139, 140].

Zur Untersuchung des Einflusses der drei bisher beschriebenen THAP1-Mutationen p.N136K, p.N136S und p.Y137C auf die Proteinbindung von THAP1 und HCFC1 wurden Interaktionsstudien mittels Co-Immunpräzipitation durchgeführt. Hierfür wurden Neuroblastomzellen transient mit wildtyp oder mutanten THAP1 3xFLAG-Konstrukten transfiziert und nach 24 h Inkubation eine Immunpräzipitation mit an Agarose-Beads immobilisiertem anti-HCFC1-Antikörper durchgeführt. Während das wildtyp-THAP1 zusammen mit dem endogenen HCFC1 präzipitiert werden konnte, konnten die mutanten THAP1-Konstrukte nicht im Westernblot detektiert werden. Dieses Ergebnis bestätigt die parallel zu

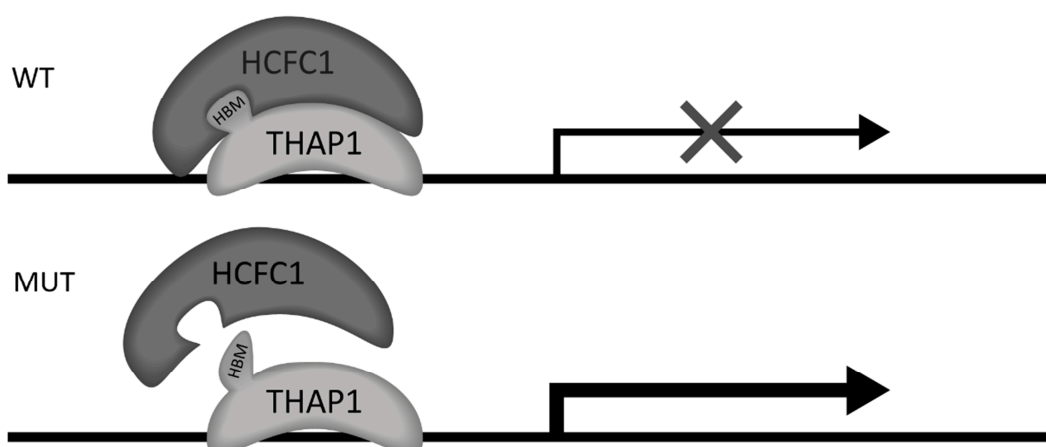
diesen Arbeiten durchgeführten Hefe-2-Hybrid-Analysen von Herrn cand. med. Lucas Kötter, die, einen vollständigen Interaktionsverlust von THAP1 und HCFC1 durch die alle drei Mutationen aufzeigten [142]. Als nächstes wurde die funktionelle Relevanz von HCFC1 als Kofaktor auf die transkriptionelle Aktivität von THAP1 untersucht. Mittels siRNA-vermitteltem *Knockdown* von HCFC1 in SH-SY5Y Zellen, konnte eine signifikante Verminderung der THAP1-vermittelten transkriptionellen Repression von *THAP1* gezeigt werden. Da HCFC1 extrem viele Gene reguliert, wurde die Messung mit zwei verschiedenen Haushaltsgenen, GAPDH und MAPK1, durchgeführt. Die Ergebnisse lassen darauf schließen, dass HCFC1 ein wichtiger Kofaktor bei der von THAP1 vermittelten Genregulation ist. Expressionsstudien in primären humanen Endothelzellen unter THAP1 Inhibition zeigen, dass THAP1 sowohl als transkriptioneller Repressor und auch als Aktivator fungiert, zum Beispiel bei *RRM1* und *BIRC5* [55]. In einer weiteren Studie konnte gezeigt werden, dass eine siRNA vermittelte Verminderung von HCFC1 zu einem Abfall der *RRM1* Expression führt, was darauf hindeutet, dass ein THAP1-HCFC1-Komplex die Aktivierung des *RRM1* Promotors vermittelt [134].

HCFC1 ist als transkriptioneller Koregulator an verschiedenen zellulären Mechanismen beteiligt, darunter auch die Regulation des Zellzyklus sowie der Proliferation. Es gibt Hinweise, dass HCFC1 eine Rolle bei der Regulation von mehr als einem Viertel aller humanen Promotoren spielt [138]. Unterstützt wird dies durch mehr als 42.000 genomischen Regionen, an die HCFC1 (indirekt) bindet [119]. Bis heute konnten zahlreiche Interaktionspartner funktionell bestätigt werden, darunter THAP11, THAP3, YY1 und E2F1 [55, 118, 134, 143].

Bioinformatische Analysen der öffentlich verfügbaren ChIP-Seq Daten des ENCODE Projekts unterstützen die Schlüsselrolle von HCFC1 als Kofaktor von THAP1. Die Auswertung der Daten ergab, dass an über 92 % der über 3500 THAP1-Bindestellen im Genom eine Überlappung mit HCFC1-Bindestellen vorliegt. Interessanterweise liegen wiederum mehr als 90 % der gemeinsamen Bindestellen von THAP1 und HCFC1 in Promotorregionen. Obwohl nur Daten für die Leukämie-Zelllinie K562 zur Verfügung standen, sind diese Analysen ein wichtiger Indikator für die Interaktion von THAP1 und HCFC1. Basierend auf diesen ChIP-Seq Daten ist HCFC1 einer der wichtigsten Kofaktoren der THAP1-vermittelten Transkriptionsregulation. Dies wird ebenfalls unterstützt von ChromNet-Daten, in denen HCFC1 als wichtigster Kofaktor von THAP1 bewertet wird [144]. ChromNet ist eine Statistische Methode die entwickelt wurde um Interaktionen und Überlappungen in ChIP-Seq-Datensätzen zu identifizieren und die Kolokalisation von Transkriptionsfaktoren und anderen DNA-assoziierten Proteinen aufzudecken. Bisher sind für THAP1 und HCFC1 allerdings nur Datensätze in der Leukämie-Zelllinie K562 öffentlich zugänglich. Weiterführende ChIP-Seq-Analysen in neuronalem Gewebe

sind notwendig, um die Rolle der Interaktion von THAP1 und HCFC1 für neurologische und neurogenetische Erkrankungen wie Dystonie zu untersuchen.

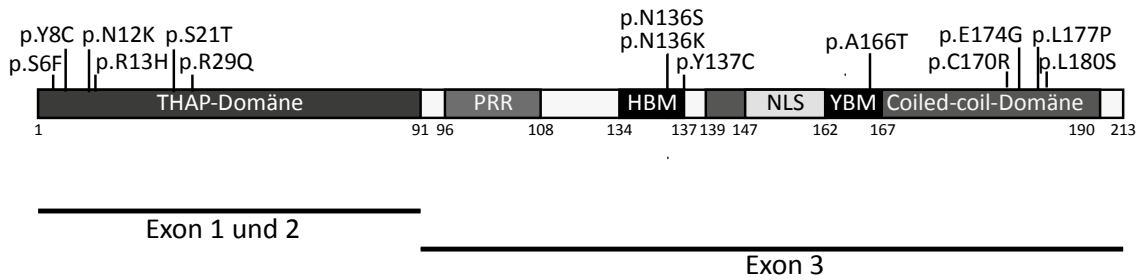
Während für THAP1 das THABS Motiv als DNA-Bindestelle bekannt ist, ist für HCFC1 kein Konsensusmotiv bekannt. Das Protein bindet selbst nicht direkt an DNA, sondern braucht THAP1 oder einen anderen Interaktionspartner als Bindeglied zur DNA. Daraus lässt sich schließen, dass die THAP1 Mutationen, die zu einem Verlust der HCFC1-THAP1 Interaktion führen, die DNA-Rekrutierung von HCFC1 beeinflussen bzw. verhindern (siehe Abbildung 5.1.2). Um die Promotor-Assoziation von HCFC1 zu den THAP1-Ziel promotoren *TOR1A*, *THAP1*, *RRM1* und *BIRC5* zu bestätigen wurden quantitative ChIP-Analysen mit einem Antikörper gegen natives HCFC1 durchgeführt. Die Dystonie-verursachenden Mutationen p.N136K und p.Y137C führen zu einer signifikanten Verminderung von HCFC1 an allen vier untersuchten Ziel promotoren, während keine der getesteten Varianten einen Einfluss auf die direkte DNA-Bindung von THAP1 hat. Interessanterweise zeigt die Mutante THAP1 p.Y137C an allen untersuchten Promotorregionen sogar eine deutlich stärkere DNA-Bindung als das wildtyp Protein. Es ist möglich, dass diese Variante entweder die THAP1-Homodimerisierung oder die Affinität zu einem bisher unbekanntem Interaktionspartner von THAP1 verstärkt und somit auch die DNA-Bindung. Die hier vorgestellten Ergebnisse zeigen, dass HCFC1 über die eine direkte Interaktion mit THAP1 an seine genomischen Zielsequenzen bindet und Mutationen die zur Einschränkung dieser Protein-Protein-Interaktion führen zu einer reduzierten DNA-Beladung mit HCFC1 führt, die THAP1-Bindung von dieser Interaktion allerdings nicht beeinflusst wird.



**Abbildung 5.1.4 Modell der THAP1 vermittelten Rekrutierung von HCFC1** (nach Hollstein et al.)  
Bei intakter HBM kann THAP1 HCFC1 zum Ziel-Promotor rekrutieren (z.B. THAP1 Minimalpromotor), die Transkription wird reguliert (WT). Ist das HBM von einer Mutation betroffen, bindet THAP1 zwar weiterhin an die DNA, kann HCFC1 aber nicht mehr rekrutieren, die Expression des Ziel-Gens wird nicht mehr reprimiert (MUT).

Da HCFC1 an der Regulation fast aller Zielgene von THAP1 beteiligt ist, könnten Transkriptomanalysen von Zelllinien, in die mittels CRISPR/Cas9 die genannten Mutationen heterozygot eingefügt wurden, wichtige Hinweise darauf liefern welche Signalwege durch die fehlende Interaktion mit HCFC1 dysreguliert sind. Zusätzliche Transkriptomstudien an aus iPS-Zellen generierten Neuronen von Patienten, (noch) gesunden Mutationsträgern und gesunden Kontrollpersonen könnten diese Ergebnisse vervollständigen und zur Aufklärung des späten Krankheitsbeginnes sowie der reduzierten Penetranz beitragen.

### 5.1.4 Die Funktion der *Coiled-Coil*-Domäne: Die Homodimerisierung von THAP1



**Abbildung 5.1.5: Schematische Darstellung von THAP1 mit den in dieser Arbeit untersuchten Mutationen**

Während Mutationen in der N-Terminalen THAP-Domäne insbesondere im Hinblick auf die DNA-Affinität funktionell untersucht wurden, konnten bisher keine funktionellen Konsequenzen für *Missense*-Mutationen in der C-terminal lokalisierten *Coiled-Coil* Domäne gezeigt werden. In Patienten identifiziere und als pathogen eingestufte Veränderungen innerhalb dieser funktionellen Domäne gehen mit einer höheren Chance auf ein frühes Erkrankungsalter einher [115]. Durch Vorarbeiten innerhalb unserer Arbeitsgruppe und durch die Arbeiten von Sengel und Kollegen konnte bereits gezeigt werden, dass die Homodimerisierung von THAP1 über die *Coiled-Coil*-Domäne vermittelt wird [145, 146]. Während die Vorarbeiten innerhalb unserer Arbeitsgruppe zeigten, dass die Integrität der gesamten *Coiled-Coil*-Domäne essentiell für die Homodimerisierung von THAP1 ist, wurde von Sengel und Kollegen ein Fragment von AS 154-166 als Homodimerisierungsdomäne postuliert. Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurde mittels GST-Pulldown-Experimenten der Einfluss von drei DYT-THAP1-assoziierten Mutationen innerhalb der *Coiled-Coil*-Domäne auf die Homodimerisierung untersucht. Hierbei konnte für keines der entsprechenden Proteine eine veränderte Bindeaffinität nachgewiesen werden. Funktionell wurden *Coiled-Coil*-Domänen als Protein-Protein-Interaktions-Motive beschrieben und weisen eine extrem hohe Affinität zueinander auf [147]. Daher kann durch die hier aufgeführten Analysen nicht eindeutig geklärt werden ob Substitutionen einzelner Aminosäuren innerhalb der *Coiled-Coil*-Domäne einen physiologisch relevanten Effekt auf die Homodimerisierung von THAP1 haben, da das verwendete *in-vitro* System nur über eine eingeschränkte Sensitivität verfügt. Allerdings ist davon auszugehen, dass es allein durch Aminosäuresubstitutionen zu keinem vollständigen Verlust der Homodimerisierung kommt, so dass ein möglicher Effekt nur schwer zu quantifizieren ist. Durch die hier vorliegenden Ergebnisse konnte also nicht eindeutig geklärt werden, ob ein möglicher Verlust bzw. oder eine Beeinträchtigung der THAP1-THAP1-Homodimerisierung tatsächlich krankheitsrelevant ist. Es ist durchaus möglich, dass die untersuchten *Missense*-Mutationen zwar keinen Einfluss auf die Homodimerisierung von

THAP1 ausüben doch möglicherweise bisher unbekannte Protein-Protein-Interaktionen verändern und so die Funktion von THAP1 verändern.

Im Rahmen der Dissertation von Dr. rer. nat. Alev Richter wurden durch Massenspektrometrische Analysen mehrere potentielle Bindepartner von THAP1 identifiziert, darunter YWHAE und HSC71. Mit HSC71 und THAP1 kotransformierte Hefen sind nicht auf dem -4SD Mangelmedium gewachsen, somit konnten im Hefe-System keine weiteren Analysen durchgeführt werden, da keine direkte Interaktion von THAP1 mit HSC71 nachweisbar war. Allerdings konnte in Hefe-Analysen die Interaktion von THAP1 mit YWHAE bestätigt werden. Zusätzlich zeigten *in silico* Analysen ein in der *Coiled-Coil*-Domäne lokalisiertes YWHAE-Bindemotiv. Sich an die Protein-Protein-Interaktionsstudien anschließende funktionelle/zellbiologische Experimente ergaben allerdings keinen Hinweis auf eine mögliche physiologische Relevanz dieser Protein-Protein-Interaktion. Weitere Analysen konnten im Rahmen der hier vorliegenden Dissertationsarbeit aus zeitlichen Gründen leider nicht durchgeführt werden.

### 5.1.5 Fazit der funktionellen Charakterisierung von THAP1

Der erste Teil dieser Dissertation befasst sich mit der funktionellen Charakterisierung des Dystonie-assoziierten Gens *THAP1* und des dazugehörigen, gleichnamigen Gen-Produkts. Es konnte gezeigt werden, dass THAP1 seine eigene Expression reprimiert und dass Mutationen innerhalb der DNA-bindenden THAP-Domäne die DNA-Assoziation des Proteins signifikant stören. In Expressionsstudien in aus iPS-Zellen differenzierten Neuronen von DYT-*THAP1* Patienten zeigte sich, dass dieser Autofeedback-Loop durch bestimmte *THAP1*-Mutationen gestört ist und zu einer gesteigerten Expression von *THAP1* führt, die allerdings wiederum dazu führt, dass sich die Menge an wildtyp THAP1 in den mutationstragenden Zellen der Menge in den Zellen der gesunden Kontrollperson annähert. Hier kann es sich durchaus um einen protektiven Mechanismus handeln, und erst der Kollaps dieses Autofeedback-Loops indiziert die Manifestation der Erkrankung. Ein Zusammenhang zwischen der Autoregulation und einem späteren Erkrankungsalter und der reduzierten Penetranz von DYT-*THAP1* ist zu diesem Zeitpunkt allerdings rein spekulativ. Die untersuchten Interaktionen mit potentiellen Interaktionspartnern haben ergeben, dass HDAC3 über die Deacetylierung des *THAP1*-Promotors an der THAP1-vermittelten Repression beteiligt ist. Die untersuchten Mutationen innerhalb der HDAC3-bindenden Domäne von THAP1 zeigten in den durchgeführten Experimenten keinen Effekt auf die Protein-Protein-Interaktion. Auch für die Homodimerisierung von THAP1 und die Interaktion mit dem Protein YWHAE konnte kein Effekt der untersuchten Mutationen festgestellt werden. Zur besseren Aufklärung der funktionellen Relevanz von Dystonie-assoziierten Mutationen sind weitere Studien mit sensitiveren Methoden notwendig. Ebenso sollte nach weiteren potentiellen Interaktionspartnern gesucht werden. HCFC1 konnte als essentieller Kofaktor von THAP1 identifiziert werden. Dieses Protein bindet nicht selbst an die DNA, sondern wird von THAP1 an die Zielpromotoren rekrutiert. Interessanterweise führen Dystonie-assoziierte Mutationen innerhalb des HCFC1-Bindemotives zu einem vollständigen Interaktionsverlust.

Es ist bisher noch ungeklärt, warum Mutationen in den verschiedenen funktionellen Domänen von THAP1 trotzdem alle zum gleichen Phänotyp führen. Auch welche durch THAP1 regulierten Signalwege die Schlüsselrolle für die Entstehung von Dystonie spielen ist bisher ungeklärt. Transkriptom- und Expressionsstudien an CRISPR/Cas9 modifizierten Zelllinien und aus iPS-Zellen generierten Neuronen können wichtige Erkenntnisse zu den Krankheitsauslösenden Mechanismen liefern. Einen ersten Hinweis erbringt eine Studie, welche THAP1 mit der Myelinisierung von Oligodendrozyten bringt [15].

Auch die reduzierte Penetranz von *THAP1*-Mutationen wurde bisher nur unzureichend aufgeklärt. Die in dieser Arbeit beschriebene Autoregulation ist ein erster Schritt zur

Identifizierung protektiver Mechanismen. Ein nächster Ansatzpunkt um sowohl protektive als auch maligne genomische Varianten zu identifizieren, sind umfassende Studien der Genomorganisation im Hinblick auf cis-regulatorische Elemente. Sogenannte *Chromatin-Conformation-Capture* Techniken können miteinander interagierende Genomische Regionen identifizieren, wie zum Beispiel Promotor-*Enhancer* Interaktionen. Veränderungen solcher Interaktionen in Zellen mit heterozygoten THAP1-Mutationen können wichtige Hinweise auf genetische Varianten in regulatorischen Regionen und auch auf gestörte Interaktionen mit anderen transkriptionellen Kofaktoren liefern. Aktuell laufende Experimente sollten die interagierenden genomischen Regionen in aus iPS-Zellen generierten Neuronen von DYT-*THAP1*-Patienten mit denen gesunder Kontrollpersonen vergleichen.

Ein besseres Verständnis von Krankheitsauslösenden Mechanismen und reduzierter Penetranz bildet die Grundlage für eine Optimierung der Versorgung und der humangenetischen Beratung von Betroffenen und Angehörigen. Auch für gezielte pharmakologische Therapieansätze ist eine Aufklärung der pathologischen Mechanismen unabdingbar.

## 5.2 Bewegungsstörungen und HACE1

Die diagnostische Einordnung angeborener Bewegungs- und Entwicklungsstörungen ausschließlich anhand der klinischen Auffälligkeiten ist aufgrund der Vielzahl bereits bekannter Erkrankungen und der vermutlich noch größeren Zahl ungeklärter Krankheitsbilder nahezu unmöglich. Trotz der rapiden sowohl technischen als auch preislichen Entwicklung moderner Sequenzieretechniken gibt es immer noch viele Krankheitsbilder, für die kein krankheitsursächliches Gen identifiziert werden konnte. Insbesondere bei hereditären Bewegungsstörungen wie Ataxien und Spastischen Paraplegien werden regelmäßig neue krankheitsassoziierte Gene publiziert.

### 5.2.1 Mutationen in *HACE1* und Exon *skipping*

Für das in dieser Dissertation beschriebene Krankheitsbild wurden seit der Erstbeschreibung durch unsere Arbeitsgruppe im Jahr 2015 insgesamt sechzehn Patienten aus acht nicht verwandten Familien genetisch diagnostiziert. Hierbei konnten insgesamt zehn verschiedene homozygote bzw. compound heterozygote Mutationen im *HACE1*-Gen identifiziert werden: p.Q209\*, p.R219\*, p.R332\*, p.P674Ffs\*5, p.R748\*, p.C80\*, p.Q152\*, p.R269\* p.Q618Vfs\*3 und p.L832del [120, 148, Nagi et al. in Begutachtung]. Interessanterweise handelt es sich mit einer Ausnahme ausschließlich um Mutationen, die zu einem vorzeitigen Translationsstop führen. Die einzige bisher bekannte Deletion, die zu keinem Verschiebung des Translationsrasters der mRNA führt, bewirkt den Verlust einer Aminosäure innerhalb der katalytischen Domäne des Proteins [148]. Alle betroffenen Individuen zeigen einen ähnlichen Phänotyp mit überlappenden Symptomen. Hierzu zählen muskuläre Hypotonie und Spasmen insbesondere der unteren Extremitäten, Auffälligkeiten der Gehirnmorphologie, Entwicklungsverzögerung und eine milde bis schwere Intelligenzminderung. Bis zur Erstbeschreibung dieser Erkrankung wurden heterozygote Mutationen in *HACE1* sowie die epigenetische Inaktivierung des Gens mit Tumorerkrankungen, insbesondere mit Wilm's Tumoren assoziiert [149–151]. Aufgrund der auffälligen Bewegungsstörungen und den zusätzlichen klinischen Auffälligkeiten wurde die Erkrankung als Spastische Paraplegie klassifiziert, genauer als Spastische Paraplegie mit psychomotorischer Entwicklungsstörung mit oder ohne Krampfanfälle (*Spastic paraplegia and psychomotor retardation with or without seizures*, SPPRS, OMIM: 616756).

Für die in dieser Arbeit beschriebene Familie wurden die compound-heterozygoten *HACE1* Mutationen p.P674Ffs\*5, p.R748\* mittels Whole-Exome-Sequencing identifiziert. Die Verifizierung durch eine Sanger Sequenzierung der beiden betroffenen Exons in allen drei Patienten und den nicht betroffenen Eltern ergab, dass die 20 bp Insertion p.P674Ffs\*5 von der Mutter vererbt wurde und die *Nonsense*-Mutation p.R748\* vom Vater.

Funktionelle Studien des HACE1-Proteins fokussierten sich bisher primär auf dessen Rolle als Tumorsuppressor. Analysen der Aminosäuresequenz von HACE1 zeigen eine HECT-Domäne im C-terminalen Bereich des Proteins, die für die bestätigte E3-Ubiquitinligase-Funktion essentiell ist [149]. Die HECT-Domäne katalysiert in Interaktion mit der E2 Ubiquitinligase UBCH7 den Transfer und die kovalente Bindung von Ubiquitin an bestimmte Zielproteine, welche dadurch sowohl aktiviert [152] als auch für den proteosomalen Abbau markiert werden können [121]. Zusätzlich gibt es Hinweise darauf, dass eine Polyubiquitinierung durch HACE1 zu einem Abbau der Zielproteine im Autophagosom führen kann [153]. Neben der Funktion als Ubiquitinligase ist HACE1 in der Regulation von Genen aus dem Retinsäure-Signalweg involviert [154]. Dieser Mechanismus ist unabhängig von der Ubiquitinligasefunktion, jedoch ist bisher nicht geklärt ob HACE1 die untersuchten Zielgene direkt als Transkriptionsfaktor reguliert oder ob HACE1 die Aktivität spezifischer Transkriptionsfaktoren moduliert.

Zu den Zielproteinen von HACE1 gehören unter anderem die GTP-gebundenen Formen der kleinen Rab-GTPasen Rab1, Rab4 und Rab11, durch deren Ubiquitinierung HACE1 die Organisation der Golgi-Membran während des Zellzyklus reguliert [155]. HACE1 ist essentiell für die postmitotische Golgi Membranfusion. Des Weiteren ist HACE1 zusammen mit Rab11a in den intrazellulären Transport und das Recycling des G-Protein-gekoppelten Rezeptors  $\beta_2$ AR ( *$\beta_2$ -adrenergic receptor*) involviert [152]. Das am besten charakterisierte Zielprotein von HACE1 ist die kleine Rho-Guanosin-Tri-Phosphatase (GTPase) *Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1* (RAC1) [122, 156]. Studien im Krallenfrosch *Xenopus laevis* konnten zudem zeigen, dass HACE1 auch eine wichtige Rolle in der frühen Embryonalentwicklung spielt [157]. Allerdings ist bisher nicht bekannt welche Rolle HACE1 in der Entwicklung des Menschen, insbesondere bei der Differenzierung des Nervensystems ist.

Zusätzlich zur Sequenzierung der genomischen DNA wurden im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit alle Mutationen auf mRNA-Ebene überprüft. Mutationen, die zu einem vorzeitigen Translationsstopp führen, triggern den sogenannten *Nonsense-Mediated-Decay* (NMD), einen Schutzmechanismus vor trunkierten Proteinen, der zum Abbau des aberranten Transkripts [158–160]. Hierzu wurde jeweils eine Probe der Patienten-Fibroblasten vor der RNA-Extraktion mit Cycloheximid, einem Inhibitor des NMD, behandelt. Interessanterweise konnte kein signifikanter Unterschied der Menge des HACE1-Transkripts zwischen behandelten und unbehandelten Zellen nachgewiesen werden, was ein Hinweis darauf ist, dass die RNA nicht wie erwartet abgebaut wird. Aufgrund unerwarteter PCR-Fragmente, wurden die Transkripte mittels Sanger Sequenzierung analysiert. Dabei konnten in den Proben der Patienten 1 und 2 neben einer mRNA mit der Nonsense-Mutation p.R748\* zusätzliche aberrante *HACE1*-Transkripte identifiziert werden, bei denen jeweils das mutierte Exon vollständig fehlt. Ein

Transkript mit dem Exon 19, das die 20bp Insertion aufweist, wurde allerdings nicht gefunden. Bei der mRNA des Allels mit der Mutation p.R748\* wird offensichtlich nur bei einem Teil der mRNA das betroffene Exon 20 herausgespleißt, während der andere Teil normal gespleißt wird. Bei der Insertion hingegen wird das Exon 19 immer übersprungen. Diese alternativen Transkripte fehlen sowohl bei der gesunden Kontrollperson als auch bei einem weiteren Patienten (Patient 4), der eine homozygote *HACE1*-Mutation in Exon 12 trägt. Auf der Grundlage der hier aufgeführten Ergebnisse zeigte sich, dass Mutationen in Exon 19 und 20 zu einem aberranten Splice-Vorgang führen, bei dem das betroffene Exon übersprungen wird. Dieses „Überspringen“ einzelner Exons während des Splice-Vorgangs tritt häufig bei genetischen Varianten innerhalb der konservierten Splice-Donor- oder Acceptor-Sequenzen innerhalb der konservierten Splice-Sites auf [161]. Allerdings betrifft keine der hier untersuchten Mutationen eine Splice-Site des jeweiligen Exons. Dieser Effekt wird auch als *Nonsense-Associated-Altered Splicing* (NAS) bezeichnet [162]. Vermutlich werden durch die Mutationen *Splice Enhancer* gestört, oder es entstehen *Splice Silencer* [163]. Interessant ist allerdings, dass beide mutierten Exons ausgeschlossen, also überspringen bzw. herausgespliced werden. Bei dem aberranten Transkript ohne Exon 20 bleibt zudem das Leseraster erhalten, das heißt einem hypothetisch synthetisierten Protein würde nur ein Teil der katalytischen Domäne fehlen. Es kann spekuliert werden, ob es sich hier um einen Schutzmechanismus handelt, der einen Teil der Proteinfunktion von HACE1 erhalten kann. Im Vergleich zu anderen Patienten mit SPPRS zeigen die Patienten 1 und 2 einen wesentlich milderen Phänotyp, der sich durch einen geringen Anteil an teilweise funktionellem HACE1 erklären ließe. Der Nachweis von einem entsprechend trunkierten Protein ist allerdings bisher nicht gelungen, da die meisten kommerziell erhältlichen Antikörper am C-Terminus binden und somit ein trunkiertes Protein nicht erkennen würde. Ein getesteter N-Terminaler Antikörper hat nur sehr unspezifische Bandenmuster detektiert. Daher wurden in den nachfolgenden vorwiegend zellbiologischen Experimenten vor allem die physiologischen Veränderungen im Hinblick auf einen Verlust von HACE1 und dessen Einfluss auf bekannte Zielproteine von HACE1 untersucht.

### 5.2.2 Hyperaktives RAC1

Die kleine GTPase RAC1 ist das bisher am besten charakterisierte Zielprotein von HACE1 [122, 156]. In seiner aktiven, GTP-gebundenen Form wird RAC1 von HACE1 ubiquitiniert und im Anschluss über das Proteasom abgebaut [122]. Die Ankyrin-Domänen von HACE1 vermitteln die spezifische Bindung an GTP-gebundenes RAC1, während die HECT-Domäne die Bindung von Ubiquitin an den Lysinrest 147 katalysiert [121]. So reguliert HACE1 viele Funktionen von RAC1, indem es die Menge an aktivem, GTP-gebundenem RAC1 kontrolliert. Der Verlust von HACE1, entweder durch genomische Deletion in Mäusen oder durch eine epigenetische Inaktivierung (z.B. starke Methylierung) des Gens in humanen Krebszelllinien, führt zu einem Anstieg von aktivem RAC1 [121, 164].

RAC1 wurde bereits im Jahre 1989 in humanen Thrombozyten identifiziert [165]. Bei RAC1 handelt es sich um eine 21 kDa große GTPase der Rac1-Unterfamilie der Rho-GTPasen und wird vom gleichnamigen *RAC1*-Gen codiert. Das Protein kann in einer aktiven, Guanosin-Triphosphat (GTP)-gebundenen Form und einer inaktiven, Guanosin-Diphosphat-(GDP)-gebundenen Form vorliegen, wobei die GTP Hydrolyse ein regulatorischer Mechanismus der Signaltransduktion ist. RAC1 ist an einer Vielzahl zellulärer Regulationskaskaden beteiligt. Hierzu zählen Mechanismen zur Aufnahme von Glucose über den GLUT4-Rezeptor [166], das Zellwachstum und die Regulation und Reorganisation des Zytoskeletts [167], antimikrobielle Zelltoxizität [168], die Regulation von oxidativem Stress [169] und die Aktivierung verschiedener Protein-Kinasen [170, 171]. Zusammen mit RhoA und Cdc42 ist RAC1 ein Schlüsselprotein der neuronalen Entwicklung, unterstützt das neuronale Überleben und spielt eine Rolle bei neurodegenerativen Erkrankungen, als Regulator der Neurogenese, Zellmigration, Axonelongation, Synaptogenese und Plastizität neuronaler Strukturen [172].

Bei den in dieser Doktorarbeit beschriebenen *HACE1*-Mutationen handelt es sich um postulierte Null-Allele, das heißt höchstwahrscheinlich wird kein bzw. nur ein nicht funktionelles HACE1-Protein synthetisiert. Um dies zu überprüfen wurden Westernblot Analysen durchgeführt. Neben HACE1 wurden ebenso die Protein-Level des HACE1-Zielproteins RAC1 und dessen *downstream* Zielprotein CyclinD1 untersucht. In den Fibroblasten der Patienten 1, 2 und 4 konnte kein HACE1-Protein nachgewiesen werden und im Vergleich zu Fibroblasten eines gesunden Spenders wurde ein leichter Anstieg der totalen RAC1- und CyclinD1-Level beobachtet. Zusätzlich zeigte ein *Active RAC1 Pulldown* Assay in den Patientenfibroblasten deutlich höhere Konzentrationen von aktivem RAC1.

Es wurden bereits Mutationen in verschiedenen anderen Guanin-Austauschfaktoren (*guanine exchange factor, GEF*) und GTPase-aktivierenden Proteinen (GAP) als Ursache für verschiedene seltene Neurologische Erkrankungen identifiziert, darunter ARHGEF6 und 9, FGD1, TRIO,

OPHN1, MEGAP sowie OCRL1 [173, 174]. Und *RAC1* selbst wurde in einer meta-Analyse von Daten aus mehreren tausend Trio-Sequenzierungen als Kandidatengen für Intelligenzminderung identifiziert [175]. Dies macht *RAC1* zu einem extrem interessanten Zielprotein von *HACE1* im Hinblick auf die pathologischen Veränderungen, die zum beschriebenen Krankheitsbild führen und rückte es in den Mittelpunkt der funktionellen Analysen.

Unterstützt wird diese Hypothese über die zentrale Rolle von *RAC1* von mehreren Studien an Mäusen, die zeigen, dass ein Abweichen vom physiologischen Level der aktiven Form von *Rac1* während der Entwicklung zu schweren neurologischen Phänotypen führt. Mäuse mit konstitutiv aktivem *Rac1*, entweder bedingt durch eine *gain-of-function* Mutation oder durch das Ausschalten spezifischer *Rac1* Repressoren, entwickeln eine zerebrale Atrophie und Veränderungen der Hirnstrukturen, verursacht durch eine Dysregulation der zellulären Migration. Alle Mausmodelle mit konstitutiv aktivem *RAC1* entwickeln zudem Bewegungsstörungen wie ein wackeliges Gangbild und abnormale Astroglia [176], Ataxie verbunden mit abnormaler Haltung und auffälligem Gangbild [177] wie einem „Hüpfen wie Kaninchen“ [178]. Viele dieser in den Mäusen beschriebenen Auffälligkeiten überlappen mit denen der Betroffenen.

Die Arbeitsgruppe um Castillo-Lluva konnte bereits zeigen, dass die Überexpression einer ubiquitinierungs-resistenten *RAC1* Mutante zu einem größeren Anstieg der Zellmigration führt als wildtyp *RAC1* und dass *HACE1* somit durch die Regulation von *RAC1* die Zellmigration hemmt [121]. Ein weiterer Mechanismus, der über die Ubiquitinierung von *RAC1* indirekt von *HACE1* reguliert wird ist das Level an reaktiven Sauerstoff Spezies (ROS, *Reactive Oxygen Species*), da *RAC1* über eine Stabilisierung und Aktivierung von NADPH-(*nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-oxidase*) die durch die Oxidase regulierte ROS Produktion kontrolliert [123].

*RAC1* spielt also eine wichtige Rolle bei der neuronalen Entwicklung, und eine Dysregulation des zellulären *RAC1* Level bringt diese aus dem Gleichgewicht. Um zu verstehen, welche Prozesse von dieser Dysregulation betroffen sind, wurden zunächst das Migrationsverhalten sowie die zellulären Level an reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) als Marker für oxidativen Stress betrachtet.

### 5.2.3 Verändertes Migrationsverhalten durch Dysregulation von RAC1

Die neuronale Migration ist ein essentieller Prozess für die Entwicklung und Instandhaltung der neurologischen Systeme eines Organismus [179, 180]. Neu differenzierte Neuronen müssen von ihrem Entstehungsort migrieren um sich in das bestehende System einzugliedern. Es wurden bisher verschiedenste Migrationsformen im Gehirn beschrieben, darunter radiale, tangentielle und axonophile Migration [181].

RAC1 ist durch die Regulation von Aktin ein essentieller Faktor bei der Migration und spielt dadurch eine wichtige Rolle bei der korrekten Gehirnentwicklung [182]. Da RAC1 auch in Fibroblasten die Zellmigration und Wundheilung reguliert [183], wurden Wundheilungsassays mit den Fibroblasten der Patienten durchgeführt um Rückschlüsse auf das Migrationsverhalten ziehen zu können. Tatsächlich war die Zellmigration in den Fibroblasten der Patienten doppelt so hoch wie in Zellen einer gesunden Kontrollperson. Durch Behandlung der Zellen mit dem spezifischen RAC1-Inhibitor NSC23766 konnte diese verstärkte Zellmigration auf die erhöhten Konzentrationen von aktivem RAC1 zurückgeführt werden. Bei einer Behandlung mit 15-20  $\mu\text{M}$  NSC23766 gab es keinen signifikanten Unterschied mehr zwischen der Migration der Patientenzellen und den Zellen des gesunden Spenders. Dies liefert erste Hinweise darauf, dass die Migration in den SPPRS-Patienten ebenfalls fehlreguliert ist. Insbesondere während der Embryonalentwicklung kann eine veränderte Zellmigration schwerwiegende Folgen haben. Ein nächster Schritt um diese Hypothese weiter zu untermauern wären Migrationsstudien in neuronalen Zellen. Hierfür wurden aus den Fibroblasten der Patienten am Institut für Neurogenetik der Universität zu Lübeck bereits induzierte pluripotente Stammzellen (iPS) hergestellt, die für weiterführende Studien in Neuronen differenziert werden sollen [184].

Eine gestörte Migration in der Embryonalentwicklung führt dazu, dass sich Organstrukturen, insbesondere das Gehirn, nicht richtig ausbilden können. Dies wird von verschiedenen Studien in Mäusen untermauert die zeigen, dass eine Akkumulation von aktivem RAC1 zu Veränderungen der Hirnstrukturen durch ein verändertes Migrationsverhalten führt [176–178]. Es kommt zu morphologischen Auffälligkeiten wie vergrößerten Ventrikeln, einem hypoplastischen Corpus Callosum oder „Brückenmangel“ und Fehlbildungen der Hirnrinde. Ähnliche morphologische Auffälligkeiten wurden nicht nur in *Hace1-knockout* Mäusen beobachtet, sondern auch in den Patienten beschrieben (Nagy et al. in Begutachtung). Da die Zellmigration über das Zytoskelett, insbesondere f-Aktin gesteuert wird, können auch andere mit RAC1 und Aktin assoziierte Mechanismen wie die Ausbildung von Dendriten und die Plastizität von Synapsen betroffen sein. Elektrophysiologische und histologische Untersuchungen in *Hace1-knockout* Mäusen unterstützen diese Hypothese, es konnten eine gestörte synaptische Transmission und Plastizität sowie eine deutlich reduzierte Anzahl von

Dendriten im Hippocampus beobachtet werden (Nagy et al, in Begutachtung). Im Menschen wird der Hippocampus mit Epilepsie in Verbindung gebracht, die auch bei einigen Patienten mit SPPRS auftritt [120, 148, 185, 186]. Generell wird postuliert, dass eine Fehlregulation der neuronalen Migration zu pathologischen Veränderungen führt, die verschiedene neurologische Krankheiten verursachen kann [180], darunter Fehlbildungen des Gehirns wie Lissenzephalien, Pachygyrie, Polymikrogyrie und fokal-corticale Dysplasie [187].

Die erhöhte RAC1-Aktivität in den Fibroblasten der Patienten, das gesteigerte Migrationsverhalten der Zellen und die Resultate der Maus-Studien sind deutliche Hinweise darauf, dass die gestörte Regulation von RAC1 durch den Verlust von HACE1 eine Schlüsselrolle in der Pathologie von SPPRS spielt, insbesondere bei den morphologischen Veränderungen des Gehirns.

#### 5.2.4 Oxidativer Stress und HACE1-Defizienz

Durch die Regulation von RAC1 und NADPH ist HACE1 ein wichtiger Faktor bei der Regulation der Homöostase von Reaktiven Sauerstoff Spezies (ROS) [123], ein Funktionsverlust von HACE1 führt zu einem Anstieg von ROS in Zellkulturen und Gewebeproben [188]. Ein Anstieg der ROS Produktion über die physiologische Konzentration hinaus wird auch als oxidativer Stress bezeichnet, der unter anderem mit progressiven, neurodegenerativen Erkrankungen wie Chorea Huntington [188, 189], Alzheimer, Parkinson und Amyotrophe Lateral Sklerose (ALS) [190, 191] und Krebserkrankungen [192] in Verbindung gebracht wird. ROS schädigen die DNA, führen zu gesteigerter Proteinoxidation und können das Membranpotential destabilisieren.

Die mikroskopische Untersuchung von Fibroblasten nach einer CellROX® Deep Red Färbung auf ROS ergab zuerst keinen signifikanten Unterschied zwischen den HACE1-defizienten Zellen und denen eines gesunden Spenders. Daher wurden die Zellen mittels der wesentlich sensitiveren Durchflusszytometrie analysiert. Die Auswertung der durchflusszytometrischen Messung ergab in den HACE1-defizienten Fibroblasten signifikant höhere Konzentrationen an ROS als in den Fibroblasten der gesunden Kontrollperson. Das unauffällige Ergebnis der mikroskopischen Auswertung lässt sich einfach durch die mangelnde Sensitivität der Methode erklären. Die Ergebnisse der durchflusszytometrischen Messung decken sich mit histologischen Studien in adulten *HACE1-knockout* Mäusen, die im Vergleich zu wildtyp Mäusen im Gehirn eine extrem hohe Konzentration an ROS aufweisen (Nagy et al, in Begutachtung).

In neurodegenerativen Erkrankungen spielt vor allem eine chronische, über einen längeren Zeitraum ansteigende Exposition mit oxidativem Stress eine Rolle [191, 193]. Erhöhte ROS-Konzentrationen in HACE1-defizienten Mäusen und stark verringerte HACE1-Level im Striatum von Chorea-Huntington Patienten deuten darauf hin, dass langsam ansteigender und akkumulierender oxidativer Stress durch ROS, ausgelöst durch eine verminderte HACE1 Aktivität, zur Entstehung neuropathologischer Erkrankungen wie Chorea Huntington beitragen können [188]. Die Progression der Erkrankungen lässt sich auf verschiedene Ursachen zurückführen, wie die Akkumulation von Proteinclustern in den Neuronen, einer gestörten mitochondrialen Atmungskette oder einem verstärkten Absterben von Neuronen. Im Fall von SPPRS konnte bei den Patienten bisher keine Progression der neurologischen Symptome beobachtet werden. Das deutet darauf hin, dass die pathologischen Veränderungen und Schädigungen des Nervensystems und der Neuronen schon während der Embryonalentwicklung auftreten. Unterstützt wird diese Hypothese durch Studien anderer neurologischer Entwicklungsstörungen, in denen erhöhter oxidativer Stress eine Rolle in der Pathogenese spielt, wie z.B. das Fragile X-Syndrom oder das Down Syndrom [194–197]. In

Fibroblasten von Föten die eine Trisomie 21 aufweisen wurde neben einer gestörten Zellmigration auch erhöhte Levels von ROS gemessen [198].

Welche Auswirkungen ROS genau auf das embryonale Gehirn und die Gehirnentwicklung hat wurde allerdings bisher nicht genauer untersucht. Um die Ergebnisse aus den primären Fibroblasten auf neuronale Zellen zu übertragen, ist auch hier geplant die Versuche an aus iPS-Zellen der Patienten generierten Neuronen zu wiederholen. Hohe ROS-Konzentrationen in solchen Neuronen wären ein Hinweis darauf, dass auch die neuronalen Systeme der Patienten von oxidativem Stress betroffen sind und dadurch geschädigt werden. Warum es trotz andauerndem oxidativen Stress nicht zu einer Progression der neurologischen Auffälligkeiten der HACE1-defizienten Betroffenen kommt und ob die Neuronen mit der Zeit einen anderen Mechanismus in der Stressantwort aktivieren, kann bisher nur spekuliert werden.

### 5.2.5 Fazit HACE1

Die zweite Hälfte dieser Dissertation beschäftigt sich mit einer komplexen neurologischen Entwicklungsstörung, die mit biallelischen *loss-of-function* Mutationen im *HACE1* Gen assoziiert ist. Die Identifizierung der krankheitsursächlichen Mutationen und der Effekt auf das Genprodukt sind zusammen mit einer detaillierten klinischen Charakterisierung der Patienten allerdings nur der erste Schritt auf dem Weg zum Verständnis der pathologischen Mechanismen hinter den Symptomen der Betroffenen. Bei allen bisher bekannten Mutationen ist die katalytische HECT-Domäne, welche die Ubiquitinligase-Funktion vermittelt, entweder gar nicht oder nur teilweise vorhanden, oder durch eine fehlende Aminosäure stark in der Tertiärstruktur verändert, so dass von einem vollständigen Funktionsverlust auszugehen ist. Weiterführende funktionelle Studien an Fibroblasten von drei Patienten konnten erste Hinweise auf zelluläre Fehlfunktionen durch den Verlust von funktionellem HACE1 liefern. So kommt es zu einem Anstieg von aktivem RAC1 in der Zelle, was eine erhöhte Zellmigration und eine verstärkte Produktion von ROS zur Folge hat. Ein *HACE1-knockout*-Mausmodell von Kollaborationspartnern liefert zudem sehr ähnliche Ergebnisse, die *knockout*-Mäuse zeigen ähnliche gehirnmorphologische Veränderungen sowie Bewegungsstörungen und Probleme beim assoziativen Lernen (Nagy et al., in Begutachtung). Funktionelle Experimente auf zellulärer Ebene zeigen auch für die Mäuse erhöhte zelluläre RAC1-Levels sowie einen Anstieg von ROS im adulten Gehirn.

Zusammengenommen mit den Ergebnissen des Maus-Modells deuten der Anstieg von (aktivem) RAC1 und dem von RAC1 regulierten Zellzyklus-Protein Cyclin D1, die erhöhte ROS-Produktion sowie die verstärkte RAC1-abhängige Zellmigration darauf hin, dass die Dysregulation von RAC1 eine Schlüsselrolle in der Pathologie von SPPRS spielt. Erst kürzlich wurden genetische Varianten in RAC1 zudem in Patienten mit Intelligenzminderung identifiziert [175] und Mutationen in RAC1 mit einer phänotypisch teilweise mit SRPPS überlappenden Entwicklungsstörung assoziiert [199].

Zu beachten ist allerdings, dass die Ankyrin-Domäne, welche die Protein-Bindung von HACE1 vermittelt, bei hypothetisch translatiertem Protein zumindest teilweise intakt wäre. Es ist bekannt, dass HACE1 auch ohne HECT-Domäne noch an RAC1 binden kann [121]. Zudem wurde gezeigt, dass HACE1 unabhängig von der Ubiquitinligase-Funktion die Expression von Genen des Retinsäure-Signalweges reguliert, diese Funktion könnte ebenfalls von trunkierten HACE1-Proteinen beeinflusst werden [154]. Zusätzlich zeigen funktionelle Analysen von Tumor-assoziierten *Missense*-Mutationen die im N-terminalen Teil des Proteins lokalisiert sind einen Einfluss auf das Zellwachstum [200]. Die Rolle der N-terminalen Domäne sowie der

Ubiquitinligase-unabhängigen Funktionen von HACE1 sollte also unbedingt Bestandteil weiterführender Studien zur Aufklärung der Pathologischen Mechanismen von SPPRS sein.

Neben den molekular- und zellbiologischen Studien sind auch weitere klinische Untersuchungen essentiell für ein besseres Verständnis der Erkrankung und ihrer Pathologie.

Für eine detaillierte klinische Klassifizierung des Krankheitsbildes und eine genauere Genotyp-Phänotyp-Korrelation ist die Identifizierung und klinische Charakterisierung weiterer Betroffener essentiell.



## 6 Literaturverzeichnis

1. Ezkurdia I, Juan D, Rodriguez JM, Frankish A, Diekhans M, Harrow J, Vazquez J, Valencia A, Tress ML (2014) Multiple evidence strands suggest that there may be as few as 19,000 human protein-coding genes. *Hum Mol Genet* 23(22):5866–5878. doi:10.1093/hmg/ddu309
2. Schiller F (1967) The vicissitudes of the basal ganglia (further landmarks in cerebral nomenclature). *Bull Hist Med* 41(6):515–538
3. Lanska DJ (1969-2014) Chapter 33 The history of movement disorders. In: Vinken P, Bruyn G, Klawans H et al (Hrsg) *Handbook of clinical neurology. History of neurology*, Bd 95. North-Holland/Elsevier, Amsterdam, S 501–546
4. Huntington G (2003) On chorea. George Huntington, M.D. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci* 15(1):109–112. doi:10.1176/jnp.15.1.109
5. Tippett LJ, Waldvogel HJ, Snell RG, Vonsattel J-P, Young AB, Faull RLM (2017) The Complexity of Clinical Huntington's Disease: Developments in Molecular Genetics, Neuropathology and Neuroimaging Biomarkers. *Adv Neurobiol* 15:129–161. doi:10.1007/978-3-319-57193-5\_5
6. Nussbaum RL (2017) The Identification of Alpha-Synuclein as the First Parkinson Disease Gene. *J Parkinsons Dis* 7(s1):S45-S51. doi:10.3233/JPD-179003
7. Lohmann K, Klein C (2017) Update on the Genetics of Dystonia. *Curr Neurol Neurosci Rep* 17(3):26. doi:10.1007/s11910-017-0735-0
8. Oppenheim H (1911) Über eigenartige Krampfkrankheit des kindlichen und jugendlichen Alters (Dysbasia lordotica progressiva, Dystonia Musculorum Deformans). *Neurol Centrabl.* (30):1090
9. Fahn S (1988) Concept and classification of dystonia. *Adv Neurol* 50:1–8
10. Albanese A, Bhatia K, Bressman SB, Delong MR, Fahn S, Fung VSC, Hallett M, Jankovic J, Jinnah HA, Klein C, Lang AE, Mink JW, Teller JK (2013) Phenomenology and classification of dystonia: a consensus update. *Mov Disord* 28(7):863–873. doi:10.1002/mds.25475
11. Quartarone A, Hallett M (2013) Emerging concepts in the physiological basis of dystonia. *Mov Disord* 28(7):958–967. doi:10.1002/mds.25532
12. Charlesworth G, Bhatia KP (2013) Primary and secondary dystonic syndromes: an update. *Curr Opin Neurol* 26(4):406–412. doi:10.1097/WCO.0b013e3283633696
13. Steeves TD, Day L, Dykeman J, Jette N, Pringsheim T (2012) The prevalence of primary dystonia: a systematic review and meta-analysis. *Mov Disord* 27(14):1789–1796. doi:10.1002/mds.25244
14. Atai NA, Ryan SD, Kothary R, Breakefield XO, Nery FC (2012) Untethering the nuclear envelope and cytoskeleton: biologically distinct dystonias arising from a common cellular dysfunction. *Int J Cell Biol* 2012:634214. doi:10.1155/2012/634214
15. Yellajoshyula D, Liang C-C, Pappas SS, Penati S, Yang A, Mecano R, Kumaran R, Jou S, Cookson MR, Dauer WT (2017) The DYT6 Dystonia Protein THAP1 Regulates Myelination within the Oligodendrocyte Lineage. *Dev Cell* 42(1):52-67.e4. doi:10.1016/j.devcel.2017.06.009
16. Geyer HL, Bressman SB (2006) The diagnosis of dystonia. *Lancet Neurol* 5(9):780–790. doi:10.1016/S1474-4422(06)70547-6
17. Standaert DG (2011) Update on the pathology of dystonia. *Neurobiol Dis* 42(2):148–151. doi:10.1016/j.nbd.2011.01.012
18. Williams L, McGovern E, Kimmich O, Molloy A, Beiser I, Butler JS, Molloy F, Logan P, Healy DG, Lynch T, Walsh R, Cassidy L, Moriarty P, Moore H, McSwiney T, Walsh C, O'Riordan S, Hutchinson M (2017) Epidemiological, clinical and genetic aspects of adult onset isolated focal dystonia in Ireland. *Eur J Neurol* 24(1):73–81. doi:10.1111/ene.13133
19. Schmidt A, Jabusch H-C, Altenmüller E, Hagenah J, Brüggemann N, Lohmann K, Enders L, Kramer PL, Saunders-Pullman R, Bressman SB, Münchau A, Klein C (2009) Etiology of

- musician's dystonia: familial or environmental? *Neurology* 72(14):1248–1254.  
doi:10.1212/01.wnl.0000345670.63363.d1
20. Groen JL, Yildirim E, Ritz K, Baas F, van Hilten JJ, van der Meulen FW, Langeveld TP, Tijssen MAJ (2011) THAP1 mutations are infrequent in spasmodic dysphonia. *Mov Disord* 26(10):1952–1954. doi:10.1002/mds.23682
  21. van Egmond ME, Kuiper A, Eggink H, Sinke RJ, Brouwer OF, Verschuuren-Bemelmans CC, Sival DA, Tijssen MAJ, Koning TJ de (2015) Dystonia in children and adolescents: a systematic review and a new diagnostic algorithm. *J Neurol Neurosurg Psychiatr* 86(7):774–781. doi:10.1136/jnnp-2014-309106
  22. Zech M, Boesch S, Jochim A, Weber S, Meindl T, Schormair B, Wieland T, Lunetta C, Sansone V, Messner M, Mueller J, Ceballos-Baumann A, Strom TM, Colombo R, Poewe W, Haslinger B, Winkelmann J (2017) Clinical exome sequencing in early-onset generalized dystonia and large-scale resequencing follow-up. *Mov Disord* 32(4):549–559. doi:10.1002/mds.26808
  23. Jinnah HA, Hess EJ (2017) Evolving concepts in the pathogenesis of dystonia. *Parkinsonism Relat Disord*. doi:10.1016/j.parkreldis.2017.08.001
  24. Marras C, Lang A, van de Warrenburg BP, Sue CM, Tabrizi SJ, Bertram L, Mercimek-Mahmutoglu S, Ebrahimi-Fakhari D, Warner TT, Durr A, Assmann B, Lohmann K, Kostic V, Klein C (2016) Nomenclature of genetic movement disorders: Recommendations of the international Parkinson and movement disorder society task force. *Mov Disord* 31(4):436–457. doi:10.1002/mds.26527
  25. Kaiser FJ, Osmanovic A, Rakovic A, Erogullari A, Uflacker N, Braunholz D, Lohnau T, Orolicki S, Albrecht M, Gillissen-Kaesbach G, Klein C, Lohmann K (2010) The dystonia gene DYT1 is repressed by the transcription factor THAP1 (DYT6). *Ann Neurol* 68(4):554–559. doi:10.1002/ana.22157
  26. Gavarini S, Cayrol C, Fuchs T, Lyons N, Ehrlich ME, Girard J-P, Ozelius LJ (2010) Direct interaction between causative genes of DYT1 and DYT6 primary dystonia. *Ann Neurol* 68(4):549–553. doi:10.1002/ana.22138
  27. Hewett JW, Tannous B, Niland BP, Nery FC, Zeng J, Li Y, Breakefield XO (2007) Mutant torsinA interferes with protein processing through the secretory pathway in DYT1 dystonia cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104(17):7271–7276. doi:10.1073/pnas.0701185104
  28. Waite A, Rosa MC de, Brancaccio A, Blake DJ (2011) A gain-of-glycosylation mutation associated with myoclonus-dystonia syndrome affects trafficking and processing of mouse  $\epsilon$ -sarcoglycan in the late secretory pathway. *Hum Mutat* 32(11):1246–1258. doi:10.1002/humu.21561
  29. Tanabe LM, Kim CE, Alagem N, Dauer WT (2009) Primary dystonia: molecules and mechanisms. *Nat Rev Neurol* 5(11):598–609. doi:10.1038/nrneurol.2009.160
  30. Jankovic J (2017) An update on new and unique uses of botulinum toxin in movement disorders. *Toxicon*. doi:10.1016/j.toxicon.2017.09.003
  31. Hallett M (2004) Dystonia: abnormal movements result from loss of inhibition. *Adv Neurol* 94:1–9
  32. Tarsy D, Simon DK (2006) Dystonia. *N Engl J Med* 355(8):818–829. doi:10.1056/NEJMra055549
  33. Tagliati M, Shils J, Sun C, Alterman R (2004) Deep brain stimulation for dystonia. *Expert Rev Med Devices* 1(1):33–41. doi:10.1586/17434440.1.1.33
  34. Vidailhet M, Vercueil L, Houeto J-L, Krystkowiak P, Lagrange C, Yelnik J, Bardinet E, Benabid A-L, Navarro S, Dormont D, Grand S, Blond S, Ardouin C, Pillon B, Dujardin K, Hahn-Barma V, Agid Y, Destée A, Pollak P (2007) Bilateral, pallidal, deep-brain stimulation in primary generalised dystonia: a prospective 3 year follow-up study. *Lancet Neurol* 6(3):223–229. doi:10.1016/S1474-4422(07)70035-2
  35. Panov F, Tagliati M, Ozelius LJ, Fuchs T, Gologorsky Y, Cheung T, Avshalumov M, Bressman SB, Saunders-Pullman R, Weisz D, Alterman RL (2012) Pallidal deep brain stimulation for

- DYT6 dystonia. *J Neurol Neurosurg Psychiatr* 83(2):182–187. doi:10.1136/jnnp-2011-300979
36. Krause P, Brüggemann N, Völmann S, Horn A, Kupsch A, Schneider G-H, Lohmann K, Kühn A (2015) Long-term effect on dystonia after pallidal deep brain stimulation (DBS) in three members of a family with a THAP1 mutation. *J Neurol* 262(12):2739–2744. doi:10.1007/s00415-015-7908-z
  37. LeDoux MS, Xiao J, Rudzińska M, Bastian RW, Wszolek ZK, van Gerpen JA, Puschmann A, Momčilović D, Vemula SR, Zhao Y (2012) Genotype-phenotype correlations in THAP1 dystonia: molecular foundations and description of new cases. *Parkinsonism Relat Disord* 18(5):414–425. doi:10.1016/j.parkreldis.2012.02.001
  38. Blanchard A, Ea V, Roubertie A, Martin M, Coquart C, Claustres M, Bérout C, Collod-Bérout G (2011) DYT6 dystonia: review of the literature and creation of the UMD Locus-Specific Database (LSDB) for mutations in the THAP1 gene. *Hum Mutat* 32(11):1213–1224. doi:10.1002/humu.21564
  39. Fuchs T, Gavarini S, Saunders-Pullman R, Raymond D, Ehrlich ME, Bressman SB, Ozelius LJ (2009) Mutations in the THAP1 gene are responsible for DYT6 primary torsion dystonia. *Nat Genet* 41(3):286–288. doi:10.1038/ng.304
  40. Almasy L, Bressman SB, Raymond D, Kramer PL, Greene PE, Heiman GA, Ford B, Yount J, Leon D de, Chouinard S, Saunders-Pullman R, Brin MF, Kapoor RP, Jones AC, Shen H, Fahn S, Risch NJ, Nygaard TG (1997) Idiopathic torsion dystonia linked to chromosome 8 in two Mennonite families. *Ann Neurol* 42(4):670–673. doi:10.1002/ana.410420421
  41. Caviness JN (1996) Myoclonus. *Mayo Clinic Proceedings* 71(7):679–688. doi:10.1016/S0025-6196(11)63006-1
  42. Eberhardt O, Topka H (2017) Myoclonic Disorders. *Brain Sci* 7(8). doi:10.3390/brainsci7080103
  43. Harding AE (1983) Classification of the hereditary ataxias and paraplegias. *Lancet* 1(8334):1151–1155
  44. Fink JK (2003) The hereditary spastic paraplegias: nine genes and counting. *Arch Neurol* 60(8):1045–1049. doi:10.1001/archneur.60.8.1045
  45. Denora PS, Santorelli FM, Bertini E (2013) Hereditary spastic paraplegias: one disease for many genes, and still counting. *Handb Clin Neurol* 113:1899–1912. doi:10.1016/B978-0-444-59565-2.00060-5
  46. Schüle R, Schöls L (2017) Ataxien und hereditäre spastische Spinalparalysen. *Nervenarzt* 88(7):720–727. doi:10.1007/s00115-017-0357-4
  47. Souza PVSd, Bortholin T, Dias RB, Chieia MAT, Burlin S, Naylor FGM, Pinto WBVdR, Oliveira ASB (2017) New genetic causes for complex hereditary spastic paraplegia. *J Neurol Sci* 379:283–292. doi:10.1016/j.jns.2017.06.019
  48. Synofzik M, Schüle R (2017) Overcoming the divide between ataxias and spastic paraplegias: Shared phenotypes, genes, and pathways. *Mov Disord* 32(3):332–345. doi:10.1002/mds.26944
  49. Klebe S, Stevanin G, Depienne C (2015) Clinical and genetic heterogeneity in hereditary spastic paraplegias: from SPG1 to SPG72 and still counting. *Rev Neurol (Paris)* 171(6-7):505–530. doi:10.1016/j.neurol.2015.02.017
  50. Verbeek DS, van de Warrenburg BPC (2011) Genetics of the dominant ataxias. *Semin Neurol* 31(5):461–469. doi:10.1055/s-0031-1299785
  51. Anheim M, Tranchant C, Koenig M (2012) The autosomal recessive cerebellar ataxias. *N Engl J Med* 366(7):636–646. doi:10.1056/NEJMra1006610
  52. Finsterer J, Löscher W, Quasthoff S, Wanschitz J, Auer-Grumbach M, Stevanin G (2012) Hereditary spastic paraplegias with autosomal dominant, recessive, X-linked, or maternal trait of inheritance. *J Neurol Sci* 318(1-2):1–18. doi:10.1016/j.jns.2012.03.025
  53. Pensato V, Castellotti B, Gellera C, Pareyson D, Ciano C, Nanetti L, Salsano E, Piscosquito G, Sarto E, Eoli M, Moroni I, Soliveri P, Lamperti E, Chiapparini L, Di Bella D, Taroni F, Mariotti

- C (2014) Overlapping phenotypes in complex spastic paraplegias SPG11, SPG15, SPG35 and SPG48. *Brain* 137(Pt 7):1907–1920. doi:10.1093/brain/awu121
54. Schüle R, Wiethoff S, Martus P, Karle KN, Otto S, Klebe S, Klimpe S, Gallenmüller C, Kurzwelly D, Henkel D, Rimmel F, Stolze H, Kohl Z, Kassubek J, Klockgether T, Vielhaber S, Kamm C, Klopstock T, Bauer P, Züchner S, Liepelt-Scarfone I, Schöls L (2016) Hereditary spastic paraplegia: Clinicogenetic lessons from 608 patients. *Ann Neurol* 79(4):646–658. doi:10.1002/ana.24611
  55. Cayrol C, Lacroix C, Mathe C, Ecochard V, Ceribelli M, Loreau E, Lazar V, Dessen P, Mantovani R, Aguilar L, Girard J-P (2007) The THAP-zinc finger protein THAP1 regulates endothelial cell proliferation through modulation of pRB/E2F cell-cycle target genes. *Blood* 109(2):584–594. doi:10.1182/blood-2006-03-012013
  56. Girard JP, Amalric F, Roussigne M, Clouaire T (2010)
  57. Roussigne M, Cayrol C, Clouaire T, Amalric F, Girard J-P (2003) THAP1 is a nuclear proapoptotic factor that links prostate-apoptosis-response-4 (Par-4) to PML nuclear bodies. *Oncogene* 22(16):2432–2442. doi:10.1038/sj.onc.1206271
  58. Roussigne M, Kossida S, Lavigne A-C, Clouaire T, Ecochard V, Glories A, Amalric F, Girard J-P (2003) The THAP domain: a novel protein motif with similarity to the DNA-binding domain of P element transposase. *Trends Biochem Sci* 28(2):66–69. doi:10.1016/S0968-0004(02)00013-0
  59. Lee CC, Mul YM, Rio DC (1996) The Drosophila P-element KP repressor protein dimerizes and interacts with multiple sites on P-element DNA. *Mol Cell Biol* 16(10):5616–5622
  60. Clouaire T, Roussigne M, Ecochard V, Mathe C, Amalric F, Girard J-P (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* 102(19):6907–6912. doi:10.1073/pnas.0406882102
  61. Sabogal A, Lyubimov AY, Corn JE, Berger JM, Rio DC (2010) THAP proteins target specific DNA sites through bipartite recognition of adjacent major and minor grooves. *Nat Struct Mol Biol* 17(1):117–123. doi:10.1038/nsmb.1742
  62. Bessièrè D, Lacroix C, Campagne S, Ecochard V, Guillet V, Mourey L, Lopez F, Czaplicki J, Demange P, Milon A, Girard J-P, Gervais V (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* 283(7):4352–4363. doi:10.1074/jbc.M707537200
  63. Sells SF, Han SS, Muthukkumar S, Maddiwar N, Johnstone R, Boghaert E, Gillis D, Liu G, Nair P, Monnig S, Collini P, Mattson MP, Sukhatme VP, Zimmer SG, Wood DP, McRoberts JW, Shi Y, Rangnekar VM (1997) Expression and function of the leucine zipper protein Par-4 in apoptosis. *Mol Cell Biol* 17(7):3823–3832
  64. Osmanovic A, Dendorfer A, Erogullari A, Uflacker N, Braunholz D, Rakovic A, Vierke G, Gil-Rodríguez C, Münchau A, Albrecht M, Brüggemann N, Gillissen-Kaesbach G, Klein C, Lohmann K, Kaiser FJ (2011) Truncating mutations in THAP1 define the nuclear localization signal. *Mov Disord* 26(8):1565–1567. doi:10.1002/mds.23611
  65. Kristie TM, LeBowitz JH, Sharp PA (1989) The octamer-binding proteins form multi-protein-DNA complexes with the HSV alpha TIF regulatory protein. *EMBO J* 8(13):4229–4238
  66. Katan M, Haigh A, Verrijzer CP, van der Vliet PC, O'Hare P (1990) Characterization of a cellular factor which interacts functionally with Oct-1 in the assembly of a multicomponent transcription complex. *Nucleic Acids Res* 18(23):6871–6880
  67. Xiao P, Capone JP (1990) A cellular factor binds to the herpes simplex virus type 1 transactivator Vmw65 and is required for Vmw65-dependent protein-DNA complex assembly with Oct-1. *Mol Cell Biol* 10(9):4974–4977
  68. Lorch Y, LaPointe JW, Kornberg RD (1987) Nucleosomes inhibit the initiation of transcription but allow chain elongation with the displacement of histones. *Cell* 49(2):203–210

69. Han M, Grunstein M (1988) Nucleosome loss activates yeast downstream promoters in vivo. *Cell* 55(6):1137–1145
70. Strahl BD, Allis CD (2000) The language of covalent histone modifications. *Nature* 403(6765):41–45. doi:10.1038/47412
71. Schübeler D, MacAlpine DM, Scalzo D, Wirbelauer C, Kooperberg C, van Leeuwen F, Gottschling DE, O'Neill LP, Turner BM, Delrow J, Bell SP, Groudine M (2004) The histone modification pattern of active genes revealed through genome-wide chromatin analysis of a higher eukaryote. *Genes Dev* 18(11):1263–1271. doi:10.1101/gad.1198204
72. Krivega I, Dean A (2012) Enhancer and promoter interactions-long distance calls. *Curr Opin Genet Dev* 22(2):79–85. doi:10.1016/j.gde.2011.11.001
73. Marsman J, Horsfield JA (2012) Long distance relationships: enhancer-promoter communication and dynamic gene transcription. *Biochim Biophys Acta* 1819(11-12):1217–1227. doi:10.1016/j.bbagr.2012.10.008
74. Stampfel G, Kazmar T, Frank O, Wienerroither S, Reiter F, Stark A (2015) Transcriptional regulators form diverse groups with context-dependent regulatory functions. *Nature* 528(7580):147–151. doi:10.1038/nature15545
75. Maston GA, Evans SK, Green MR (2006) Transcriptional regulatory elements in the human genome. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 7:29–59. doi:10.1146/annurev.genom.7.080505.115623
76. Kolovos P, Knoch TA, Grosveld FG, Cook PR, Papantonis A (2012) Enhancers and silencers: an integrated and simple model for their function. *Epigenetics Chromatin* 5(1):1. doi:10.1186/1756-8935-5-1
77. Sewitz SA, Fahmi Z, Lipkow K (2017) Higher order assembly: folding the chromosome. *Curr Opin Struct Biol* 42:162–168. doi:10.1016/j.sbi.2017.02.004
78. Lupiáñez DG, Kraft K, Heinrich V, Krawitz P, Brancati F, Klopocki E, Horn D, Kayserili H, Opitz JM, Laxova R, Santos-Simarro F, Gilbert-Dussardier B, Wittler L, Borschiwer M, Haas SA, Osterwalder M, Franke M, Timmermann B, Hecht J, Spielmann M, Visel A, Mundlos S (2015) Disruptions of topological chromatin domains cause pathogenic rewiring of gene-enhancer interactions. *Cell* 161(5):1012–1025. doi:10.1016/j.cell.2015.04.004
79. McCord RP, Nazario-Toole A, Zhang H, Chines PS, Zhan Y, Erdos MR, Collins FS, Dekker J, Cao K (2013) Correlated alterations in genome organization, histone methylation, and DNA-lamin A/C interactions in Hutchinson-Gilford progeria syndrome. *Genome Res* 23(2):260–269. doi:10.1101/gr.138032.112
80. Flavahan WA, Drier Y, Liao BB, Gillespie SM, Venteicher AS, Stemmer-Rachamimov AO, Suvà ML, Bernstein BE (2016) Insulator dysfunction and oncogene activation in IDH mutant gliomas. *Nature* 529(7584):110–114. doi:10.1038/nature16490
81. Kerscher O, Felberbaum R, Hochstrasser M (2006) Modification of proteins by ubiquitin and ubiquitin-like proteins. *Annu Rev Cell Dev Biol* 22:159–180. doi:10.1146/annurev.cellbio.22.010605.093503
82. Kitada T, Asakawa S, Hattori N, Matsumine H, Yamamura Y, Minoshima S, Yokochi M, Mizuno Y, Shimizu N (1998) Mutations in the parkin gene cause autosomal recessive juvenile parkinsonism. *Nature* 392(6676):605–608. doi:10.1038/33416
83. Panicker N, Dawson VL, Dawson TM (2017) Activation mechanisms of the E3 ubiquitin ligase parkin. *Biochem J* 474(18):3075–3086. doi:10.1042/BCJ20170476
84. Buiting K, Williams C, Horsthemke B (2016) Angelman syndrome - insights into a rare neurogenetic disorder. *Nat Rev Neurol* 12(10):584–593. doi:10.1038/nrneurol.2016.133
85. Rape M (2017) Ubiquitylation at the crossroads of development and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol*. doi:10.1038/nrm.2017.83
86. Craiu A, Gaczynska M, Akopian T, Gramm CF, Fenteany G, Goldberg AL, Rock KL (1997) Lactacystin and clasto-lactacystin beta-lactone modify multiple proteasome beta-subunits and inhibit intracellular protein degradation and major histocompatibility complex class I antigen presentation. *J Biol Chem* 272(20):13437–13445

87. Muratani M, Tansey WP (2003) How the ubiquitin-proteasome system controls transcription. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4(3):192–201. doi:10.1038/nrm1049
88. Aguilar RC, Wendland B (2003) Ubiquitin. Not just for proteasomes anymore. *Curr Opin Cell Biol* 15(2):184–190
89. Ciechanover A, Orian A, Schwartz AL (2000) The ubiquitin-mediated proteolytic pathway. Mode of action and clinical implications. *J Cell Biochem Suppl* 34:40–51
90. Aviel S, Winberg G, Massucci M, Ciechanover A (2000) Degradation of the Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 (LMP1) by the ubiquitin-proteasome pathway. Targeting via ubiquitination of the N-terminal residue. *J Biol Chem* 275(31):23491–23499. doi:10.1074/jbc.M002052200
91. Thrower JS, Hoffman L, Rechsteiner M, Pickart CM (2000) Recognition of the polyubiquitin proteolytic signal. *EMBO J* 19(1):94–102. doi:10.1093/emboj/19.1.94
92. Erogullari A, Hollstein R, Seibler P, Braunholz D, Koschmidder E, Depping R, Eckhold J, Lohnau T, Gillessen-Kaesbach G, Grünewald A, Rakovic A, Lohmann K, Kaiser FJ (2014) THAP1, the gene mutated in DYT6 dystonia, autoregulates its own expression. *Biochim Biophys Acta* 1839(11):1196–1204. doi:10.1016/j.bbagr.2014.07.019
93. Felgner PL, Gadek TR, Holm M, Roman R, Chan HW, Wenz M, Northrop JP, Ringold GM, Danielsen M (1987) Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84(21):7413–7417
94. Mandel M, Higa A (1992) Calcium-dependent bacteriophage DNA infection. *1970. Biotechnology* 24:198–201
95. Morrison DA (1977) Transformation in *Escherichia coli*. Cryogenic preservation of competent cells. *J Bacteriol* 132(1):349–351
96. Smith DB, Johnson KS (1988) Single-step purification of polypeptides expressed in *Escherichia coli* as fusions with glutathione S-transferase. *Gene* 67(1):31–40
97. Ito H, Fukuda Y, Murata K, Kimura A (1983) Transformation of intact yeast cells treated with alkali cations. *J Bacteriol* 153(1):163–168
98. Schiestl RH, Gietz RD (1989) High efficiency transformation of intact yeast cells using single stranded nucleic acids as a carrier. *Curr Genet* 16(5-6):339–346
99. Hill J, Donald KA, Griffiths DE, Donald G (1991) DMSO-enhanced whole cell yeast transformation. *Nucleic Acids Res* 19(20):5791
100. Gietz D, St Jean A, Woods RA, Schiestl RH (1992) Improved method for high efficiency transformation of intact yeast cells. *Nucleic Acids Res* 20(6):1425
101. Fields S, Song O (1989) A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature* 340(6230):245–246. doi:10.1038/340245a0
102. Chien CT, Bartel PL, Sternglanz R, Fields S (1991) The two-hybrid system. A method to identify and clone genes for proteins that interact with a protein of interest. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88(21):9578–9582
103. Brückner A, Polge C, Lentze N, Auerbach D, Schlattner U (2009) Yeast two-hybrid, a powerful tool for systems biology. *Int J Mol Sci* 10(6):2763–2788. doi:10.3390/ijms10062763
104. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74(12):5463–5467
105. Orlando V (2000) Mapping chromosomal proteins in vivo by formaldehyde-crosslinked-chromatin immunoprecipitation. *Trends Biochem Sci* 25(3):99–104
106. Houlden H, Schneider SA, Paudel R, Melchers A, Schwingenschuh P, Edwards M, Hardy J, Bhatia KP (2010) THAP1 mutations (DYT6) are an additional cause of early-onset dystonia. *Neurology* 74(10):846–850. doi:10.1212/WNL.0b013e3181d5276d
107. 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 (2012) Identification and functional analysis of novel THAP1 mutations. *Eur J Hum Genet* 20(2):171–175. doi:10.1038/ejhg.2011.159
108. Bressman SB, Raymond D, Fuchs T, Heiman GA, Ozelius LJ, Saunders-Pullman R (2009) Mutations in THAP1 (DYT6) in early-onset dystonia: a genetic screening study. *Lancet Neurol* 8(5):441–446. doi:10.1016/S1474-4422(09)70081-X
109. Paisán-Ruiz C, Ruiz-Martinez J, Ruibal M, Mok KY, Indakoetxea B, Gorostidi A, Martí Massó JF (2009) Identification of a novel THAP1 mutation at R29 amino-acid residue in sporadic patients with early-onset dystonia. *Mov Disord* 24(16):2428–2429. doi:10.1002/mds.22849
110. Song W, Chen Y, Huang R, Chen K, Pan P, Yang Y, Shang H-F (2011) Novel THAP1 gene mutations in patients with primary dystonia from southwest China. *J Neurol Sci* 309(1-2):63–67. doi:10.1016/j.jns.2011.07.023
111. Newman JRB, Lehn AC, Boyle RS, Silburn PA, Mellick GD (2013) Screening for rare sequence variants in the THAP1 gene in a primary dystonia cohort. *Mov Disord* 28(12):1752–1753. doi:10.1002/mds.25479
112. Cheng FB, Ozelius LJ, Wan XH, Feng JC, Ma LY, Yang YM, Wang L (2012) THAP1/DYT6 sequence variants in non-DYT1 early-onset primary dystonia in China and their effects on RNA expression. *J Neurol* 259(2):342–347. doi:10.1007/s00415-011-6196-5
113. Xiao J, Zhao Y, Bastian RW, Perlmutter JS, Racette BA, Tabbal SD, Karimi M, Paniello R, Blitzer A, Batish SD, Wszolek ZK, Uitti RJ, van Gerpen JA, Hedera P, Simon DK, Tarsy D, Truong DD, Frei KP, Pfeiffer RF, Gong S, LeDoux MS (2010) Novel human pathological mutations. Gene symbol: THAP1. Disease: dystonia 6. *Hum Genet* 127(4):470
114. Brunet A, Kanai F, Stehn J, Xu J, Sarbassova D, Frangioni JV, Dalal SN, DeCaprio JA, Greenberg ME, Yaffe MB (2002) 14-3-3 transits to the nucleus and participates in dynamic nucleocytoplasmic transport. *J Cell Biol* 156(5):817–828. doi:10.1083/jcb.200112059
115. Söhn AS, Glöckle N, Doetzer AD, Deuschl G, Felbor U, Topka HR, Schöls L, Riess O, Bauer P, Müller U, Grundmann K (2010) Prevalence of THAP1 sequence variants in German patients with primary dystonia. *Mov Disord* 25(12):1982–1986. doi:10.1002/mds.23207
116. Lu R, Misra V (2000) A second cellular protein interacts with herpes simplex virus accessory factor HCF in a manner similar to Luman and VP16. *Nucleic Acids Res* 28(12):2446–2454
117. Piluso D, Bilan P, Capone JP (2002) Host cell factor-1 interacts with and antagonizes transactivation by the cell cycle regulatory factor Miz-1. *J Biol Chem* 277(48):46799–46808. doi:10.1074/jbc.M206226200
118. Tyagi S, Chabes AL, Wysocka J, Herr W (2007) E2F Activation of S Phase Promoters via Association with HCF-1 and the MLL Family of Histone H3K4 Methyltransferases. *Molecular Cell* 27(1):107–119. doi:10.1016/j.molcel.2007.05.030
119. ENCODE Project Consortium (2012) An integrated encyclopedia of DNA elements in the human genome. *Nature* 489(7414):57–74. doi:10.1038/nature11247
120. Hollstein R, Parry DA, Nalbach L, Logan CV, Strom TM, Hartill VL, Carr IM, Korenke GC, Uppal S, Ahmed M, Wieland T, Markham AF, Bennett CP, Gillissen-Kaesbach G, Sheridan EG, Kaiser FJ, Bonthron DT (2015) HACE1 deficiency causes an autosomal recessive neurodevelopmental syndrome. *J Med Genet* 52(12):797–803. doi:10.1136/jmedgenet-2015-103344
121. Castillo-Lluva S, Tan C-T, Dugaard M, Sorensen PHB, Malliri A (2013) The tumour suppressor HACE1 controls cell migration by regulating Rac1 degradation. *Oncogene* 32(13):1735–1742. doi:10.1038/onc.2012.189
122. Torrino S, Visvikis O, Doye A, Boyer L, Stefani C, Munro P, Bertoglio J, Gacon G, Mettouchi A, Lemichez E (2011) The E3 ubiquitin-ligase HACE1 catalyzes the ubiquitylation of active Rac1. *Dev Cell* 21(5):959–965. doi:10.1016/j.devcel.2011.08.015
123. Dugaard M, Nitsch R, Razaghi B, McDonald L, Jarrar A, Torrino S, Castillo-Lluva S, Rotblat B, Li L, Malliri A, Lemichez E, Mettouchi A, Berman JN, Penninger JM, Sorensen PH (2013)

- Hace1 controls ROS generation of vertebrate Rac1-dependent NADPH oxidase complexes. *Nat Commun* 4:2180. doi:10.1038/ncomms3180
124. Gao Y, Dickerson JB, Guo F, Zheng J, Zheng Y (2004) Rational design and characterization of a Rac GTPase-specific small molecule inhibitor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(20):7618–7623. doi:10.1073/pnas.0307512101
  125. Campagne S, Saurel O, Gervais V, Milon A (2010) Structural determinants of specific DNA-recognition by the THAP zinc finger. *Nucleic Acids Res* 38(10):3466–3476. doi:10.1093/nar/gkq053
  126. Bateman E (1998) Autoregulation of eukaryotic transcription factors. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 60:133–168
  127. Serfling E (1989) Autoregulation--a common property of eukaryotic transcription factors? *Trends Genet* 5(5):131–133
  128. Arron JR, Winslow MM, Polleri A, Chang C-P, Wu H, Gao X, Neilson JR, Chen L, Heit JJ, Kim SK, Yamasaki N, Miyakawa T, Francke U, Graef IA, Crabtree GR (2006) NFAT dysregulation by increased dosage of DSCR1 and DYRK1A on chromosome 21. *Nature* 441(7093):595–600. doi:10.1038/nature04678
  129. Ibrahim DM, Hansen P, Rödelsperger C, Stiege AC, Doelken SC, Horn D, Jäger M, Janetzki C, Krawitz P, Leschik G, Wagner F, Scheuer T, Schmidt-von Kegler M, Seemann P, Timmermann B, Robinson PN, Mundlos S, Hecht J (2013) Distinct global shifts in genomic binding profiles of limb malformation-associated HOXD13 mutations. *Genome Res* 23(12):2091–2102. doi:10.1101/gr.157610.113
  130. Macfarlan T, Kutney S, Altman B, Montross R, Yu J, Chakravarti D (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* 280(8):7346–7358. doi:10.1074/jbc.M411675200
  131. DeJozé M, Krumenacker JS, Zitur LJ, Passeri M, Chu L-F, Songyang Z, Thomson JA, Zwaka TP (2008) Ronin is essential for embryogenesis and the pluripotency of mouse embryonic stem cells. *Cell* 133(7):1162–1174. doi:10.1016/j.cell.2008.05.047
  132. Heintzman ND, Hon GC, Hawkins RD, Kheradpour P, Stark A, Harp LF, Ye Z, Lee LK, Stuart RK, Ching CW, Ching KA, Antosiewicz-Bourget JE, Liu H, Zhang X, Green RD, Lobanenkov VV, Stewart R, Thomson JA, Crawford GE, Kellis M, Ren B (2009) Histone modifications at human enhancers reflect global cell-type-specific gene expression. *Nature* 459(7243):108–112. doi:10.1038/nature07829
  133. Woo YH, Li W-H (2012) Evolutionary conservation of histone modifications in mammals. *Mol Biol Evol* 29(7):1757–1767. doi:10.1093/molbev/mss022
  134. Mazars R, Gonzalez-de-Peredo A, Cayrol C, Lavigne A-C, Vogel JL, Ortega N, Lacroix C, Gautier V, Huet G, Ray A, Monsarrat B, Kristie TM, Girard J-P (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* 285(18):13364–13371. doi:10.1074/jbc.M109.072579
  135. Vinckevicius A, Parker JB, Chakravarti D (2015) Genomic Determinants of THAP11/ZNF143/HCF1 Complex Recruitment to Chromatin. *Mol Cell Biol* 35(24):4135–4146. doi:10.1128/MCB.00477-15
  136. Luciano RL, Wilson AC (2003) HCF-1 functions as a coactivator for the zinc finger protein Krox20. *J Biol Chem* 278(51):51116–51124. doi:10.1074/jbc.M303470200
  137. Deléhouzée S, Yoshikawa T, Sawa C, Sawada J-I, Ito T, Omori M, Wada T, Yamaguchi Y, Kabe Y, Handa H (2005) GABP, HCF-1 and YY1 are involved in Rb gene expression during myogenesis. *Genes Cells* 10(7):717–731. doi:10.1111/j.1365-2443.2005.00873.x
  138. Yu H-C, Sloan JL, Scharer G, Brebner A, Quintana AM, Achilly NP, Manoli I, Coughlin CR, Geiger EA, Schneck U, Watkins D, Suormala T, van Hove JLK, Fowler B, Baumgartner MR, Rosenblatt DS, Venditti CP, Shaikh TH (2013) An X-linked cobalamin disorder caused by

- mutations in transcriptional coregulator HCFC1. *Am J Hum Genet* 93(3):506–514. doi:10.1016/j.ajhg.2013.07.022
139. Wilson AC, LaMarco K, Peterson MG, Herr W (1993) The VP16 accessory protein HCF is a family of polypeptides processed from a large precursor protein. *Cell* 74(1):115–125
140. Wilson AC, Peterson MG, Herr W (1995) The HCF repeat is an unusual proteolytic cleavage signal. *Genes Dev* 9(20):2445–2458
141. Bhuiyan T, Waridel P, Kapuria V, Zoete V, Herr W (2015) Distinct OGT-Binding Sites Promote HCF-1 Cleavage. *PLoS ONE* 10(8):e0136636. doi:10.1371/journal.pone.0136636
142. Hollstein R, Reiz B, Kötter L, Richter A, Schaake S, Lohmann K, Kaiser FJ (2017) Dystonia-causing mutations in the transcription factor THAP1 disrupt HCFC1 cofactor recruitment and alter gene expression. *Hum Mol Genet*. doi:10.1093/hmg/ddx187
143. Michaud J, Praz V, James Faresse N, Jnbaptiste CK, Tyagi S, Schütz F, Herr W (2013) HCFC1 is a common component of active human CpG-island promoters and coincides with ZNF143, THAP11, YY1, and GABP transcription factor occupancy. *Genome Res* 23(6):907–916. doi:10.1101/gr.150078.112
144. Lundberg SM, Tu WB, Raught B, Penn LZ, Hoffman MM, Lee S-I (2016) ChromNet: Learning the human chromatin network from all ENCODE ChIP-seq data. *Genome Biol* 17:82. doi:10.1186/s13059-016-0925-0
145. Sengel C, Gavarini S, Sharma N, Ozelius LJ, Bragg DC (2011) Dimerization of the DYT6 dystonia protein, THAP1, requires residues within the coiled-coil domain. *J Neurochem* 118(6):1087–1100. doi:10.1111/j.1471-4159.2011.07386.x
146. Richter A, Hollstein R, Hebert E, Vulinovic F, Eckhold J, Osmanovic A, Depping R, Kaiser FJ, Lohmann K (2017) In-depth Characterization of the Homodimerization Domain of the Transcription Factor THAP1 and Dystonia-Causing Mutations Therein. *J Mol Neurosci* 62(1):11–16. doi:10.1007/s12031-017-0904-2
147. Burkhard P, Stetefeld J, Strelkov SV (2001) Coiled coils. A highly versatile protein folding motif. *Trends Cell Biol* 11(2):82–88
148. Akawi N, McRae J, Ansari M et al (2015) Discovery of four recessive developmental disorders using probabilistic genotype and phenotype matching among 4,125 families. *Nat Genet* 47(11):1363–1369. doi:10.1038/ng.3410
149. Anglesio MS, Evdokimova V, Melnyk N, Zhang L, Fernandez CV, Grundy PE, Leach S, Marra MA, Brooks-Wilson AR, Penninger J, Sorensen PHB (2004) Differential expression of a novel ankyrin containing E3 ubiquitin-protein ligase, Hace1, in sporadic Wilms' tumor versus normal kidney. *Hum Mol Genet* 13(18):2061–2074. doi:10.1093/hmg/ddh215
150. Hibi K, Sakata M, Sakuraba K, Shirahata A, Goto T, Mizukami H, Saito M, Ishibashi K, Kigawa G, Nemoto H, Sanada Y (2008) Aberrant methylation of the HACE1 gene is frequently detected in advanced colorectal cancer. *Anticancer Res* 28(3A):1581–1584
151. Zhang L, Chen X, Sharma P, Moon M, Sheftel AD, Dawood F, Nghiem MP, Wu J, Li R-K, Gramolini AO, Sorensen PH, Penninger JM, Brumell JH, Liu PP (2014) HACE1-dependent protein degradation provides cardiac protection in response to haemodynamic stress. *Nat Commun* 5:3430. doi:10.1038/ncomms4430
152. Lachance V, Degrandmaison J, Marois S, Robitaille M, Génier S, Nadeau S, Angers S, Parent J-L (2014) Ubiquitylation and activation of a Rab GTPase is promoted by a  $\beta_2$ AR-HACE1 complex. *J Cell Sci* 127(Pt 1):111–123. doi:10.1242/jcs.132944
153. Liu Z, Chen P, Gao H, Gu Y, Yang J, Peng H, Xu X, Wang H, Yang M, Liu X, Fan L, Chen S, Zhou J, Sun Y, Ruan K, Cheng S, Komatsu M, White E, Li L, Ji H, Finley D, Hu R (2014) Ubiquitylation of autophagy receptor Optineurin by HACE1 activates selective autophagy for tumor suppression. *Cancer Cell* 26(1):106–120. doi:10.1016/j.ccr.2014.05.015
154. Zhao J, Zhang Z, Vucetic Z, Soprano KJ, Soprano DR (2009) HACE1: A novel repressor of RAR transcriptional activity. *J Cell Biochem* 107(3):482–493. doi:10.1002/jcb.22146

155. Tang D, Xiang Y, Renzis S de, Rink J, Zheng G, Zerial M, Wang Y (2011) The ubiquitin ligase HACE1 regulates Golgi membrane dynamics during the cell cycle. *Nat Commun* 2:501. doi:10.1038/ncomms1509
156. Mettouchi A, Lemichez E (2012) Ubiquitylation of active Rac1 by the E3 ubiquitin-ligase HACE1. *Small GTPases* 3(2):102–106. doi:10.4161/sgtp.19221
157. Iimura A, Yamazaki F, Suzuki T, Endo T, Nishida E, Kusakabe M (2016) The E3 ubiquitin ligase Hace1 is required for early embryonic development in *Xenopus laevis*. *BMC Dev Biol* 16(1):31. doi:10.1186/s12861-016-0132-y
158. Nagy E, Maquat LE (1998) A rule for termination-codon position within intron-containing genes. When nonsense affects RNA abundance. *Trends Biochem Sci* 23(6):198–199
159. Neu-Yilik G, Amthor B, Gehring NH, Bahri S, Paidassi H, Hentze MW, Kulozik AE (2011) Mechanism of escape from nonsense-mediated mRNA decay of human beta-globin transcripts with nonsense mutations in the first exon. *RNA* 17(5):843–854. doi:10.1261/rna.2401811
160. Byers PH (2002) Killing the messenger: new insights into nonsense-mediated mRNA decay. *J Clin Invest* 109(1):3–6. doi:10.1172/JCI14841
161. Ohno K, Takeda J-I, Masuda A (2017) Rules and tools to predict the splicing effects of exonic and intronic mutations. *Wiley Interdiscip Rev RNA*. doi:10.1002/wrna.1451
162. Wang J, Chang YF, Hamilton JI, Wilkinson MF (2002) Nonsense-associated altered splicing. A frame-dependent response distinct from nonsense-mediated decay. *Molecular Cell* 10(4):951–957
163. Cartegni L, Chew SL, Krainer AR (2002) Listening to silence and understanding nonsense: exonic mutations that affect splicing. *Nat Rev Genet* 3(4):285–298. doi:10.1038/nrg775
164. Goka ET, Lippman ME (2015) Loss of the E3 ubiquitin ligase HACE1 results in enhanced Rac1 signaling contributing to breast cancer progression. *Oncogene* 34(42):5395–5405. doi:10.1038/onc.2014.468
165. Polakis PG, Weber RF, Nevins B, Didsbury JR, Evans T, Snyderman R (1989) Identification of the ral and rac1 gene products, low molecular mass GTP-binding proteins from human platelets. *J Biol Chem* 264(28):16383–16389
166. Ueda S, Kitazawa S, Ishida K, Nishikawa Y, Matsui M, Matsumoto H, Aoki T, Nozaki S, Takeda T, Tamori Y, Aiba A, Kahn CR, Kataoka T, Satoh T (2010) Crucial role of the small GTPase Rac1 in insulin-stimulated translocation of glucose transporter 4 to the mouse skeletal muscle sarcolemma. *FASEB J* 24(7):2254–2261. doi:10.1096/fj.09-137380
167. Ray RM, Guo H, Patel M, Jin S, Bhattacharya S, Johnson LR (2007) Role of myosin regulatory light chain and Rac1 in the migration of polyamine-depleted intestinal epithelial cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 292(4):G983-95. doi:10.1152/ajpgi.00356.2006
168. Xiang RF, Stack D, Huston SM, Li SS, Ogbomo H, Kyei SK, Mody CH (2016) Ras-related C3 Botulinum Toxin Substrate (Rac) and Src Family Kinases (SFK) Are Proximal and Essential for Phosphatidylinositol 3-Kinase (PI3K) Activation in Natural Killer (NK) Cell-mediated Direct Cytotoxicity against *Cryptococcus neoformans*. *J Biol Chem* 291(13):6912–6922. doi:10.1074/jbc.M115.681544
169. Sundaresan M, Yu ZX, Ferrans VJ, Sulciner DJ, Gutkind JS, Irani K, Goldschmidt-Clermont PJ, Finkel T (1996) Regulation of reactive-oxygen-species generation in fibroblasts by Rac1. *Biochem J* 318 (Pt 2):379–382
170. Manser E, Leung T, Salihuddin H, Zhao ZS, Lim L (1994) A brain serine/threonine protein kinase activated by Cdc42 and Rac1. *Nature* 367(6458):40–46. doi:10.1038/367040a0
171. Martin GA, Bollag G, McCormick F, Abo A (1995) A novel serine kinase activated by rac1/CDC42Hs-dependent autophosphorylation is related to PAK65 and STE20. *EMBO J* 14(17):4385

172. Stankiewicz TR, Linseman DA (2014) Rho family GTPases: key players in neuronal development, neuronal survival, and neurodegeneration. *Front Cell Neurosci* 8:314. doi:10.3389/fncel.2014.00314
173. van Bokhoven H (2011) Genetic and epigenetic networks in intellectual disabilities. *Annu Rev Genet* 45:81–104. doi:10.1146/annurev-genet-110410-132512
174. Pengelly RJ, Greville-Heygate S, Schmidt S, Seaby EG, Jabalameli MR, Mehta SG, Parker MJ, Goudie D, Fagotto-Kaufmann C, Mercer C, Debant A, Ennis S, Baralle D (2016) Mutations specific to the Rac-GEF domain of TRIO cause intellectual disability and microcephaly. *J Med Genet*. doi:10.1136/jmedgenet-2016-103942
175. Lelieveld SH, Reijnders MRF, Pfundt R, Yntema HG, Kamsteeg E-J, Vries P de, Vries BBA de, Willemsen MH, Kleefstra T, Löhner K, Vreeburg M, Stevens SJC, van der Burgt I, Bongers EMHF, Stegmann APA, Rump P, Rinne T, Nelen MR, Veltman JA, Vissers LELM, Brunner HG, Gilissen C (2016) Meta-analysis of 2,104 trios provides support for 10 new genes for intellectual disability. *Nat Neurosci* 19(9):1194–1196. doi:10.1038/nn.4352
176. Kaartinen V, Gonzalez-Gomez I, Voncken JW, Haataja L, Faure E, Nagy A, Groffen J, Heisterkamp N (2001) Abnormal function of astroglia lacking Abr and Bcr RacGAPs. *Development* 128(21):4217–4227
177. Donald S, Humby T, Fyfe I, Segonds-Pichon A, Walker SA, Andrews SR, Coadwell WJ, Emson P, Wilkinson LS, Welch HCE (2008) P-Rex2 regulates Purkinje cell dendrite morphology and motor coordination. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105(11):4483–4488. doi:10.1073/pnas.0712324105
178. Yagi S, Matsuda M, Kiyokawa E (2012) Chimaerin suppresses Rac1 activation at the apical membrane to maintain the cyst structure. *PLoS ONE* 7(12):e52258. doi:10.1371/journal.pone.0052258
179. Azzarelli R, Oleari R, Lettieri A, Andre' V, Cariboni A (2017) In Vitro, Ex Vivo and In Vivo Techniques to Study Neuronal Migration in the Developing Cerebral Cortex. *Brain Sci* 7(5). doi:10.3390/brainsci7050048
180. Hori K, Hoshino M (2017) Neuronal Migration and AUTS2 Syndrome. *Brain Sci* 7(5). doi:10.3390/brainsci7050054
181. Marín O, Rubenstein JLR (2003) Cell migration in the forebrain. *Annu Rev Neurosci* 26:441–483. doi:10.1146/annurev.neuro.26.041002.131058
182. Mulherkar S, Uddin MD, Couvillon AD, Sillitoe RV, Tolias KF (2014) The small GTPases RhoA and Rac1 regulate cerebellar development by controlling cell morphogenesis, migration and foliation. *Dev Biol* 394(1):39–53. doi:10.1016/j.ydbio.2014.08.004
183. Liu S, Kapoor M, Leask A (2009) Rac1 expression by fibroblasts is required for tissue repair in vivo. *Am J Pathol* 174(5):1847–1856. doi:10.2353/ajpath.2009.080779
184. Ardhanareeswaran K, Mariani J, Coppola G, Abyzov A, Vaccarino FM (2017) Human induced pluripotent stem cells for modelling neurodevelopmental disorders. *Nat Rev Neurol* 13(5):265–278. doi:10.1038/nrneurol.2017.45
185. MEYER A, BECK E (1955) The hippocampal formation in temporal lobe epilepsy. *Proc R Soc Med* 48(6):457–462
186. Chang C, Huang C, Zhou N, Li SX, Hoef L ver, Gao Y (2017) The bumps under the hippocampus. *Hum Brain Mapp*. doi:10.1002/hbm.23856
187. Golden JA (2001) Cell migration and cerebral cortical development. *Neuropathol Appl Neurobiol* 27(1):22–28
188. Rotblat B, Southwell AL, Ehrnhoefer DE, Skotte NH, Metzler M, Franciosi S, Leprivier G, Somasekharan SP, Barokas A, Deng Y, Tang T, Mathers J, Cetinbas N, Daugaard M, Kwok B, Li L, Carnie CJ, Fink D, Nitsch R, Galpin JD, Ahern CA, Melino G, Penninger JM, Hayden MR, Sorensen PH (2014) HACE1 reduces oxidative stress and mutant Huntingtin toxicity by promoting the NRF2 response. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111(8):3032–3037. doi:10.1073/pnas.1314421111

189. Covarrubias-Pinto A, Moll P, Solís-Maldonado M, Acuña AI, Riveros A, Miró MP, Papic E, Beltrán FA, Cepeda C, Concha II, Brauchi S, Castro MA (2015) Beyond the redox imbalance: Oxidative stress contributes to an impaired GLUT3 modulation in Huntington's disease. *Free Radic Biol Med* 89:1085–1096. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2015.09.024
190. Emerit J, Edeas M, Bricaire F (2004) Neurodegenerative diseases and oxidative stress. *Biomed Pharmacother* 58(1):39–46
191. Liu Z, Zhou T, Ziegler AC, Dimitrion P, Zuo L (2017) Oxidative Stress in Neurodegenerative Diseases: From Molecular Mechanisms to Clinical Applications. *Oxid Med Cell Longev* 2017:2525967. doi:10.1155/2017/2525967
192. Moloney JN, Cotter TG (2017) ROS signalling in the biology of cancer. *Semin Cell Dev Biol*. doi:10.1016/j.semcdb.2017.05.023
193. Islam MT (2017) Oxidative stress and mitochondrial dysfunction-linked neurodegenerative disorders. *Neurol Res* 39(1):73–82. doi:10.1080/01616412.2016.1251711
194. Song G, Napoli E, Wong S, Hagerman R, Liu S, Tassone F, Giulivi C (2016) Altered redox mitochondrial biology in the neurodegenerative disorder fragile X-tremor/ataxia syndrome: use of antioxidants in precision medicine. *Mol Med* 22. doi:10.2119/molmed.2016.00122
195. Lima-Cabello E, Garcia-Guirado F, Calvo-Medina R, el Bekay R, Perez-Costillas L, Quintero-Navarro C, Sanchez-Salido L, Diego-Otero Y de (2016) An Abnormal Nitric Oxide Metabolism Contributes to Brain Oxidative Stress in the Mouse Model for the Fragile X Syndrome, a Possible Role in Intellectual Disability. *Oxid Med Cell Longev* 2016:8548910. doi:10.1155/2016/8548910
196. Valenti D, Braidy N, Rasmussen D, Signorile A, Rossi L, Atanasov AG, Volpicella M, Henrion-Caude A, Nabavi SM, Vacca RA (2017) Mitochondria as pharmacological targets in Down syndrome. *Free Radic Biol Med*. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2017.08.014
197. Morimoto M, Satomura S, Hashimoto T, Kyotani S (2017) A study of oxidative stress and the newer antiepileptic drugs in epilepsy associated with severe motor and intellectual disabilities. *J Chin Med Assoc* 80(1):19–28. doi:10.1016/j.jcma.2016.10.005
198. Gimeno A, García-Giménez JL, Audí L, Toran N, Andaluz P, Dasí F, Viña J, Pallardó FV (2014) Decreased cell proliferation and higher oxidative stress in fibroblasts from Down Syndrome fetuses. Preliminary study. *Biochim Biophys Acta* 1842(1):116–125. doi:10.1016/j.bbadis.2013.10.014
199. Reijnders MRF, Anson NM, Kousi M, Yue WW, Tan PL, Clarkson K, Clayton-Smith J, Corning K, Jones JR, Lam WWK, Mancini GMS, Marcelis C, Mohammed S, Pfundt R, Roifman M, Cohn R, Chitayat D, Millard TH, Katsanis N, Brunner HG, Banka S (2017) RAC1 Missense Mutations in Developmental Disorders with Diverse Phenotypes. *Am J Hum Genet* 101(3):466–477. doi:10.1016/j.ajhg.2017.08.007
200. Andrio E, Lotte R, Hamaoui D, Cherfils J, Doye A, Daugaard M, Sorensen PH, Bost F, Ruimy R, Mettouchi A, Lemichez E (2017) Identification of cancer-associated missense mutations in *hace1* that impair cell growth control and *Rac1* ubiquitylation. *Sci Rep* 7:44779. doi:10.1038/srep44779

## 7 Anhang

### A1 Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
A260	Absorption bei 260 nm
A280	Absorption bei 280 nm
acH3	acetyliertes Histon 3
Abb.	Abbildung
ad	autosomal dominant
AD	Aktivierungsdomäne
Ade	Adenin
AR	autosomal rezessiv
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
Bzw.	Beziehungsweise
°C	Grad Celsius
Ca.	circa
CCD	Coiled-Coil Domäne
cDNA	Komplementäre DNA ( <i>complementary DNA</i> )
CGH	<i>Comparative genomic hybridization</i>
ChIP	Chromatin Immunpräzipitation
ChIP-Seq	Chromatin Immunpräzipitation mit Sequenzierung
cm	centimetre
DBD	DNA-Bindedomäne
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DMEM	Dulbecco`s Modified Eagle`s Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
dsDNA	Doppelstrang-DNA
dNTP	Desoxyribonukleinsäuretriphosphat
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkultur
DTT	Dithiothreitol
DYT	Dystonie
DYT1	Dystonie1
DYT6	Dystonie6
DYT-THAP1	Dystonie-THAP1
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGTA	Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure
ENCODE	<i>Encyclopedia of DNA Elements</i>
<i>et al.</i>	und andere
evtl.	eventuell
FBS	<i>fetal bovine serum</i> , Fetales Kälberserum
G	Guanin
GDP	Guanin-Diphosphat
GFP	<i>Green fluorescent protein</i>
GST	Glutathion-S-Transferase
GTP	Guanin-Triphosphat
GTPase	Guanin-Triphosphatase
h	Stunde
HACE1	<i>HECT domain and ankyrin repeat-containing E3 ubiquitin-protein ligase 1</i>
HBM	<i>HCFC1-binding motif</i> , HCFC1-Bindemotiv

HCFC1	<i>Host Cell Factor C1</i>
HCl	Salzsäure
HDAC3	Histondeacteylase 3
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure
His	Histidin
HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i> , Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
HRP	<i>horse radish peroxidase</i> , Meerrettich-Peroxidase
IgG	Immunglobulin G
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
kb	Kilobase
KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilodalton
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Kaliumdihydrogenphosphat
l	Liter
LB	Luria Bertani
Leu	Leucin
LiCl	Liziumchlorid
m	Meter
M	Mol pro Liter, Molar
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µM	Mikromolar
MCS	<i>Multiple cloning site</i>
mg	Milligramm
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid
min	Minuten
ml	Milliliter
mM	Millimolar
mRNA	<i>Messenger Ribonucleid acid</i>
MW	Molekulargewicht
NaCl	Natriumchlorid
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Natriumdihydrogenphosphat
NaOH	Natriumhydroxid
ng	Nanogramm
NGS	<i>Next Generation Sequencing</i>
NK	Negativkontrolle
NLS	<i>nuclear localization signal</i> , Kernlokalisations-Signal
nM	Nanomolar
nm	Nanometer
NMD	<i>Nonsense-mediated decay</i>
NP-40	Nonidet-P40
OD	optische Dichte
OMIM	<i>Online Mendelian Inheritance in Men</i>
ORF	open reading frame, offener Leserahmen
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	<i>Phosphate-buffered saline</i>
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PhD	<i>Permanent Head Damage</i>
PRR	Prolin-reiche Region
PVDF	Polycynylidenfluorid
qPCR	quantitative RealTime PCR

RAC1	<i>Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1</i>
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	<i>rotations per minute</i> (Umdrehungen pro Minute)
RPMI	Rowell Park Memorial Institute
ROS	<i>reactive oxygen species</i>
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse-Transkriptase-PCR
s	Sekunde
SDS	Natriumdodecylsulfat ( <i>sodium dodecyl sulfate</i> )
SMC	<i>Structural maintenance of chromosomes</i>
ssRNA	<i>single-stranded RNA</i> , Einzelstrang-RNA
T	Thymin
TE-Puffer	TRIS-EDTA Puffer
Taq	<i>Tehermus aquaticus</i>
TBE-Puffer	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TEMED	Tentramethylethylendiamin
THABS	THAP1-binding sequence
THAP1	Thanatos-associated domain-containing apoptosis-associated protein 1
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
Trp	Tryptophan
TSS	Transkriptionsstartstelle
U	Units
u.a.	unter anderem
UAS	<i>Upstream Activation Sequence</i>
UCSC	<i>University of California, Santa Cruz</i>
UV	Ultraviolett
V	Volt
v/v	Volumen pro Volumen
W	Watt
WES	<i>Whole Exome Sequencing</i>
w/v	Gewicht pro Volumen
WT	Wildtyp
Y2H	<i>Yeast-two-Hybrid</i>
YPD	<i>Yeast Extract Peptone Dextrose</i>
z.B.	zum Beispiel

## A2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung	Seite
Abbildung 2.3.1: Schematische Darstellung der funktionellen Domänen des Transkriptionsfaktors THAP1	15
Abbildung 3.2.1: Schematische Darstellung des Hefe-zwei-Hybrid-Assay	37
Abbildung 3.2.2: Fragmentiertes Chromatin	51
Abbildung 4.1.1: THAP1 bindet seinen eigenen Promotor	64
Abbildung 4.1.2: Ektopisch exprimiertes THAP1 reprimiert die Expression des n <i>THAP1</i> -Gens	65
Abbildung 4.1.3: Untersuchte THAP1 Mutationen der Coiled-Coil-Domäne und Beladung der Gluthation-Sepharose	67
Abbildung 4.1.4: GST-Pulldown zur Untersuchung des Effekts von <i>THAP1</i> -Mutationen auf die Homodimerisierung	68
Abbildung 4.1.5: Der Einfluss von <i>THAP1</i> -Mutationen auf die Interaktion mit HDAC3	70
Abbildung 4.1.6: siRNA-vermittelte Reduktion von HDAC3 führt zu einer verstärkten Acetylierung der Histone innenhalb des <i>THAP1</i> -Promotors	71
Abbildung 4.1.7: Charakterisierung der Interaktion zwischen THAP1 und YWHAE	73
Abbildung 4.1.8: Lokalisation von THAP1 und YWHAE in transient transfizierten HeLa Zellen	74
Abbildung 4.1.9:: Verlust der Interaktion von THAP1 und HCFC1 durch Mutationen in der Bindedomäne	76
Abbildung 4.1.10: siRNA-vermittelte Repression von HCFC1 führt zu einem Anstieg der <i>THAP1</i> Expression	77
Abbildung 4.1.11: Exemplarische Darstellung der Überlappenden Bindestelle von HCFC1 und THAP1 am THAP1 Promotor	78
Abbildung 4.1.12: Genom-weite <i>in-silico</i> Analyse der THAP1 und HCFC1 Bindestellen	79
Abbildung 4.1.13: THAP1-vermittelte Rekrutierung von HCFC1 an gemeinsame Zielpromotoren	80
Abbildung 4.2.1: Stammbäume HACE1-Defizienz	83
Abbildung 4.2.2: Schematische Darstellung des HACE1-Proteins	85
Abbildung 4.2.3: Verifikation der WES-Daten mittels Sanger-Sequenzierung	86
Abbildung 4.2.4: Verifizierung der Mutationen auf RNA-Ebene	87
Abbildung 4.2.5: Mutationen in <i>HACE1</i> führen zu alternativen Transkripten	88
Abbildung 4.2.5. Untersuchung der Proteinlevel in HACE1-defizienten Fibroblasten	89
Abbildung 4.2.6: Das Migrationsverhalten von Fibroblasten mit HACE1-Defizienz	91
Abbildung 4.2.7: Erhöhter oxidativer Stress in HACE1-defizienten Patientenzellen	93
Abbildung 5.1.1: Schematische Darstellung von THAP1 mit den in dieser Arbeit untersuchten Mutationen	95

Abbildung 5.1.2: Modell der THAP1-Autoregulation in Trägern heterozygoter Mutationen	98
Abbildung 5.1.3: Schematische Darstellung von THAP1 mit den in dieser Arbeit untersuchten Mutationen	105
Abbildung 5.1.4 Modell der THAP1 vermittelten Rekrutierung von HCFC1	107
Abbildung 5.1.5: Schematische Darstellung von THAP1 mit den in dieser Arbeit untersuchten Mutationen	109

### **A3 Tabellenverzeichnis**

Tabelle	Seite
Tabelle 2.1: Isolierte und kombinierte Formen von Dystonie mit etablierter genetischer Ursache	10
Tabelle 4.1 Klinische Auffälligkeiten der Patienten von Familie A	84

## **A4 Material- und Gerätehersteller**

Im Folgenden sind die Firmensitze der Material- und Gerätehersteller aufgelistet:

**5** PRIME (Hamburg, Deutschland),  
**Abcam** (Cambridge, UK), **ABM Greiffenberger Antriebstechnik GmbH** (Markredwitz, Deutschland), **Ambion** (Austin, TX, USA), **Amersham Pharmacia** (Freiburg, Deutschland), **Amersham Bioscience** (Upsala, Schweden), **AppliChem** (Darmstadt, Deutschland), **Applied Biosystems** (Freiburg, Deutschland), **Ascenion GmbH** (München, Deutschland),  
**Bandelin electronic** (Berlin, Deutschland), **B. Braun Melsungen AG** (Melsungen, Deutschland), **Beckman Coulter** (Krefeld, Deutschland), **Becton Dickinson** (Heidelberg, Deutschland), **Bender & Hobein AG** (Zürich, Schweiz), **Berthold Technologies** (Bad Wildbad, Deutschland) **Biochrom**, (Berlin, Deutschland), **Bioline** (Luckenwalde, Deutschland), **Biomers** (Ulm, Deutschland), **Biometra** (Göttingen, Deutschland), **Biomol GmbH** (Hamburg, Deutschland), **BioRad** (München, Deutschland), **Biostad-Pharmacia** (Quebec, Kanada), **Biotec-Fischer** (Reiskirchen, Deutschland), **Biosciences** (St. Louis, MO, USA), **Bosch** (Gerlingen-Schillerhöhe, Deutschland), **Brand** (Wertheim, Deutschland),  
**Cambrex** (East Rutherford, NJ, USA), **Canon** (Krefeld, Deutschland), **Carl Zeiss AG** (Oberkochen, Deutschland), **DakoCytomation** (Hamburg, Deutschland), **DNASStar Lasergene** (Madison, WI, USA), **Chromotek** (Planegg-Martinsried, Deutschland),  
**Dürr Medical** (Bietigheim-Bissingen, Deutschland), **Diagenode** (Liège, Belgien), **DNR-Biolmaging Systems** (Jerusalem, Israel)  
**Eppendorf** (Hamburg, Deutschland),  
**Fermentas** (St. Leon-Rot, Deutschland), **Finnzymes** (Espoo, Finnland), **Fisher Bioblock Scientific** (Illkirch-graffenstaden, Frankreich), **Fluka** (Buchs, Deutschland), **Forma Scientific** (Marietta, OH, USA), **Fuji** (Düsseldorf, Deutschland),  
**GE Healthcare** (München, Deutschland), **Geyer** (Renningen, Deutschland), **GFL** (Burgwedel, Deutschland), **Gibco** (Karlsruhe, Deutschland), **Gilson** (Middleton, WI, USA), **Greiner** (Frickenhausen, Deutschland),  
**H + P Labortechnik** (Oberschlieyheim, Deutschland), **Hartmann Analytic** (Braunschweig, Deutschland), **Heidolph** (Schwalbach, Deutschland), **Heinz Heren Medizinalbedarf GmbH** (Hamburg, Deutschland), **Hellma** (Jena, Deutschland), **Heraeus Instruments** (Hanau, Deutschland), **Herolab** (Wiesloch, Deutschland), **Hettich** (Tuttlingen, Deutschland), **Hirschmann** (Eberstadt, Deutschland), **Hoefer** (San Francisco, CA, USA),  
**Invitrogen** (Karlsruhe, Deutschland),  
**Jahnke & Kunkel** (Staufen, Deutschland), **Jena Bioscience** (Jena, Deutschland), **J.T. Baker** (Deventer, Niederlande),  
**Kartell** (Italien), **Kern & Sohn GmbH** (Balingen-Frommern, Deutschland), **(Kirsch** (Offenburg, Deutschland), **KnF Neuberger** (Freiburg, Deutschland), **Kodak** (Rochester NY, USA), **Köttermann** (Uetze/Hänigsen, Deutschland), **Kübler** (Deutschland),  
**Leitz** (Stuttgart, Deutschland), **Liebherr** (Ochsenhausen, Deutschland), **Life Technologies** (Darmstadt, Deutschland), **LKB** (Bromma, Schweden),  
**Macherey & Nagel** (Düren, Deutschland), **Merck** (Darmstadt, Deutschland), **Memmert** (Schwabach, Deutschland), **Millipore** (Schwalbach, Deutschland), **Miltenyi** (Bergisch Gladbach, Deutschland), **Molecular Dynamics** (Sunnyvale, CA, USA), **MP Biomedicals, LLC** (Illkirch, Frankreich),  
**New Brunswick Scientific** (Edison, NJ, USA), **New England Biolabs** (Ipswich, MA, USA), **NH DyeAGNOSTICS** (Halle, Germany), **Nippon Genetics Europe** (Düren, Deutschland), **Nonlinear dynamics** (Newcastle, UK), **Novartis** (Cambridge, USA), **Nunc** (Langenselbold, Deutschland), **Peqlab** (Erlangen, Deutschland), **PAA Laboratories** (Pasching, Österreich), **PCE Deutschland GmbH** (Meschede, Deutschland), **Perkin-Elmer** (Boston, MA, USA), **pfm medical AG** (Köln, Deutschland), **Promega** (Mannheim, Deutschland),

**Qiagen** (Hilden, Deutschland),  
**Raytest Isotopenmessgeräte GmbH** (Straubenhardt, Deutschland), **Renner GmbH** (Dannstadt, Deutschland), **Ricoh Imaging K.K** (Tokyo, Japan), **Roche** (Basel, Schweiz), **Roth** (Karlsruhe, Deutschland),  
**Santa Cruz Biotechnology** (Heidelberg, Deutschland), **Sarstedt** (Nümbrecht, Deutschland), **Sanyo** (München, Deutschland), **Sartorius** (Göttingen, Deutschland), **Savant** (Midland, MI, USA), **ScalTec** (Göttingen, Deutschland), **Sci Ed Central** (Cary, NC, USA), **Schleicher & Schüll** (Dassel, Deutschland), **Schmidt + Haench & Co.** (Berlin, Deutschland), **Schott** (Darmstadt, Deutschland), **Scotsman** (Vernon Hills, IL, USA), **Serva** (Heidelberg, Deutschland), **Siemens**, München, Deutschland), **Sigma-Aldrich** (Deisenhof, Deutschland), **SLT Labinstruments GmbH** (Achterwehr, Deutschland), **SONY** (Los Angeles, USA), **Spectrum** (Breda, Niederlande), **Starlab** (Hamburg, Deutschland),  
**Takara Clontech** (Saint-Germain-en-Laye, Frankreich), **Technelysium Pty Ltd** (South Brisbane, Australia), **Thermo Fisher Scientific** (Rockford, IL, USA),  
**USB** (High Wycombe, United Kingdom),  
**Vilber Lourmat** (Eberhardzell, Deutschland),  
**Waters** (Eschborn, Deutschland), **Welch** (Wisconsin, USA), **Werner Hassa GmbH** (Lübeck, Deutschland), **Webeco** (Selmsdorf, Deutschland), **Whatman** (Dassel, Deutschland),  
**Ziegler** (Isernhagen, Deutschland).

Ægð f'haðil moðn ðirjeth taðnværdð.

~

Conquer with courage rather than strength.