

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

Funktionelle Charakterisierung des THAP1-Proteins und DYT6-verursachender Mutationen

Inauguraldissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde
der Universität zu Lübeck

- Aus der Sektion Naturwissenschaften –



vorgelegt von
Alev Erogullari
aus Hamburg

Lübeck, 2013

Erste Berichterstatterin: Priv.-Doz. Dr. Katja Lohmann

Zweiter Berichtstatter: Prof. Dr. Enno Hartmann

Tag der mündlichen Prüfung: 27. Mai 2013

Zum Druck genehmigt. Lübeck, den 30. Mai 2013

Inhaltsverzeichnis

1	Zusammenfassung dieser Arbeit	1
1.1	Zusammenfassung.....	1
1.2	Abstract.....	3
2	Einleitung	5
2.1	Klinik und Genetik der Dystonien	5
2.1.1	Verschiedene Formen der Dystonien	5
2.1.2	Die Dystonie 6.....	8
2.2	Das <i>THAP1</i> -Gen und sein Genprodukt	9
2.3	Der Transkriptionsfaktor THAP1.....	10
2.4	Die Transkriptionsregulation in Eukaryoten	12
2.5	Vorarbeiten	14
2.6	Ziel dieser Arbeit	15
3	Materialien und Methoden	17
3.1	Materialien	17
3.1.1	Geräte.....	17
3.1.2	Verbrauchsmaterialien	18
3.1.3	Chemikalien	19
3.1.4	Rekombinante Proteine.....	21
3.1.5	Lösungen und Puffer	21
3.1.5.1	DNA-Extraktion in kleinem Maßstab (Mini-Präparation).....	21
3.1.5.2	Agarosegelelektrophorese.....	21
3.1.5.3	Bradford-Assay, SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese und Westernblot...22	
3.1.5.4	Herstellung chemisch kompetenter Bakterien.....	23
3.1.5.5	Transformation von Hefezellen	23
3.1.5.6	β -Galactosidase-Quantifizierung	23
3.1.5.7	Calciumphosphat-Transfektion	23
3.1.5.8	Zellysepuffer	24
3.1.5.9	Extraktion und Fragmentierung von Chromatin.....	24
3.1.5.10	Chromatin-Immunpräzipitation (ChIP)	25
3.1.5.11	<i>Electromobility Shift Assay</i> (EMSA)	25
3.1.5.12	<i>GFP-Traps</i> ®.....	25
3.1.5.13	2D-Gelelektrophorese	26
3.1.5.14	Aufreinigung von GST-gekoppelten Proteinen.....	27
3.1.5.15	GST- <i>Pulldown</i> Analysen.....	27
3.1.6	Humane Zellkultur	27
3.1.6.1	Humane Zelllinien.....	27

3.1.6.2	Medien und Zusätze	28
3.1.7	Bakterienkultur	29
3.1.7.1	Bakterienstämme	29
3.1.7.2	Nährmedien für die Bakterienkultur	29
3.1.8	Hefekultur.....	29
3.1.8.1	Hefestämme	29
3.1.8.2	Nährmedien für die Hefekultur	29
3.1.9	Nukleinsäuren	30
3.1.9.1	Vektoren.....	30
3.1.9.2	Primer.....	30
3.1.10	Größenmarker.....	30
3.1.11	Antikörper.....	31
3.1.12	Enzyme	31
3.1.13	Kits.....	31
3.1.14	Programme und Anwendungen im Internet	32
3.2	Methoden	32
3.2.1	Zellkulturtechniken	32
3.2.1.1	Kultivierung adhärent wachsender Zellen	32
3.2.1.2	Kryokonservierung von humanen Zellen.....	33
3.2.1.3	Auftauen von humanen Zellen	33
3.2.1.4	Transiente Transfektion von humanen Zellen mit Plasmiden.....	33
3.2.2	Mikrobiologische Methoden.....	34
3.2.2.1	Kultivierung von <i>E.coli</i> Bakterien	34
3.2.2.2	Herstellung chemisch-kompetenter <i>E.coli</i> Bakterien	34
3.2.2.3	Transformation chemisch-kompetenter Bakterien.....	35
3.2.2.4	Kultivierung des Hefestammes <i>AH109</i>	35
3.2.2.5	Transformation des Hefestammes <i>AH109</i>	35
3.2.3	Molekularbiologische Methoden	36
3.2.3.1	Bestimmung der Konzentration und Reinheit von DNA-Lösungen.....	36
3.2.3.2	Polymerasekettenreaktion (PCR)	36
3.2.3.3	Agarose-Gelelektrophorese	37
3.2.3.4	Extraktion und Reinigung von DNA aus einem Agarosegel	37
3.2.3.5	Ligation.....	37
3.2.3.6	Extraktion von Plasmiden in kleinem Maßstab (Mini-Präparation)	38
3.2.3.7	Extraktion von Plasmiden in mittelgroßem Maßstab (Midi-Präparation)	39
3.2.3.8	Restriktionsverdau.....	39
3.2.3.9	Aufreinigung von Plasmid-DNA nach einem Restriktionsverdau	39

3.2.3.10	Sequenzierung von Plasmiden	40
3.2.3.11	Aufreinigung von DNA mittels Phenol / Chloroform.....	40
3.2.3.12	Extraktion und Fragmentierung von Chromatin aus humanen Zellen.....	41
3.2.4	Proteinanalytische Methoden	42
3.2.4.1	Chemische Zellyse	42
3.2.4.2	Mechanische Zellyse	43
3.2.4.3	Herstellung <i>in vitro</i> translaterter Proteine	43
3.2.4.4	Expression von rekombinantem Protein in dem <i>E. coli</i> -Stamm <i>BL21</i>	43
3.2.4.5	Aufreinigung von GST-gekoppelten Fusionsproteinen.....	44
3.2.4.6	Bestimmung der Konzentration von Proteinen in Lösung	45
3.2.4.7	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	45
3.2.4.8	Westernblot	45
3.2.4.9	2D-Gelelektrophorese	46
3.2.5	Untersuchung von Protein-DNA-Interaktionen.....	47
3.2.5.1	Chromatin-Immunpräzipitation (ChIP)	47
3.2.5.2	<i>Electrophoretic Mobility Shift Assay</i> (EMSA).....	49
3.2.5.3	Luciferase-Reportergen-Analysen	50
3.2.6	Untersuchung von Protein-Protein-Interaktionen	51
3.2.6.1	GST- <i>Pulldown</i> -Analysen	51
3.2.6.2	<i>GFP-Traps</i> ®.....	52
3.2.6.3	Hefe-Zwei-Hybrid-Analysen.....	53
3.2.6.4	β -Galactosidase-Quantifizierung	53
4	Ergebnisse	55
4.1	Charakterisierung der Transkriptionsfaktor-Aktivität des THAP1-Proteins	55
4.1.1	Identifizierung des <i>TOR1A</i> -Gens als THAP1-Zielgen	55
4.1.2	THAP1 reguliert seine eigene Expression <i>in vitro</i> und <i>in vivo</i>	57
4.1.2.1	Charakterisierung des <i>THAP1</i> -Promotors.....	57
4.1.2.2	THAP1 bindet spezifisch an seinen eigenen Promotor	60
4.1.2.3	THAP1 reguliert seinen eigenen Promotor <i>in vitro</i>	62
4.1.2.4	Untersuchung der <i>THAP1</i> -Expression in aus iPS-Zellen differenzierten Neuronen mit <i>DYT6</i> -Mutationen	64
4.1.3	Untersuchung des Einflusses trunkierender Mutationen auf die intrazelluläre Lokalisierung des THAP1-Proteins.....	66
4.2	Untersuchungen zu THAP1-Protein-Protein-Interaktionen	69
4.2.1	Charakterisierung der <i>Coiled-Coil</i> -Domäne des THAP1-Proteins.....	69
4.2.1.1	Überexpression und Aufreinigung von GST-gekoppeltem THAP1-Protein.....	69
4.2.1.2	Die <i>Coiled-Coil</i> -Domäne vermittelt die THAP1-THAP1-Interaktionen	71

4.2.1.3	Untersuchung des Einflusses C-terminal lokalisierter Mutationen auf die THAP1-Homodimerisierung.....	73
4.2.2	Identifizierung weiterer Interaktionspartner aus der Familie der THAP-Proteine	76
4.2.2.1	THAP1 interagiert über seine <i>Coiled-coil</i> -Domäne mit THAP3	77
4.2.3	Untersuchung einer möglichen THAP1-HDAC1 bzw. HDAC3-Interaktion.....	81
4.2.3.1	THAP1 interagiert mit der Histon-Deacetylase HDAC3.....	81
4.2.3.2	Die THAP1-HDAC3-Interaktion wird über die THAP-Domäne vermittelt	83
4.2.4	Identifizierung weiterer THAP1-Interaktionspartner	84
4.2.4.1	Optimierung der <i>GFP-Traps</i> ® mit GFP-gekoppeltem THAP1-Protein.....	84
4.2.4.2	Identifizierung neuer THAP1-Interaktionspartner	85
5	Diskussion.....	89
5.1	Der Transkriptionsfaktor THAP1.....	89
5.1.1	THAP1 reguliert spezifisch die Expression des <i>TOR1A</i> -Gens (<i>DYT1</i>).....	89
5.1.2	Die Autoregulation der <i>THAP1</i> -Expression.....	92
5.1.3	Trunkierende Mutationen verhindern den Kerntransport des THAP1-Proteins ..	95
5.1.4	Fazit: Erster Teil.....	98
5.2	THAP1 und seine Protein-Protein-Interaktionen.....	99
5.2.1	Die Homodimerisierung von THAP1	99
5.2.2	Die Interaktion von THAP1 mit THAP3.....	101
5.2.3	Die Interaktion von THAP1 mit HDAC3	103
5.2.4	Die Interaktion von THAP1 mit Hsc71 bzw. 14-3-3ε	104
5.2.5	Fazit: Zweiter Teil.....	108
5.3	Ausblick	109
6	Literaturverzeichnis	111
A	Anhang	125
A.1	Material- und Gerätehersteller.....	125
A.2	Abkürzungsverzeichnis	127
A.3	Abbildungsverzeichnis	130
A.4	Tabellenverzeichnis	132
A.5	Primer	133
A.6	Lebenslauf	135
A.7	Publikationen	136

1 Zusammenfassung dieser Arbeit

1.1 Zusammenfassung

Das THAP1-Protein (*Thanatos-associated domain-containing apoptosis-associated protein 1*) ist ein Zinkfinger-Transkriptionsfaktor und besteht aus einer N-terminalen THAP-Domäne, einer zentralen Prolin-reichen Region und einer C-terminalen *Coiled-Coil*-Domäne mit einem Kernlokalisierungssignal. THAP1 bindet über seine Zinkfinger-THAP-Domäne spezifisch an zwei bekannte THAP1-Konsensusmotive (THABS, THAP1-binding sequence) innerhalb des Zielpromotors und reguliert so die Expression seines Zielgens. Mutationen im *THAP1*-Gen wurden als Ursache für die Dystonie 6 (DYT6) identifiziert. Als primäre Torsionsdystonie gehört die Dystonie 6 zu einer heterogenen Gruppe von Bewegungsstörungen, die durch unwillkürliche Muskelkontraktionen, repetitive Bewegungen und eine abnorme Körperhaltung charakterisiert sind. In dieser Arbeit wurde die Transkriptionsfaktor-Aktivität des THAP1-Proteins untersucht, sowie THAP1-Interaktionspartner identifiziert und die funktionelle Relevanz dieser Protein-Protein-Interaktionen charakterisiert.

Mittels Luciferase-Reportergen-Analysen wurden die untersuchten THAP1-Zielpromotoren charakterisiert und der Effekt DYT6-verursachender Mutationen auf die THAP1-vermittelte Repression dieser Promotoren analysiert. Die spezifische Bindung des THAP1-Proteins an die untersuchten Promotoren wurde mit Chromatin-Immunpräzipitationen (ChIP) und EMSAs (*Electromobility Shift Assay*) gezeigt. Für die Protein-Protein-Interaktionsstudien wurden *GST-Pulldown*- sowie Hefe-Zwei-Hybrid-Analysen durchgeführt. Zusätzlich wurden *GFP-Traps*® mit anschließender 2D-Gelelektrophorese zur Auftrennung der präzipitierten Proteine durchgeführt und die Protein-Spots mittels massenspektrometrischer Analysen identifiziert.

In Vorarbeiten wurde bereits ein molekularer Zusammenhang zwischen der Dystonie 1 (DYT1) und Dystonie 6 nachgewiesen. Bei der Dystonie 1 handelt es sich um eine weitere primäre Torsionsdystonie, die phänotypische Ähnlichkeiten zur Dystonie 6 aufweist. Das THAP1-Protein (DYT6) reprimiert die Expression des DYT1-verursachenden *TOR1A*-Gens, wobei die THAP1-vermittelte *TOR1A*-Repression aufgrund DYT6-verursachender Mutationen in der DNA-bindenden THAP-Domäne nicht aufrechterhalten werden kann (Kaiser *et al.*, *Mov Disord*, 2010 (1), Schneider *et al.*, *Mov Disord*, 2011 (2)). Zusätzlich wurde eine Autoregulation der *THAP1*-Expression gezeigt, in der das THAP1-Protein spezifisch an seinen eigenen Promotor bindet und diesen reprimiert. Auch diese THAP1-vermittelte Repression wird durch DYT6-verursachende Mutationen in der THAP-Domäne aufgehoben. Dieser negative *Feedback-Loop* stellt vermutlich einen protektiven Mechanismus zur Kompensation der Fehlregulation von THAP1-Zielgenen dar, die auf einer

durch heterozygote DYT6-Mutationen hervorgerufenen Abnahme der THAP1-Transkriptionsfaktor-Aktivität basiert (Erogullari *et al.*, Mov Disord, in Revision).

Neben zahlreichen DYT6-verursachenden einzelnen Aminosäure-Substitutionen sind Mutationen bekannt, die zu verkürzten THAP1-Proteinen führen. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass der Kerntransport des THAP1-Proteins durch trunkierende Mutationen, die zur Veränderung bzw. zum Verlust des Kernlokalisierungssignals im C-Terminus führen, gestört wird. Die Konsequenz ist eine verminderte Menge an funktionell aktivem THAP1 im Nukleus (Osmanovic, Dendorfer, Erogullari *et al.*, Mov Disord, 2011 (3)).

Darüber hinaus wurden Protein-Protein-Interaktionen als weitere wichtige Elemente zur Regulation der THAP1-Transkriptionsfaktor-Aktivität identifiziert. Die C-terminale *Coiled-Coil*-Region des THAP1-Proteins wurde als Interaktionsdomäne sowohl für eine THAP1-Homodimerisierung, als auch für eine Bindung zu einem weiteren Mitglied der THAP-Proteinfamilie, dem THAP3-Protein, aufgezeigt. Ein diese Interaktionen störender Einfluss durch DYT6-verursachende Mutationen konnte nicht eindeutig nachgewiesen werden (Erogullari *et al.*, in Vorbereitung). Des Weiteren wurde eine über die THAP-Domäne-vermittelte Interaktion zur Histondeacetylase 3 (HDAC3) nachgewiesen, die Hinweise zum Mechanismus der THAP1-vermittelten Repression von Zielgenen liefert (Erogullari *et al.*, in Vorbereitung). Zusätzlich konnten mit den Proteinen Hsc71 und 14-3-3 ϵ zwei neue potentielle Interaktionspartner des THAP1-Proteins identifiziert werden. *In-silico* Analysen sagten zudem eine Binderegion für 14-3-3 ϵ im THAP1-Protein vorher (Erogullari *et al.*, in Vorbereitung).

Die in dieser Arbeit präsentierten Daten liefern neue Erkenntnisse für die molekulare Grundlage der Dystonie 6. In anschließenden Analysen sollen weitere (Dystonie-assoziierte) THAP1-Zielgene identifiziert werden, um die THAP1-Funktion(en) in der Zelle besser zu definieren und weitere Verbindungen zwischen unterschiedlichen Dystonie-Typen aufzudecken. Zusätzlich soll die Identifizierung weiterer THAP1-Bindepartner und die funktionelle Charakterisierung dieser Protein-Protein-Interaktionen zu einem besseren Verständnis der THAP1-Transkriptionsfaktor-Aktivität beitragen. So könnten neue Einblicke in die funktionelle Assoziation spezifischer zellulärer Prozesse gewonnen werden, die zu einem besseren Verständnis der Pathophysiologie der Dystonie 6 im Speziellen und Dystonien im Allgemeinen führen und die Grundlage für neue Therapieansätze bilden.

1.2 Abstract

The THAP1 protein (Thanatos-associated domain-containing apoptosis-associated protein 1) is a zinc finger transcription factor that contains an N-terminal THAP-domain, a central proline-rich region, and a C-terminal coiled-coil domain with a nuclear localization signal. Via the THAP domain, THAP1 has the capability to bind to two known THAP1-binding sequences (THABS) in the promoter region of its target genes and thereby regulates their expression. Mutations in *THAP1* were identified as the cause of dystonia 6 (DYT6). As a primary torsion dystonia, dystonia 6 belongs to a heterogeneous group of movement disorders characterized by sustained involuntary muscle contractions, repetitive movements and abnormal postures. The aim of my studies was to analyze the THAP1 transcription factor activity as well as the identification of THAP1 interacting proteins and the characterization of the functional relevance of these protein-protein interactions.

In luciferase reporter gene assays, the investigated THAP1 target promoters were characterized and the effect of DYT6-causing mutations on the THAP1-mediated repression of these promoters was analyzed. The specific binding of THAP1 to these promoters was shown by chromatin immunoprecipitations (ChIP) and electromobility shift assays (EMSA). The protein-protein interactions were analyzed by GST pulldown and yeast two hybrid (Y2H) assays. Furthermore, GFP-Traps® were performed and followed by 2D gel electrophoresis to separate the precipitated proteins. The protein spots were subsequently identified by mass spectrometric analysis.

Preliminary studies revealed a molecular link between dystonia 1 (DYT1) and dystonia 6. Dystonia 1 represents another primary torsion dystonia and shares several phenotypical similarities with dystonia 6. The THAP1 protein (DYT6) represses the DYT1-causing *TOR1A* gene. Notably, the THAP1-mediated repression of the *TOR1A* gene was disturbed by different DYT6-causing mutations (Kaiser *et al.*, *Mov Disord*, 2010 (1), Schneider *et al.*, *Mov Disord*, 2011 (2)). Additionally, a *THAP1* autoregulation was shown mediated by binding of THAP1 to and repressing its own promoter. The THAP1-mediated repression of the *THAP1*-promoter was also abrogated by DYT6-causing mutations leading to higher *THAP1* expression levels. Presumably, this negative feedback-loop represents a protective mechanism which compensates for expressional changes of target genes based on decreased THAP1 transcription factor activity which is caused by heterozygous *THAP1* mutations (Erogullari *et al.*, *Mov Disord*, in revision).

In addition to DYT6-causing missense mutations, mutations leading to a truncated THAP1 protein were also identified in DYT6 patients. A disturbed nuclear import of THAP1 due to mutations leading to a partial or complete loss of the C-terminal nuclear localization signal

was demonstrated. This results in a decreased amount of functional active THAP1 protein in the nucleus (Osmanovic, Dendorfer, Erogullari et al., *Mov Disord*, 2011 (3)).

In addition, protein-protein interactions were identified as important regulatory elements of the THAP1 transcription factor activity. The C-terminal coiled-coil domain was demonstrated to mediate a THAP1 homodimerization as well as an interaction of THAP1 to THAP3, another member of the THAP protein family. However, evidence for a disturbing effect of DYT6-causing mutations on these interactions could not be provided (Erogullari *et al.*, in preparation). Furthermore, an interaction between THAP1 and the histone deacetylase 3 (HDAC3) was demonstrated. This interaction is mediated by the THAP-domain and provides new insights into the mechanism of a THAP1-mediated repression (Erogullari *et al.*, in preparation). Additionally, new interaction partners of THAP1 were identified including the Hsc71 and 14-3-3 ϵ proteins. A binding region for the 14-3-3 ϵ protein in THAP1 was predicted near the nuclear localization signal (Erogullari *et al.*, in preparation).

These findings provide new insights in the molecular basis of dystonia 6. In further analyses we aim to identify additional (dystonia-associated) THAP1 target genes. This will lead to a better definition of the THAP1 function(s) in the cell and will reveal further links between different types of dystonia. Furthermore, the identification of additional THAP1-binding partners and the functional characterization of these interactions will lead to a better understanding of the THAP1 transcription factor activity. With this, functional associations of specific cellular processes will be elucidated leading to further insights in the pathophysiology of dystonia 6 as well as dystonia in general and providing a basis for new therapeutic approaches.

2 Einleitung

2.1 Klinik und Genetik der Dystonien

Dystonien gehören zu einer heterogenen Gruppe von klinischen Syndromen, die durch repetitive, anhaltende Muskelkontraktionen charakterisiert sind und repräsentieren nach essentiellm Tremor und Parkinsonscher Erkrankung die dritthäufigste Bewegungsstörung des Menschen. Diese unwillkürlichen Bewegungen führen zu einer verdrehten Haltung eines oder mehrerer Körperteile und damit zu einer abnormalen, oftmals schmerzhaften Körperhaltung (4). Die physiologische Ursache ist hierbei eine simultane Kontraktion der agonistischen und antagonistischen Muskeln der betroffenen Körperregion, die wiederum auf eine fehlerhafte Neurotransmission in den Regelkreisen des Gehirns mit noch ungeklärtem Mechanismus zurückgeführt werden (5,6).

2.1.1 Verschiedene Formen der Dystonien

Dystonien werden klassifiziert nach ihrem Erkrankungsalter, der Lokalisierung der Symptome (Topologie) und ihrer Ätiologie. Bei einer Manifestierung der Dystoniesymptome vor dem 28. Lebensjahr spricht man von einem frühen Erkrankungsalter (*early onset dystonia*). Setzen die Dystoniesymptome nach dem 28. Lebensjahr ein, handelt es sich um eine Dystonie mit spätem Erkrankungsalter (*late onset dystonia*) (7). Bei der Lokalisierung der Symptome wird unterschieden zwischen fokalen Symptomen, die nur auf eine Körperregion bezogen sind, segmentalen Symptomen, die in zusammenhängenden Körperregionen auftreten, und generalisierten Symptomen, die den gesamten Körper betreffen (8). In Abbildung 2.1 sind drei unterschiedliche Dystonietypen und die dafür charakteristischen Symptome dargestellt. Zudem werden Dystonien ätiologisch in primäre und sekundäre Dystonien eingeteilt. Dabei stellt die primäre Dystonie ein selbstständiges Krankheitsbild dar, bei dem die Symptome unabhängig von einer exogenen Ursache spontan auftreten. In den Jahren 1996 - 1997 betrug die Prävalenzrate für die primären Dystonien in Europa 152 pro 1 000 000 (9). Bei einer sekundären Dystonie sind die Dystonie-Symptome Begleiterscheinungen einer anderen Krankheit (z.B. metabolische Erkrankungen) oder einer durch einen Unfall verursachten Gehirnverletzung. Generell können Fehlfunktionen in unterschiedlichen Regionen des Gehirns verantwortlich für die Dystonie-Symptome sein. Dabei gehen die Dystonie-Symptome in der Regel nicht mit einer Neurodegeneration der betroffenen Gehirnareale einher (10).

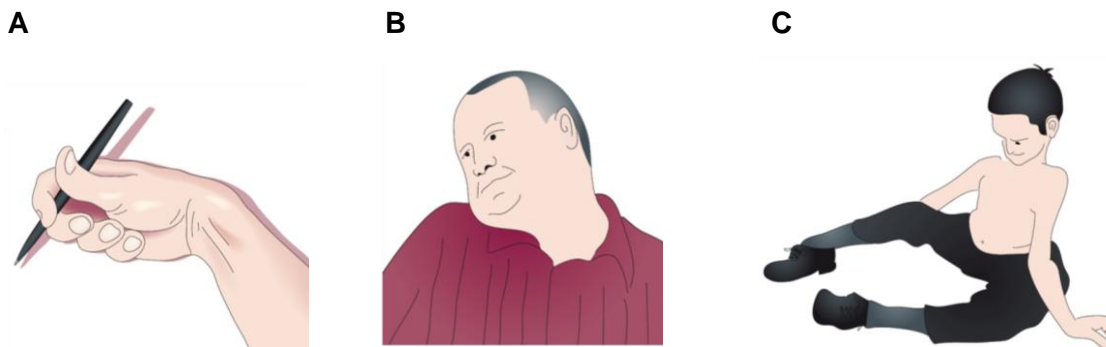


Abbildung 2.1: Patienten mit verschiedenen Dystonie-Typen.

(A) Der Schreibkrampf ist eine spezielle Form der Dystonie, die ausschließlich bei der repetitiven Bewegung des Schreibens auftritt (aktionsspezifische Dystonie). Dabei kann der Schreibkrampf einzelne Finger, nur die Hand oder auch Kombinationen beider Regionen betreffen. **(B)** Eine Verkrampfung am Hals und Nackenbereich führt zu einer Schiefstellung des Kopfes (Torticollis) und wird als zervikale Dystonie bezeichnet. Ein Beispiel hierfür ist die Dystonie 6 (DYT6). **(C)** Die Symptome der generalisierten Dystonie mit frühem Erkrankungsalter treten meist in der Kindheit in einem Arm oder Bein auf und breiten sich dann auf weitere Körperteile aus. Charakteristisch sind hier verdrehte, abnormale Haltungen der Extremitäten, die sehr schmerzhaft sein können. Ein Beispiel für diesen Dystonietyp ist die Dystonie 1 (DYT1). Darstellung modifiziert nach Breakefield *et al.* (5). Mit freundlicher Genehmigung des Autors und Copyright-Besitzers. Copyright © 2008, *Nature Publishing Group*.

Als alternative Einteilung der Dystonietypen werden heutzutage die von der HUGO/GDB (Human Genome Organisation / Genome Database) vorgeschlagenen Dystonie-Bezeichnungen mit durchnummerierten Abkürzungen DYT1 bis DYT23 verwendet. Diese Abkürzungen beschreiben jeweils einen der bisher 23 bekannten, monogenen Dystonie-Subtypen und basieren auf der Reihenfolge der Identifizierung des jeweiligen Subtyps und / oder der Identifizierung der genetischen Ursache. Tabelle 2.1 fasst die bisher bekannten, monogenen Dystonie-Subtypen zusammen. Dabei wurden reine Dystonieformen, sowie Dystonie-Plus-Syndrome mit zusätzlichen Parkinson- oder Myoklonus-Symptomen und paroxysmale Dyskinesien mit einbezogen (11-14). Bei 13 der bisher bekannten Dystonie-Subtypen konnte die genetische Ursache eindeutig identifiziert werden. Andauernde funktionelle Analysen auf molekularer Ebene liefern hierbei Hinweise auf die gestörten Prozesse in der Zelle und damit auf die abnormale Funktion des Zentralen Nervensystems. Zum Beispiel gibt es Hinweise darauf, dass das DYT1-verursachende Torsin1A-Protein (kodiert durch das *TOR1A*-Gen), sowie das DYT11-verursachende ϵ -Sarkoglykan (kodiert durch das *SGCE*-Gen) am Transport und der Lokalisierung neuronaler Membranproteine involviert sind (15,16). Für die DYT12-verursachende $\text{Na}^+\text{-K}^+$ -ATPase $\alpha 3$ -Untereinheit (kodiert durch das *ATP1A3*-Gen) und die DYT5-verursachende GTP-Zyklohydrolase 1 (kodiert durch das *GCH1*-Gen) konnte bereits eine essentielle Beteiligung an der Neurotransmission gezeigt werden (12).

Tabelle 2.1: Zusammenfassung der bisher bekannten, monogenen Dystonie-Typen.

Die Nomenklatur des Dystonietyps basiert auf einer Durchnummerierung nach Identifizierung der klinische Symptome und / oder der genetischen Ursache.

Typ	Klin. Präsentation	Vererbung	Genlokalisierung	Gen	Protein	Proteinfunktion
DYT1	generalisierte TD mit Manifestierung im Kindesalter	AD	9q	<i>TOR1A</i>	TorsinA	Proteininteraktion zwischen Kernhülle und ER (AAA+ ATPase)
DYT3	X-chromosomale Dystonie mit Parkinson-Symptomen	XR	Xq	<i>TAF1/DYT3</i>	TAF	Transkriptionsfaktor
DYT4	spasmodische Dysphonie (Flüster-Dysphonie)	AD	19p	<i>TUBB4</i>	Tubulin Beta-4A Kette	Bestandteil der Mikrotubuli
DYT5a/ DYT14	Dopa-responsive Dystonie, Segawa Syndrom	AD	14q	<i>GCH1</i>	GTP Zyklolyase	Biopterinbiosynthetisches Enzym
DYT5b	Dopa-responsive Dystonie, Segawa Syndrom	AR	11p	<i>TH</i>	Tyrosinhydroxylase	Dopa-biosynthetisches Enzym
DYT6	fokale TD mit Manifestierung im Erwachsenenalter, gemischter Typ	AD	8p	<i>THAP1</i>	THAP1	Zinkfinger Transkriptionsfaktor
DYT7	fokale TD mit Manifestierung im Erwachsenenalter	AD	18p	-	-	-
DYT8	paroxysmale, non-kinesiogene Dyskinesie	AD	2q	<i>PNKD1/MR1</i>	Myofibrillogenese Regulator-1	nicht bekannt
DYT9/ DYT18	paroxysmale, anspannungsinduzierte Dyskinesie 2	AD	1p	<i>SLC2A1</i>	GLUT1	Glukose-Transporter
DYT10	paroxysmale, kinesiogene Choreoathetosis	AD	16p – q	<i>PRRT2</i>	Prolin-reiches Transmembranprotein 2	nicht bekannt
DYT11	Myoklonus-Dystonie	AD	7q	<i>SGCE</i>	Epsilon-Sarkoglykan	Dystrophin-Glykoprotein-Komplex
DYT12	Dystonie-Parkinson mit schneller Manifestierung	AD	19q	<i>ATP1A3</i>	Na ⁺ /K ⁺ -ATPase α Untereinheit	Ionen-Transporter
DYT13	multifokale / segmentale Dystonie	AD	1p	-	-	-
DYT15	Myoklonus-Dystonie	AD	18p	-	-	-
DYT16	Dystonie-(Parkinson) mit frühem Erkrankungsalter	AR	2p	<i>PRKRA</i>	PACT	Schutz vor zellulärem Stress
DYT17	AR primäre TD	AR	20pq	-	-	-
DYT19	episodisch kinesiogene Dyskinesie 2	AD	16q	-	-	-
DYT20	Paroxysmale, non-kinesiogene Dyskinesie 2	AD	2q	-	-	-
DYT21	Pure TD mit spätem Erkrankungsalter	AD	2q	-	-	-
DYT23 (reserviert)	kraniozervikale Dystonie	AD	11p	<i>ANO3</i>	Anoctamin-3	Ca ²⁺ -aktivierter Chloridkanal

AD: autosomal-dominant, AR: autosomal-rezessiv, TD: Torsionsdystonie, XR: X-chromosomal-rezessiv, ER: endoplasmatisches Retikulum, DYT14 wurde kürzlich als DYT5 (17) und DYT9 als DYT18 definiert (18). Modifiziert nach Bragg et al. (19). Mit freundlicher Genehmigung des Autors und Copyright-Besitzers. Copyright © 2011, Elsevier.

Zusätzlich wurden in aktuellen Studien vier weitere Dystonie-verursachende Gene identifiziert. Die ersten beiden Gene wurden noch nicht in die HUGO-Nomenklatur aufgenommen und werden aus diesem Grund nicht in Tabelle 2.1 aufgeführt. Fuchs *et al.* identifizierten Mutationen im *GNAL*-Gen, das für das *Guanine nucleotide-binding protein G(olf) subunit alpha* kodiert, als Ursache für eine weitere primäre Torsionsdystonie (20). Xiao *et al.* konnten Mutationen im *CIZ1*-Gen, welches für das *Cip1-interacting zinc finger protein 1* kodiert, als Ursache einer primären, zervikalen Dystonie mit spätem Erkrankungsalter zuordnen (21). Des Weiteren konnten Charlesworth *et al.* Mutationen im *ANO3*-Gen als genetische Ursache einer weiteren kraniozervikalen Dystonie beschreiben (22). Dieses Gen kodiert für einen Calcium-aktivierten Chlorid-Kanal, dessen Funktion durch die identifizierten *ANO3*-Mutationen nachweislich gestört wird. Zudem konnten zwei Arbeitsgruppen eine Mutation im *TUBB4*-Gen, das für das Tubulin-Protein *tubulin beta-4A chain* kodiert, als genetische Ursache für die Dystonie 4 (DYT4) in einer australischen Familie identifizieren (23,24).

Derzeit gibt es zwei Strategien zur Behandlung der unterschiedlichen Dystonieformen: Zum Einen kann eine pharmakologische und zum Anderen eine neuro-operative Herangehensweise in Betracht gezogen werden. Dabei werden bisher jedoch nur die Dystonie-Symptome behandelt, nicht jedoch die Krankheitsursache. Die „pharmakologische Methode“ verwendet je nach Dystonietyp Anti-Cholinerge Medikamente, GABA-Agonisten oder dopaminerge Medikamente, die direkt im Zentralen Nervensystem wirken (25,26). Zudem können die Symptome einer fokalen und in einigen Fällen auch generalisierten Dystonie direkt an den Muskeln mit einer Botulinumtoxin-Behandlung gelindert werden. Die operative Behandlungsstrategie basiert auf der Tiefen Hirnstimulation (*Deep Brain stimulation, DBS*). Diese Methode führt zu einer funktionellen Manipulation der Regelkreise des Gehirns durch leichte elektrische Stimulation und verzeichnet besonders bei den Dystonien mit frühem Erkrankungsalter gute Behandlungsergebnisse (27,28).

2.1.2 Die Dystonie 6

Der Schwerpunkt der hier vorliegenden Arbeit liegt auf der Charakterisierung und Untersuchung der molekularen bzw. pathophysiologischen Ursachen der primären Torsionsdystonie DYT6 (OMIM: 602629). Die DYT6 ist durch einen kraniozervikalen Erkrankungsbeginn charakterisiert (Abbildung 2.1B), der oftmals mit Problemen bei der Ausübung des Sprechens einhergeht. Die Symptome breiten sich dann mit der Zeit aus, so dass im fortgeschrittenen Stadium von einer generalisierten Dystonie gesprochen werden kann. Die DYT6 wird autosomal-dominant vererbt und unterliegt einer reduzierten Penetranz.

So wurden in verschiedenen DYT6-Familien bereits mehrere nicht erkrankte Mutationsträger identifiziert. Dabei kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass es noch nicht zur Manifestierung der Krankheit gekommen ist. Nach derzeitigen Erkenntnissen erkranken 60 % der Menschen mit einer DYT6-verursachenden Mutation. Darüber hinaus zeichnet sich die Dystonie 6 durch ein sehr weit gefasstes Spektrum des Erkrankungsalters von 2 – 62 Jahren aus (29).

Im Jahre 2009 identifizierten Fuchs *et al.* Mutationen im *THAP1*-Gen als genetische Ursache für die Dystonie 6. Zwei heterozygote Mutationen (c.134_135insGGTGTT; 137_139delAAC und c.241T>C) wurden in fünf Familien mit Amisch-Mennoniten-Hintergrund (30) durch Sequenzier-Analysen gefunden (31). Bisher sind über 80 verschiedene, in der Regel heterozygote DYT6-Mutationen bekannt. Dazu gehören hauptsächlich Missense-Mutationen, aber auch kleine Insertionen und Deletionen, die zur Verschiebung des Leserasters führen. Die meisten Missense-Mutationen betreffen das Exon 1 und 2 des *THAP1*-Gens, welche für den DNA-bindenden THAP-Zinkfinger kodieren, der in den folgenden Abschnitten beschrieben wird.

2.2 Das *THAP1*-Gen und sein Genprodukt

Das DYT6-verursachende *THAP1*-Gen ist auf dem kurzen Arm des Chromosoms 8 (Chromosomenlokalisierung: 8p11.21) lokalisiert. Es umfasst drei Exone mit einer gesamten Kodierungssequenz von 642 Basenpaaren, die für das THAP1-Protein (thanatos-associated [THAP] domain-containing apoptosis-associated protein-1) kodieren. Abbildung 2.2 zeigt eine schematische Darstellung der chromosomalen Lokalisation des *THAP1*-Gens, sowie das dadurch kodierte THAP1-Protein. Exon 1 und 2 des *THAP1*-Gens kodieren für die N-terminale THAP-Domäne des THAP1-Proteins und Exon 3 kodiert für die Prolin-reiche Region (PRR), das HBM-Motiv (*HCF-1-binding motif*) und die C-terminale *Coiled-Coil*-Domäne. Das THAP1-Protein weist eine Gesamtlänge von 213 Aminosäuren auf und hat ein theoretisches Molekulargewicht von 25 kDa.

Eine weitere *THAP1-Splice*-Variante, der das Exon 2 fehlt, wurde ebenfalls in Expressionsanalysen nachgewiesen (32). Jedoch wird hauptsächlich die *THAP1*-Variante mit den 3 Exonen untersucht.

Im Menschen wird *THAP1* primär im Herzgewebe, im Skelettmuskel, in der Niere und in der Leber exprimiert. Allerdings konnten auch geringere *THAP1*-Expressionen im Gehirn, in der Plazenta und im Blut festgestellt werden (33).

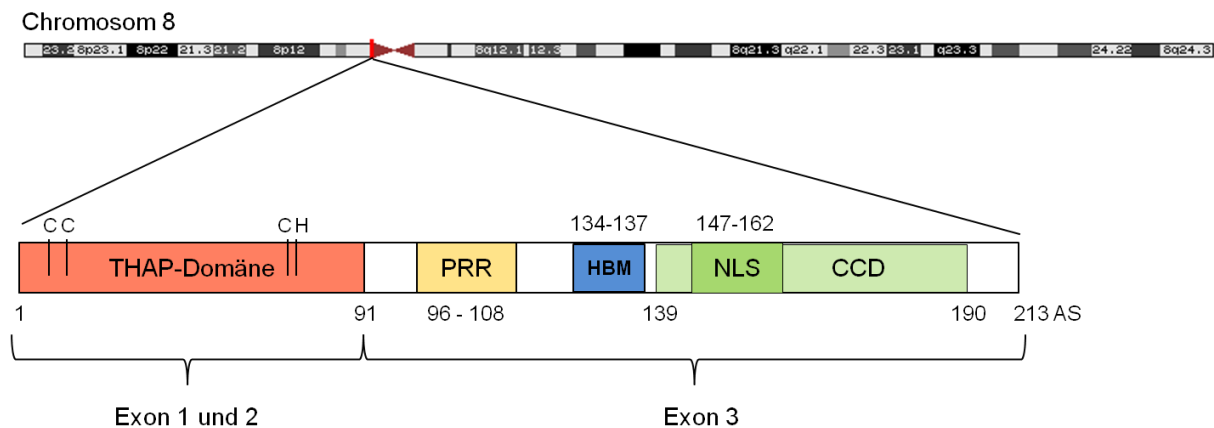


Abbildung 2.2: Schematische Darstellung der chromosomalen Lokalisierung des *THAP1*-Gens und der funktionellen Domänen des *THAP1*-Proteins.

Das *THAP1*-Gen ist auf dem kurzen Arm des Chromosoms 8 lokalisiert (Chromosomenlokalisierung: 8p11.21, rote Markierung). Das *THAP1*-Protein umfasst 213 Aminosäuren und besteht aus der N-terminalen THAP-Domäne (kodiert durch das Exon 1 und 2), der zentralen Prolin-reichen Region, dem HCF1-binding-motif (HBM) und der C-terminal gelegenen Coiled-Coil-Domäne (CCD). In der CCD befindet sich ein Kernlokalisierungssignal (NLS, *nuclear localization signal*). AS: Aminosäure.

2.3 Der Transkriptionsfaktor THAP1

Das *THAP1*-Protein gehört zur Familie der THAP-Proteine, die erstmalig 2003 aufgrund eines auffälligen Protein-Motivs im N-terminalen Bereich, der THAP-Domäne, identifiziert wurde (34,35). Bedingt durch die große strukturelle Ähnlichkeit zur DNA-bindenden Domäne der *Drosophila melanogaster P element transposase* (36) wurde die Hypothese aufgestellt, dass die THAP-Domäne ebenfalls eine sequenzspezifische DNA-Bindefähigkeit vermitteln könnte. Weitere kristallographische und NMR-basierte Analysen dieser Domäne im *THAP1*-Protein zeigten eine atypische Zinkfinger-Struktur mit einem C2-CH-Motiv (CX₂₋₄CX₃₅₋₅₃CX₂H), die ein Zinkion koordiniert (37,38). Die Koordinierung des Zinkions dient hierbei zur Stabilisierung der β - α - β -Sekundärstruktur. Die sequenzspezifische DNA-Bindefähigkeit und die damit verbundene regulative Funktion in der Transkription wurden anschließend von verschiedenen Arbeitsgruppen nachgewiesen. Dabei stellte sich heraus, dass das Sequenzmotiv ⁷⁶AVPTIF⁸¹ wichtig für die korrekte Faltung der THAP-Domäne ist und die Aminosäuren Pro²⁶, Trp³⁶, Phe⁵⁸ und Pro⁷⁸ essentiell für die DNA-Bindung sind (35,37). In den Jahren 2005 und 2010 wurden unabhängig voneinander zwei *THAP1* Konsensus-Motive, die als THABS (*THAP1-binding sequence*) bezeichnet werden, identifiziert. Diese sehen folgendermaßen aus und können auch als invertierte Sequenzen im komplementären DNA-Strang vorkommen: TxxxGGCA (37) und TxxGGGx(A/T) (39). Die Erkennung und Bindung an diese THABS-Motive ist hoch spezifisch. Der genaue Mechanismus der Sequenz-Erkennung ist weitestgehend ungeklärt. Das menschliche Genom kodiert für zwölf

THAP-Proteine (THAP0-11). Die THAP-Domänen des THAP1- und THAP3-Proteins weisen eine 50 %ige Sequenzähnlichkeit auf. Dennoch bindet sowohl THAP3 als auch das ebenfalls strukturell sehr ähnliche THAP2-Protein nicht an das THAP1-THABS-Motiv (40). Diese Beobachtung zeigt die hohe Spezifität der THAP1-DNA-Bindung. Die C-Terminale *Coiled-Coil*-Domäne, sowie das Kernlokalisierungssignal des THAP1-Proteins sind im Vergleich zur THAP-Domäne nur sehr wenig charakterisiert und Bestandteil der funktionellen Analysen der hier vorliegenden Arbeit. Das HBM-Motiv grenzt an die *Coiled-Coil*-Domäne an und vermittelt die Interaktion zu dem Zellzyklus-Faktor und potenten transkriptionellen Ko-Aktivator HCF-1 (*Host cell factor 1*) (41). Welche Funktion die zentralgelegene Prolin-reiche Region ausübt, ist derzeit noch ungeklärt.

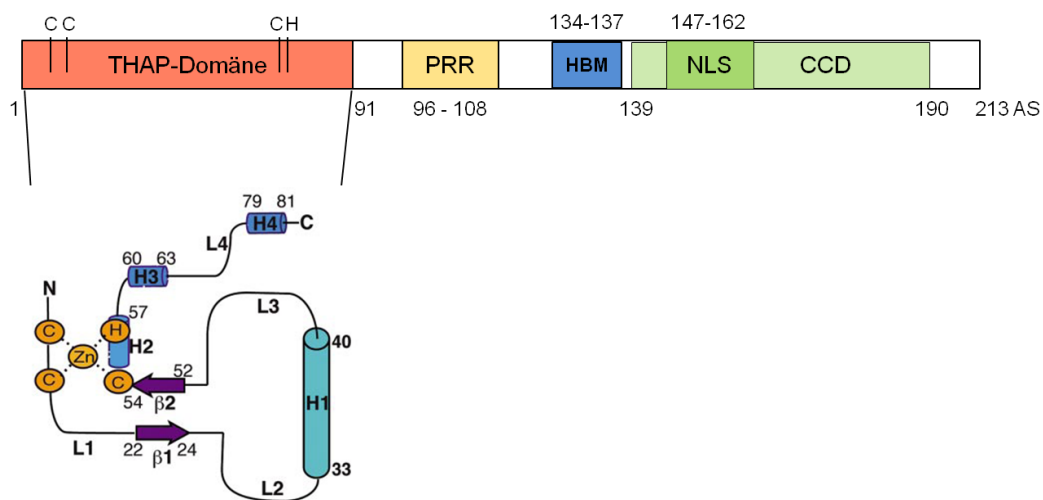


Abbildung 2.3: Die THAP-Domäne besteht aus einem atypischen Zinkfinger-Motiv.

Die DNA-bindende THAP-Domäne des THAP1-Proteins umfasst die ersten 91 Aminosäuren und besteht aus einer atypischen Zinkfingerstruktur mit einem C2-CH-Motiv. Der Zinkfinger koordiniert mit dem C2-CH-Motiv ein Zinkion und vermittelt die sequenzspezifische DNA-Bindeeigenschaft des THAP1-Proteins. HBM: HCF-1 Bindemotiv, NLS: *nuclear localization signal*, CCD: *Coiled-coil*-Domäne, AS: Aminosäure. L1-4: Loops 1-4; β 1-2: β -Faltblatt 1-2; H1-4: α -Helix 1-4. Darstellung modifiziert nach Bessière *et al.* (40). Mit freundlicher Genehmigung des Autors und Copyright-Besitzers. Copyright   2008, *American Society for Biochemistry and Molecular Biology*.

Als Zinkfinger-Transkriptionsfaktor nimmt das THAP1-Protein bei der Transkription von Genen eine regulative Funktion ein. Beispielsweise wurde eine THAP1-vermittelte Aktivierung der Expression des *RRM1*-Gens in humanen endothelialen Zellen nachgewiesen (33). Weitere regulative Aufgaben erfüllt das THAP1-Protein in pro-apoptotischen Prozessen (34), sowie in der Regulation der endothelialen Zellproliferation und des Zellzyklus (33,40).

Durch seine Funktion als Transkriptionsfaktor ist das THAP1-Protein hauptsächlich im Nukleus lokalisiert (3). Dort findet ebenfalls eine Interaktion zum proapoptotischen Faktor PAR-4 (*prostate apoptosis response 4*, (42)) statt (34). Interessanterweise stellt diese THAP1-PAR-4-Interaktion eine indirekte Verbindung zum Dopamin-Signalweg dar (43). Aktuelle Daten heben eine Veränderung der THAP1-vermittelten Funktion in der Genregulation als pathophysiologische Ursache für die Dystonie 6 hervor. Da die meisten DYT6-verursachende Mutationen im *THAP1*-Gen die DNA-bindende THAP-Domäne betreffen, fokussiert sich die Untersuchung der THAP1-Funktion auf dessen Eigenschaften in der Transkriptionsregulation.

2.4 Die Transkriptionsregulation in Eukaryoten

Die Regulation der Transkription von Genen ist ein sehr komplexer Prozess. Nur durch die koordinierte Interaktion verschiedener Faktoren kann eine entwicklungs- und zelltypspezifische Expression von Genen gesteuert werden. Die Zugänglichkeit der DNA für Transkriptionsfaktoren und andere regulative Proteine beschreibt den globalsten Kontrollmechanismus der Transkriptionsregulation (44). Die eukaryotische DNA liegt um Histon-Proteine gewunden als Chromatin im Kern einer Zelle vor. Diese DNA-Histon-Komplexe werden als Nukleosomen bezeichnet (45,46). Verschiedene kovalente posttranslationelle Modifikationen der Histonproteine haben einen Einfluss auf die Zugänglichkeit der DNA und kontrollieren somit den Transkriptionsprozess. Bei einer Acetylierung der Histonproteine H3 und H4 und einer Methylierung der Lysine 4 und 79 des Histonproteins H3 wird eine „Auflockerung“ des Chromatins eingeleitet, sodass der Promotorbereich stromaufwärts des zu transkribierenden Gens für Transkriptionsfaktoren zugänglich ist. Da besonders diese „aufgelockerten“ genomischen DNA-Abschnitte empfindlich gegenüber einer Behandlung mit der DNase I ist, werden diese Bereiche auch als DNase I-hypersensitive Regionen bezeichnet. Dahingegen ist eine Hypermethylierung und Deacetylierung ein Merkmal inaktiver, nicht zugänglicher Chromatin-Bereiche (47,48), welche sich als weniger zugänglich für eine DNase I-vermittelte Spaltung auszeichnen.

Promotoren sind DNA-Regionen, die in der Regel direkt stromaufwärts zum Transkriptionsstartpunkt (TSS) lokalisiert sind und aus einem definierten Kernpromotor-Bereich und proximalen regulativen Elementen bestehen. In den letzten Jahren lieferten verschiedene Arbeitsgruppen Hinweise für mehrere, „alternative“ Promotoren und TSS für ein Gen, die zur Ausbildung von Transkripten unterschiedlicher Länge führen (49,50). Sowohl allgemeine, als auch sequenzspezifische Transkriptionsfaktoren und Ko-Aktivatoren, die *trans*-regulativen Elemente, binden innerhalb der Promotorsequenz und leiten den

Beginn des Transkriptionsprozesses ein. Der Start der Transkription ist charakterisiert durch die Assemblierung des Präinitiationskomplexes (PIC, *pre-initiation complex*), der hauptsächlich aus der RNA-Polymerase II und weiteren regulatorischen Proteinen besteht (51,52). Die Zusammensetzung dieses Proteinkomplexes ist gewebespezifisch und abhängig vom Entwicklungsstadium und Zellzyklus (53). Der Promotor gehört zu den sogenannten *cis*-regulativen Elementen. Weitere *cis*-regulative Elemente sind *Enhancer*, *Silencer*, *Insulatoren* und *Locus Control Regions (LCRs)*, die ebenfalls als distale regulatorische Elemente bezeichnet werden. Auch diese *cis*-regulativen Elemente beinhalten spezifische Erkennungssequenzen für *trans*-regulative Faktoren, die an diese DNA-Regionen binden. *Enhancer* sind regulative DNA-Bereiche, die mehrere hundert Kilobasen stromaufwärts von einem Promotor liegen können (54). Regulative Proteine binden sequenzspezifisch an diese *Enhancer*-Elemente und leiten eine Aktivierung der Transkription ein. Die Voraussetzung hierfür ist eine räumliche Nähe des *Enhancers* zum Promotor. Diese wird durch ein sogenanntes *Looping* des Chromatins geschaffen. Das Chromatin geht mit Hilfe von noch weitestgehend unbekanntem Proteinen eine Schlaufen-Form ein, sodass eine Interaktion zwischen *Enhancer* und Promotor stattfinden kann (54,55). Dahingegen kann die Bindung eines Transkriptionsfaktors an ein *Silencer*-Element die Transkription des Zielgens unterbinden (56). Es ist bekannt, dass ein Transkriptionsfaktor sowohl eine aktivierende als auch eine reprimierende Funktion ausüben kann. Dies wird durch die Rekrutierung unterschiedlicher Co-Faktoren definiert (57). *Insulatoren* haben die Aufgabe, Genregionen von der Transkriptionsaktivität des benachbarten Gens abzugrenzen, sodass keine unkontrollierten Nebeneffekte irrelevanter *Enhancer* oder *Silencer* stattfinden können (58). *Locus Control Regions (LCRs)* bestehen aus mehreren *cis*-regulatorischen Elementen, die in Kombination für eine zeitlich abgestimmte oder gewebespezifische Expression von Gengruppen (*clustern*) zuständig sind (56).

Hierbei ist zu erwähnen, dass das ENCODE (*The Encyclopedia of DNA Elements*) Projekt Konsortium in einem aufwendigen Projekt systematisch aktive Promotorregionen, Transkriptionsfaktor-Bindestellen, verschiedenen Chromatin-Strukturen und Histonmodifikationen charakterisiert und zum Verständnis der Organisation und Regulation von Genen essentiell beigetragen hat (59).

Die wichtigsten *trans*-regulatorischen Elemente des Transkriptionsprozesses sind die Transkriptionsfaktoren. Ein ausgeklügeltes, aufeinander abgestimmtes Zusammenspiel verschiedenster Transkriptionsfaktoren und deren Ko-Faktoren ermöglicht die Koordinierung einer gewebespezifischen, Zell-Zyklus- oder Zeit-abhängigen Genexpression oder einer Reaktion der Zelle auf exogene Stimuli (60).

Das häufigste Strukturmotiv in Transkriptionsfaktoren ist das Zinkfinger-Motiv (61). Das klassische Zinkfinger-Motiv beinhaltet ein bis mehrere Cystein- und Histidin-Wiederholungen (C2H2-Motiv). Bei ein bis zwei Zinkfinger-Motiven sind zusätzliche Sekundärstrukturelemente oder eine Dimerisierung des Transkriptionsfaktors für eine DNA-Erkennung nötig (62). Die Koordinierung eines Zinkions zwischen den Cystein- und Histidin-Resten bewirkt die Stabilisierung der Struktur zweier antiparalleler β -Faltblätter und einer darauffolgenden α -Helix. Es sind auch abweichende Cystein-Histidin-Motive in Zinkfinger-Transkriptionsfaktoren bekannt. Diese haben jedoch immer die Fähigkeit zur Koordinierung eines Zinkions und damit zur Stabilisierung einer speziellen α -Helix / β -Faltblatt-Struktur (63). Mit Hilfe des Zinkfinger-Motivs können diese Transkriptionsfaktoren eine spezifische Bindung mit der DNA eingehen. Diese Transkriptionsfaktor-DNA-Bindung wird durch eine besonders hohe Affinität und Spezifität charakterisiert. Der genaue Mechanismus der DNA-Erkennung ist noch nicht aufgeklärt (62). Nach der Bindung können die Zinkfinger-Transkriptionsfaktoren dann ihre aktivierende bzw. reprimierende Funktion während des Transkriptionsprozesses ausführen.

2.5 Vorarbeiten

Die ersten Daten zur molekularen Verbindung zwischen der Dystonie 1 und Dystonie 6 wurden im Rahmen der Doktorarbeit von Frau Dr. cand. med. Alma Osmanovic erhoben. Zunächst wurde hierfür die Promotorregion des DYT1-verursachende *TOR1A*-Gens mittels Luciferase-Reporter-Gen-Analysen charakterisiert und der *TOR1A*-Kernpromotor auf ein 221 Basenpaar-umfassendes Fragment eingegrenzt. Die spezifische Bindung des THAP1-Proteins an den *TOR1A*-Kernpromotor wurde in ChIP-Analysen nachgewiesen. Zudem wurde in weiteren Luciferase-Reporter-Gen-Analysen eine THAP1-vermittelte Repression des *TOR1A*-Kernpromotors aufgezeigt (1). Diese Vorarbeiten wurden mit der anschließenden Analyse des Einflusses DYT6-verursachender Mutationen auf die THAP1-vermittelte Repression der *TOR1A*-Expression in der hier vorliegenden Arbeit fortgeführt.

2.6 Ziel dieser Arbeit

Die Dystonie 6 stellt eine chronische Funktionsstörung des Gehirns mit schmerzhaften Symptomen für die erkrankten Menschen dar, die darüber hinaus zunehmend unter der Einschränkung ihrer Bewegungsfähigkeit leiden. Ein besseres Verständnis der (patho)-physiologischen zellulären Prozesse, die zur Manifestierung dieser Krankheit führen, bilden die Grundlage neuer therapeutischer Ansätze zur Behandlung der Krankheitsursache.

Das Ziel dieser Arbeit war die Charakterisierung des THAP1-Proteins. Mutationen im *THAP1*-Gen wurden als Ursache für die Dystonie 6 identifiziert. Der Fokus lag hierbei sowohl auf der Untersuchung der Transkriptionsfaktor-Aktivität des THAP1-Proteins, als auch auf der Identifizierung von THAP1-Interaktionspartnern und der Charakterisierung der damit einhergehenden Protein-Protein-Interaktionen. In sich daran anschließenden Experimenten sollte der Einfluss DYT6-verursachender Mutationen auf die charakterisierten THAP1-Aktivitäten bzw. -Funktionen in den hier entwickelten und etablierten molekularen Verfahren untersucht werden. Die so gewonnenen Erkenntnisse sollten Einblicke in die pathophysiologischen Mechanismen der Dystonie 6 liefern und damit die Basis für eine mögliche Genotyp-Phänotyp-Korrelation bilden.

3 Materialien und Methoden

Die Firmensitze der Hersteller sind im Anhang A.1 zusammenfassend aufgelistet und werden im weiteren Verlauf der Arbeit nicht mehr angegeben, um Mehrfachnennungen zu vermeiden.

3.1 Materialien

3.1.1 Geräte

Name	Hersteller
Abzüge	Köttermann
Autoklav-CS/VFKT	Webeco
Digital Graphic printer UP-D895	SONY
Eismaschine	Ziegra
Elektroporationssystem Gene pulser X Cell CE und PC Module	BioRad
ELISA-Reader SLT Rainbow	SLT Labinstruments GmbH
Etton Spot Picker	GE Healthcare
Eraser für Hyperfilme	Raytest Isotopenmessgeräte GmbH
HPE™-FlapTop-TowerSystem	Serva
Fluoreszenzmikroskop Axioskop 2 plus HBO100	Kübler
Fluoreszenzlampe ebq 100 isolated	Kübler
Gefrierschränke (-20 °C) Bosch electronic	Bosch
Gefrierschränke (-20 °C) Siemens GS34VV20	Siemens
Gefrierschränk (-80 °C) Sanyo Ultra Low	Sanyo
Inkubator Certomat-H und U	Braun / Sartorius
Inkubator Galaxy 170S	New Brunswick / Eppendorf
Inkubator Heraeus-Typ B5028	Heraeus
Inkubator Innova 4300 Incubator Shaker	New Brunswick/Eppendorf
Inkubator Köttermann-Typ 2735	Köttermann
Kamera CCD Black and White Video Camera	SONY
Kammer für Agarosegele HE 99x submarine electrophoretic unit	Amersham Bioscience
Kammer für SDS-Gele Mini Protean Tetra	BioRad
Konfokales Laser Scanning Mikroskop	Zeiss
Kühlschränk Kirsch	Kirsch
Kühlschränke Liebherr	Liebherr
Luminometer LB 942 TriStar ²	Berthold Technologies
Luminometer LB 940	Berthold Technologies
Magnetrührer KAMAG RH	Jahnke und Kunkel
Magnetrührer MR3002	Heidolph
Module XC-ST70	
Mikroskop Laborlux 12	Leitz
Mikroskop Zeiss	Carl Zeiss AG
Mini Trans-Blot Module (Wet Blot)	BioRad
Netzgerät LKB GFP200/400	Biostad-Pharmacia
Netzgerät PowerPac Basic Power Supply	BioRad
Netzgerät PowerPAC 3000	BioRad
pH-Meter PCE-BPH 1	PCE Deutschland GmbH
Phosphorimager CR35BIO	Dürr Medical
Pipetten Eppendorf	Eppendorf

Pipetten Gilson	Gilson
Pipettierhilfe Easypet-Pipetboy 9V DC	Eppendorf
Plattenzentrifuge 5804	Eppendorf
Protean IEF Cell	BioRad
Schüttler/Schwenker Polymax 1040	Heidolph
Schüttler (Überkopfschüttler) Reax 2	Heidolph
Sequenziergerät 3130X/Genetic Analyzer	Applied Biosystems
Speed Vac Plus Sc110 A	Savant
Spektrophotometer Helios Omega UV-Vis mit Nanoküvette	Thermo Scientific
Sterilbank Hera Safe	Heraeus
Sterilbank Heraeus LaminAir HLB 2448GS	Heraeus
Szintillationscounter	
Tischzentrifuge Centrifuge 5415C	Eppendorf
Tischzentrifuge Centrifuge 5415R	Eppendorf
Tischzentrifuge Microfuge 22R	Eppendorf
Thermocycler Thermal Cycler 2720	Applied Biosystems
Thermocycler Veriti 96 well Thermal Cycler	Applied Biosystems
Thermocycler T-gradient	Biometra
Thermomixer Comfort	Eppendorf
Thermomixer Compact	Eppendorf
Transblot SD SemiDry Transfer Cell	BioRad
Typhoon FLA900	GE Healthcare
Ultraschall Homogenisator SONOPULS	Bandelin electronic
UV-Tisch UVT-28M	Herolab
Geldokumentationssystem	Herolab
Vakuumpumpe WOB-L PRES/Vac-Dry	Welch
Vakuumpumpe-Antrieb Pump2	ABM Greiffenberger Antriebstechnik GmbH
Vakuumtrockner Slab Gel Dryer SGD 2000	Savant
Vortexer Top Mix 11118	Fisher Bioblock Scientific
Vortexer Vortex Genie	Bender & Hobein
Waage Kern	Sartorius
Waage Typ 2254	Sartorius
Waage zur Analyse Typ 2492	
Wasserbäder GFL Typ 1003	GFL
Westernblot-Geldokumentationssystem	Vilber Lourmat
Zentrifuge Avanti J-30I Centrifuge	Beckman Coulter
Zentrifuge/Vortexer CombiSpin FVL-2400	PeqLab Biotechnologie GmbH

3.1.2 Verbrauchsmaterialien

Name	Hersteller
96-well Optical Reaction Plate	Applied Biosystems
Amicon ultra 0,5ml 100K	Millipore
Centriprep® Ultracel YM-50	Millipore
Dialyseschlauch (Dialysis-Membrane Type20, cut-off:12-16 kD pore size 25A)	Biomol GmbH
Einmalküvetten (1,5 ml)	Kartell
Einmalreaktionsgefäße (0,2 ml, 0,5ml, 1,5 ml, 2 ml)	Sarstedt
Einmalreaktionsgefäße (15 ml, 50 ml)	Greiner/Sarstedt
Einmalspitzen (10 ml, 50ml)	Beckton Dickinson
Glaspipetten (5 ml, 10 ml, 25 ml)	Hirschmann Laborgeräte
Glasplatten (0,75 mm Spacer)	BioRad
HPE™-Gele	Serva
Illustra Sephadex G-50 Fine DNA Grade	GE Healthcare

Imaging Plate BAS-MP 2040S (20x40cm)	Fuji Photofilm CO., Ltd
Impfschlinge	Sarstedt
Immobiline DryStrip pH 4 – 7, 24 cm	GE Healthcare
Kryoröhrchen	Nunc
Multiscreen-Filterplatten	Millipore
Objektträger 26 x 76 mm / ca. 1 mm	Heinz Heren Medizinalbedarf GmbH
Polypropylen-Säulen – 5ml	Qiagen
PVDF western blotting membranes	Roche
Petrischalen (92 x 16 mm)	Sarstedt
Polypropylen Zentrifugenbecher (250 ml)	Beckman Coulter
Whatmanpaper	Whatman
Skalpelle	pfm medical AG
Surelock tubes	Starlab
Tissue culture coverslips 13 mm	Sarstedt
Zellheber (Schaber)	Th. Geyer
Zellkulturflaschen (25cm ² , 75cm ²)	Biochrom
Zellkulturplatten 24 Well	Th. Geyer
Zellkulturschalen (100mm, 150mm)	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
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
FBS	Gibco
FuGENE HD	Roche / Promega
Glycin	Sigma-Aldrich
Glucose	Merck
Glycerin	Calbiochem
HEPES	Sigma-Aldrich
HiDi-Formamid	Applied Biosystems

Insulin	Sigma-Aldrich
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
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
o-Nitrophenyl- β -D-galactopyranosid- (ONPG)	Sigma-Aldrich
2 μ l [32 P]- 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
[35 S] L-Methionine 18,5Mbq (500 μ Ci) in 50 μ l	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 Rekombinante Proteine

Name	Hersteller
Brain-derived neurotrophic factor (BDNF, human, vollständig)	R&D Systems
Fibroblast growth factor Basic (FGF-Basic, human, vollständig)	Invitrogen
Fibroblast growth factor 8a (FGF-8a, human, vollständig)	R&D Systems
Glial cell-derived neurotrophic factor (GDNF, human, vollständig)	R&D Systems
Noggin (Maus, vollständig)	R&D Systems
Sonic Hedgehog (SHH, Maus, N-Terminus)	R&D Systems
TGF-beta 3 (human, vollständig)	R&D Systems

3.1.5 Lösungen und Puffer

Falls nicht anders aufgeführt wurden alle Puffer und Lösungen in destilliertem Wasser (*Aqua dest*) angesetzt.

3.1.5.1 DNA-Extraktion in kleinem Maßstab (Mini-Präparation)

Name	Zusammensetzung
Mini-Präparationspuffer 1	50 mM Tris-HCl, pH 8,0 10 mM EDTA 100 µg/ml RNase
Minipräparationspuffer 2	0,2 M Natriumhydroxid (NaOH) 1 % SDS
Minipräparationspuffer 3	3 M Kaliumacetat (CH ₃ COOK)

3.1.5.2 Agarosegelelektrophorese

Name	Zusammensetzung
Agarosegellösung	1 – 2 % (w/v) Agarose 1 x TBE-Puffer 0,33 µg/ml Ethidiumbromid
TBE-Puffer (Laufpuffer)	445 mM Tris-Base 445 mM Borsäure 10 mM EDTA
DNA-Ladepuffer	0,1 % Bromphenolblau 0,1 % Xylen Cyanol 25 % Glycerin 10 mM EDTA

3.1.5.3 Bradford-Assay, SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese und Westernblot

Name	Zusammensetzung
10x SDS-Laufpuffer	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
4x SDS-Probenpuffer (Laemmli-Puffer nach Laemmli (64))	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
Bradford-Reagenz	0,12 mM Coomassie G250 5 % (v/v) Ethanol 8,5 % (v/v) Phosphorsäure
Coomassie-Entfärbelösung	30 % (v/v) Methanol
Coomassie, kolloidal-Entfärbelösung	10 % (v/v) Ethanol 2 % (v/v) Ortho-Phosphorsäure
Coomassie-Färbelösung	45 % (v/v) Ethanol 10 % (v/v) Essigsäure 0,75 mM Coomassie R250
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
Transferpuffer Semi-Dry Verfahren	48 mM Tris-Base 39 mM Glycin 0,05 % (w/v) SDS 20 % Methanol

Im Rahmen dieser Arbeit wurden 10 - 16 %ige SDS-Polyacrylamidgele (SDS-PAGE) verwendet. Diese wurden wie setzten sich wie folgt zusammen:

Trenngel	10 %	12 %	16 %	Sammelgel	4 %
Trenngel-Puffer	2,5 ml	2,5 ml	2,5 ml	Sammelgel-Puffer	1,25 ml
Acrylamid 30 %	3,33	4,2 ml	5,33 ml	Acrylamid 30 %	0,65 ml
H ₂ O	4,0 ml	3,2 ml	2,05 ml	H ₂ O	3,1 ml
10 % APS	150 μ l	150 μ l	150 μ l	10 % APS	75 μ l
TEMED	15 μ l	15 μ l	15 μ l	TEMED	7,5 μ l

3.1.5.4 Herstellung chemisch kompetenter Bakterien

Name	Zusammensetzung
Tfbl-Lösung	30 mM Kaliumacetat (CH_3COOK) 100 mM Rubidiumchlorid (RbCl_2) 10 mM Calciumchlorid (CaCl_2) 50 mM Manganchlorid (MnCl_2) 15 % (v/v) Glycerin pH 5,8 mit 0,2 M Essigsäure einstellen
TfbII-Lösung	10 mM MOPS 75 mM Calciumchlorid (CaCl_2) 10 mM Rubidiumchlorid (RbCl_2) 15 % (v/v) Glycerin pH 6,5 mit 1 M Kaliumhydroxid (KOH) einstellen

3.1.5.5 Transformation von Hefezellen

Name	Zusammensetzung
10x TE-Puffer (Tris/EDTA-Puffer)	100 mM TE
TE / Lithiumacetat-Puffer	1x TE-Puffer 100 mM Lithiumacetat (LiAc) pH 7,5 mit Essigsäure einstellen
50 % Polyethylenglycol 4000	1x TE-Puffer 100 mM LiAc 50 % (w/v) Polyethylenglycol 4000

3.1.5.6 β -Galactosidase-Quantifizierung

Name	Zusammensetzung
Z-Puffer	60 mM Dinatriumhydrogenphosphat (Na_2HPO_4) 40 mM Natriumdihydrogenphosphat (NaH_2PO_4) 10 mM Kaliumchlorid (KCl) 1 mM Magnesiumsulfat (MgSO_4) (0,027 % (v/v) β - Mercaptoethanol)
ONPG-Lösung	4 mg/ml ONPG in Z-Puffer pH 7,0
Stopp-Lösung	1 M Natriumcarbonat (Na_2CO_3)

3.1.5.7 Calciumphosphat-Transfektion

Name	Zusammensetzung
2 x HBS-Lösung	50 mM HEPES, pH 7,05 280 mM Natriumchlorid (NaCl) 10 mM Kaliumchlorid (KCl) 1,5 mM Dinatriumhydrogenphosphat (Na_2HPO_4) 12 mM Glucose

	pH auf 7,00 – 7,05 mit NaOH eingestellt
Calciumchlorid-Lösung	2 M Calciumchlorid (CaCl ₂)
HEPES-Lösung	2,5 mM HEPES, pH 7,13

3.1.5.8 Zellysepuffer

Name	Zusammensetzung
<i>Radioimmunoprecipitationassaybuffer</i> (RIPA) (für humane Zellen)	50mM HEPES 1mM EDTA pH 8,0 1 % Nonidet-P40 (NP-40) 0,5M Lithiumchlorid (LiCl) pH 7,6 mit NaOH einstellen
zur Arbeitslösung hinzugeben:	250:1 Protease-Inhibitor-Cocktail (PIC)
Lysepuffer für Bakterien	PBS-KM (Abschnitt 3.1.5.14)
zur Arbeitslösung hinzugeben:	250:1 Protease-Inhibitor-Cocktail (PIC)

3.1.5.9 Extraktion und Fragmentierung von Chromatin

Name	Zusammensetzung
<i>Crosslinking</i> -Lösung	11 % Formaldehyd 0,1 M NaCl 2,7 mM KCl 1 mM EDTA 0,5 mM EGTA 50 mM HEPES, pH 8,0
Lysepuffer 1	0,05 M HEPES, pH 7,5 0,14 M NaCl 1 µM EDTA 10 % Glycerin 0,5 % NP-40 0,25 % TritonX-100
zur Arbeitslösung hinzugeben:	250:1 Proteinase-Inhibitor-Cocktail
Lysepuffer 2	0,2 M NaCl 1 µM EDTA 0,5 µM EGTA 10 µM Tris, pH 8,0
zur Arbeitslösung hinzugeben:	250:1 Proteinase-Inhibitor-Cocktail
Lysepuffer 3	1 µM EDTA 0,5 µM EGTA 10 µM Tris, pH 8,0
zur Arbeitslösung hinzugeben:	250:1 Proteinase-Inhibitor-Cocktail
1 x PBS	137 mM NaCl 10 mM Na ₂ HPO ₄ 2 mM KH ₂ PO ₄ 2,7 mM KCl

3.1.5.10 Chromatin-Immünpräzipitation (ChIP)

Name	Zusammensetzung
Elutionspuffer	50 mM Tris 10 mM EDTA 1 % SDS
Proteinase K-Lösung	2 % Glykogen 5 % Proteinase K mit 10 mg/ml 1 x TE
<i>Reverse-Crosslinking</i> -Lösung	0,3 M NaCl 50 mM Natriumhydrogencarbonat (NaHCO ₃) 1 % SDS
RIPA-Puffer	50 mM HEPES, pH 7,6 1 mM EDTA 1 % NP-40
zur Arbeitslösung hinzugeben:	250:1 Proteinase-Inhibitor-Cocktail

3.1.5.11 Electromobility Shift Assay (EMSA)

Name	Zusammensetzung
5x Bindepuffer	25 mM Tris, pH 7,5 125 mM KCl 1 mM EDTA 25 mM DTT 0,15 % (v/v) NP-40
EMSA-Ladepuffer	40 % Glycerin 10 - 15 % Bromphenolblau
EMSA-Puffer	100 mM KCl 20 mM Tris, pH 7,8 2 mM EDTA 20 % (v/v) Glycerin
natives Polyacrylamidgel 7,5 % (100 ml)	25 ml Rotiphorese 30; 37,5:1 3 ml 10x TBE (Endkonzentration: 0,3x) 2,5 ml Glycerin 68,3 ml destilliertes Wasser 1 ml 10 % APS 0,2 ml TEMED

3.1.5.12 GFP-Traps®

Name	Zusammensetzung
<i>GFP-Trap</i> -Agarose	Chromotek
<i>GFP-Trap</i> -Equilibrierungspuffer	10mM Tris/HCl pH7,5 150mM NaCl 0,5mM EDTA

<i>GFP-Trap</i> -Waschpuffer	10mM Tris/HCl pH7,5 500mM NaCl 0,5mM EDTA 0,05 % Tween-20
------------------------------	--

3.1.5.13 2D-Gelelektrophorese

Name	Zusammensetzung
2D-Ladepuffer	7 M Urea 2 M Thiourea 4 % (w/v) CHAPS 40 mM DTT
2D-Lysepuffer	30 mM Tris 7 M Urea (CH ₄ N ₂ O) 2 M Thiourea (CH ₄ N ₂ S) 4 % (w/v) CHAPS
2D-Rehydratationspuffer	7 M Harnstoff 2 % CHAPS 2 % immobilisierter pH-Gradienten[IPG]-Puffer 0,3 % DTT Bromphenolblau
Silberfärbung: Fixierungspuffer	800 ml Ethanol (100 %) 20 g Zitronensäure 200 ml Essigsäure (100 %)
Sensibilisierungspuffer	242 mg Natriumthiosulfat (Na ₂ S ₂ O ₃) 1,5 mg Natriumacetat (C ₂ H ₃ NaO ₂) 300 ml Ethanol 700 ml aqua dest
Silber-Färbelösung	1000 ml 2 g Silbernitrat zur Arbeitslösung hinzugeben: 900µl Formaldehyd
Entwickler	1000 ml aqua dest 25 g Natriumcarbonat (Na ₂ CO ₃) 376 µl Natriumthiosulfatlösung (2 %) zur Arbeitslösung hinzugeben: 900 µl Formaldehyd
Stoppuffer	900 ml aqua dest 100 ml Essigsäure (100 %)
Konservierungslösung	900 ml aqua dest 100 ml Glycerin

3.1.5.14 Aufreinigung von GST-gekoppelten Proteinen

Name	Zusammensetzung
PBS-KM	1 x PBS 1mM MgCl ₂ 3mM KCl
Elutionspuffer	20mM reduziertes Glutathion 50mM Tris pH 8,0
Dialysepuffer	50mM Hepes pH 7,5 200 mM NaCl 5 % Glycerol

3.1.5.15 GST-Pulldown Analysen

Name	Zusammensetzung
NETN-Puffer	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
Stringenter Waschpuffer	25mM Tris-HCl, pH 7,5 250mM NaCl 0,2mM EDTA 1mM CaCl ₂ 0,5 % NP-40
zur Arbeitslösung hinzugeben:	1:1000 DTT (1M Stock) 1:250 Protease-Inhibitor-Cocktail (PIC)

3.1.6 Humane Zellkultur**3.1.6.1 Humane Zelllinien**

Im Folgenden sind alle Zelllinien aufgezählt, die im Rahmen dieser Arbeit verwendet wurden. In Klammern sind die DSMZ-Nummern der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ) sofern vorhanden angegeben. Falls nicht anders im Methodenteil aufgeführt, wurden alle Zelllinien in DMEM 101 (Abschnitt 3.1.6.2) kultiviert.

Name	Ursprung
HEK293 (ACC 305)	humane, embryonale Niere, Fibroblasten-ähnlich
HeLa (ACC 57)	humanes Zervix-Karzinom, epithel-ähnlich, weiblich
OVCAR-3	humanes Adenokarzinom, epithel-ähnlich, weiblich
SH-SY5Y (ACC 209)	humanes Neuroblastom, epithel-/Neuronen-ähnlich, weiblich
U2OS	humanes Osteosarkom

3.1.6.2 Medien und Zusätze

Name	Zusammensetzung
DMEM 101 (Vollmedium)	1x DMEM high glucose 10 % FBS, hitzeinaktiviert 1 % Antibiotic/ Antimycotic Solution
Einfriermedium	80 % (v/v) DMEM101 20 % (v/v) DMSO
Fibroblastenmedium	1 x DMEM high glucose 10 % (v/v) FBS, hitzeinaktiviert 2 mM L-Glutamin 1 mM Natriumpyruvat 0,1 mM MEM NEAA 1 % Penicillin/Streptomycin
iPS-Medium	1 x DMEM / F12 20 % <i>Knockout Serum Replacement</i> 2 mM L-Glutamin 0,1 mM MEM NEAA 0,1 mM β -Mercaptoethanol 10 ng/ml Fibroblast Growth Factor 1 % Penicillin /Streptomycin
Neuronen-Differenzierungsmedium	<i>Knockout-DMEM</i> 15 % <i>Knockout Serum Replacement</i> 2 mM L-Glutamin 0,1 mM MEM NEAA 10 μ M SB431542 500 ng/ml Noggin 1 % Penicillin / Streptomycin
N2-Medium	1 x DMEM / F12 25 μ g/ml Insulin 0,1mg/ml humanes Transferrin 5,2 ng/ml Natriumselenit 16,1 μ g/ml Putrescin 6,3 ng/ml Progesteron (65,66)
Trypsin / EDTA	40 g/l Trypsin 0,7mM EDTA in PBS
PBS	137 mM NaCl 2,6 mM KCl 6,5 mM Na ₂ HPO ₄ 1,5 mM KH ₂ PO ₄

3.1.7 Bakterienkultur

3.1.7.1 Bakterienstämme

Name	Genotyp
E.coli BL21-CodonPlus (DE3)-RIL	F ⁻ ompT gal dcm lon hsdS _B (r _B ⁻ m _B ⁻) λ(DE3 [lacI lacUV5-T7 gene 1 ind1 sam7 nin5]) E.coli
E.coli DH5 α	F ⁻ endA1 glnV44 thi-1 recA1 relA1 gyrA96 deoR nupG Φ80d/lacZΔM15 Δ(lacZYA-argF)U169, hsdR17(r _K ⁻ m _K ⁺),λ-

3.1.7.2 Nährmedien für die Bakterienkultur

Name	Zusammensetzung
LB-Medium	20 g/l Trypton Pepton 10 g/l Hefeextrakt 20 g/l NaCl
Agarplatten	LB-Medium 16 g/l Agar +100 µg/ml Ampicillin mit 40µg/ml X-Gal oder +35 µg/ml Kanamycin
Φ-Medium	5g/l Hefeextrakt 5g/l MgSO ₄ pH 7,6 mit 1M KOH einstellen

3.1.8 Hefekultur

3.1.8.1 Hefestämme

Name	Genotyp
AH109	<i>MATa</i> , <i>trp1-901</i> , <i>leu2-3, 112</i> , <i>ura3-52</i> , <i>his3-200</i> , <i>gal4Δ</i> , <i>gal80Δ</i> , <i>LYS2::GAL1_{UAS}-GAL1_{TATA}-HIS3</i> , <i>GAL2_{UAS}-GAL2_{TATA}-ADE2</i> , <i>URA3::MEL1_{UAS}-MEL1_{TATA}-lacZ</i> , <i>MEL1</i>

3.1.8.2 Nährmedien für die Hefekultur

Name	Zusammensetzung
-2 SD dropout solution	6,4 g/l DO supplement -Leu/-Trp
-4 SD dropout solution	6 g/l DO supplement -Ade/-His/-Leu/-Trp
SD-Platten	-2 SD / -4 SD-Medium 20 g/l Agar
SD-Medium (Selektionsmedium)	6,7 g/l Yeast nitrogen base w/o aa 1x dropout solution -2 SD / -4 SD (nach dem Autoklavieren) 20 g/l Glucose (nach dem Autoklavieren)
YPD-Agarplatten	YPD-Medium 20 g/l Agar

YPD-Medium (Vollmedium)	10 g/l Hefeextrakt 20 g/l Pepton 140 20 g/l Glucose (nach dem Autoklavieren)
-------------------------	--

3.1.9 Nukleinsäuren

3.1.9.1 Vektoren

Name	Hersteller
pCRII Blunt-TOPO-Vektor (Klonierungsvektor)	Invitrogen
pGEM-T-Easy-Vector (Klonierungsvektor)	Promega
pGL4.10[<i>luc2</i>] (eukaryotischer Expressionsvektor)	Promega
pcDNA-3.1(A,B,C) (eukaryotischer Expressionsvektor)	Invitrogen
pEGFP-N3 (eukaryotischer Expressionsvektor)	Takara Clontech
pEYFP-N1 (eukaryotischer Expressionsvektor)	Takara Clontech
pFLAG-N3 (eukaryotischer Expressionsvektor)	Quelle : Dr. Tarik Möröy (<i>Department of Medicine, Division of Experimental Medicine,</i> Universität von Montreal, Kanada)
pGEX4T2 (bakterieller Expressionsvektor)	GE Healthcare
pGADT7 (Hefe-Expressionsvektor)	Takara Clontech
pGBKT7 (Hefe-Expressionsvektor)	Takara Clontech
pER4-THAP1-GFP (viraler Expressionsvektor)	Novartis
pMIG-OCT4 (viraler Expressionsvektor)	Quelle für die pMIG-Vektoren:
pMIG-SOX2 (viraler Expressionsvektor)	Professor G.Q. Daley
pMIG-cMYC (viraler Expressionsvektor)	(Children's Hospital, Boston, MA)
pMIG-KLF4 (viraler Expressionsvektor)	

3.1.9.2 Primer

Die in dieser Arbeit verwendeten Primer wurden von der Firma Biomers synthetisiert und für Klonierungen und Sequenzierungen eingesetzt. Die Primersequenzen sind in Anhang A.5 aufgeführt.

3.1.10 Größenmarker

Name	Hersteller
Hyperladder I (DNA)	Bioline
Low DNA Mass Ladder (DNA)	Invitrogen
PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder	Fermentas
Spectra™ Multicolor Low Range Protein Ladder	Fermentas

3.1.11 Antikörper

Name	Hersteller
α-c-Myc-HRP konjugiert	Roche
α-c-Myc (ab9106, polyklonal, Kaninchen)	Abcam
α-FLAG M2 (monoklonal, Maus)	Sigma-Aldrich
α-Gal4 DNA-BD (monoklonal, Maus)	Clontech
α-Gal4 DNA-BD (monoklonal, Maus)	Abcam
α-GFP (polyklonal, Kaninchen)	Abcam
α-Kaninchen IgG-Alexa Fluor® 555 (Ziege)	Invitrogen
α-Kaninchen IgG-HRP (Ziege)	Thermo Scientific
α-Maus IgG-HRP (Ziege)	Thermo Scientific
α-NFKB (polyklonal, Kaninchen)	Santa Cruz Biotechnology
α-Penta-His (polyklonal, Maus)	Qiagen
α-Ratte IgG-HRP (Ziege)	Thermo Scientific

3.1.12 Enzyme

Name	Hersteller
Expand Long Range dNTPack	Roche
FastDigest® Restriktionsenzyme	Fermentas/Thermofisher
GC Rich PCR-system	Roche
High Fidelity-Platinum PCR Enzyme Mix	Fermentas/Thermofisher
Phusion Polymerase	Finnzymes
Platinum Taq DNA Polymerase High Fidelity	Invitrogen
RNase A	Qiagen
T4 Ligase	Roche
T4 Polynukleotid Kinase	Invitrogen
Taq-DNA-Polymerase	5 PRIME
Taq-DNA-Polymerase	MP Biomedicals
Taq-DNA-Polymerase	Qiagen
Trypsin	Serva

3.1.13 Kits

Name	Hersteller
BigDye® Terminator v. 1.1/ 3.1	Applied Biosystems
Dual-Luciferase™ Reporter Assay	Promega
DyeEx 2.0 Spin Kit	Qiagen
ECL Western Blotting Substrate	Pierce
Exo Sap IT®	USB / Affymetrix
HIV-1 p24 Antigen ELISA	Zeptomatrix
pGEM-T-Easy-Vector System	Promega
Pure Yield™ Plasmid-Midiprep-System	Promega
QIAquick Gel extraction Kit	Qiagen
QuickChange Site directed Mutagenesis Kit	Stratagene
ReadyPrep™ 2-D Cleanup Kit	BioRad
SuperSignal West Femto Chemiluminescent Substrate	Thermo Scientific
SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate	Thermo Scientific
TNT® Quick coupled Transcription/Translation System	Promega

3.1.14 Programme und Anwendungen im Internet

Name	Hersteller
AIDA Image Analysis v.4.27	Raytest
Chromas	Technelysium Pty Ltd
CorePromoter	http://rulai.cshl.org/tools/genefinder/CPROMOTER/index.htm (Zhang lab)
Edit Seq	DNASStar Lasergene
ELM (67)	http://elm.eu.org/search/
ENCODE	http://genome.ucsc.edu/ENCODE/
Ensembl	http://www.ensembl.org/index.html
Expasy	http://expasy.org/
Fusion	Vilber Lourmat
Multiple sequence alignment by CLUSTALW	http://www.genome.jp/tools/clustalw/
Seqman	DNASStar Lasergene
Sequencing analysis	Applied Biosystems
Mutation Taster	http://www.mutationtaster.org/
NebCutter V2.0	New England Biolabs
NCBI-Blast (68)	http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi
Oligo calculator	http://mbcf.dfc.harvard.edu/docs/oligocalc.html (Eugen Buehler)
Polyphen-2	http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/
Progenesis Same Spots	Nonlinear dynamics
Promoter 2.0 Prediction Server	http://www.cbs.dtu.dk/services/Promoter/
SIFT	http://sift.jcvi.org/
UCSC Genome Browser	http://genome.ucsc.edu/

3.2 Methoden

3.2.1 Zellkulturtechniken

Die folgenden Zellkulturarbeiten wurden unter sterilen Bedingungen unter einer Sterilbank mit sterilen Lösungen und Materialien durchgeführt. Alle Medien und benötigten Lösungen wurden vorher im Wasserbad bei 37 °C aufgewärmt.

3.2.1.1 Kultivierung adhärent wachsender Zellen

Bei den in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien handelt es sich um Adhäsionszellen, die in einem Monolayer wachsen. Falls nicht anders beschrieben wurden alle Zelllinien wie in Abschnitt 3.1.6.2 aufgeführt in Vollmedium (DMEM 101) kultiviert und im Inkubator bei 37 °C und 5 % CO₂ in wasserdampfgesättigter Atmosphäre inkubiert. Entsprechend ihrer Verdopplungsrate wurden die Zellen alle 3 bis 4 Tage mit Trypsin/EDTA (Abschnitt 3.1.6.2) geerntet und im Verhältnis von 1:2 bis 1:10 mit Vollmedium verdünnt oder für die Verwendung in Transfektionsversuche in definierten Zellzahlen in 24 Well-Zellkulturplatten ausgebracht.

3.2.1.2 Kryokonservierung von humanen Zellen

Für die Langzeitlagerung von humanen Zellen wurden Kryokulturen angesetzt. Hierfür wurden die Zellen geerntet und die Zellzahl bestimmt. Anschließend wurden die Zellen mit einer Zelldichte von 1×10^6 Zellen in Einfriermedium (Abschnitt 3.1.6.2) aufgenommen und in ein Kryoröhrchen überführt. Die Kryokultur wurde zunächst in einem Isopropanol-Bad mit einer Temperaturabnahme von circa $1 \text{ }^\circ\text{C}/\text{min}$ auf $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ herunter gekühlt und anschließend bis zur Rekultivierung der Zellen in Flüssigstickstoff gelagert.

3.2.1.3 Auftauen von humanen Zellen

Das Auftauen der Kryokulturen erfolgte durch leichtes Schwenken im $37 \text{ }^\circ\text{C}$ warmen Wasserbad. Die aufgetaute Zellsuspension wurde in 10 ml Vollmedium aufgenommen und 5 min bei 1500 RPM zentrifugiert. Anschließend wurden die Zellen in frischem Vollmedium resuspendiert und auf eine 10 cm Zellkulturplatte ausgesät. Am nächsten Tag erfolgte ein Mediumwechsel.

3.2.1.4 Transiente Transfektion von humanen Zellen mit Plasmiden

Für Transfektionsversuche mit dem kationischen Lipid Fugene wurden die verwendeten Zellen (Abschnitt 3.1.6.1) einen Tag vorher mittels Trypsin/EDTA geerntet und auf Zellkulturschalen so ausgebracht, dass sie am nächsten Tag eine Zelldichte von circa 60 - 80 % aufwiesen (exponentielle Wachstumsphase). Für Luciferase-Reportergen-Analysen wurden die Zellen zunächst gezählt und mit einer Zellzahl von 20 000 Zellen/Well in 24 Well-Zellkulturplatten ausgesät. Die Transfektion mit Fugene erfolgte gemäß den Angaben des Herstellers. Hierfür wurden die Plasmide mit dem Transfektionsreagenz in serumfreien Medium (DMEM) vermischt. Bei Transfektionsansätzen für Zellkulturschalen wurden $10 \text{ }\mu\text{l}$ Fugene in $500 \text{ }\mu\text{l}$ serumfreien Medium (100 cm^2) bzw. $20 \text{ }\mu\text{l}$ Fugene in $1000 \text{ }\mu\text{l}$ serumfreien Medium (150 mm) und für Luciferase-Reportergen-Analysen $1,2 \text{ }\mu\text{l}$ Fugene in $100 \text{ }\mu\text{l}$ serumfreien Medium eingesetzt. Anschließend erfolgte eine 20-minütigen Inkubation bei Raumtemperatur, während derer ein Mediumwechsel der zu transfizierenden Zellen stattfand. Abschließend wurden die Zellen mit dem DNA-Fugene-Gemisch versetzt und weitere 24h im Inkubator inkubiert. Die Ernte der Zellen in Zellkulturschalen erfolgte durch vorsichtiges Abschaben der Zellen mit einem Zellheber und anschließendem Einfrieren des Zellpellets bis weitere Analysen durchgeführt wurden. Bei Luciferase-Reportergen-Analysen wurden die Zellen wie in Abschnitt 3.2.5.3 beschrieben weiterbehandelt.

Als Alternative zur Transfektion mittels Lipofektion wurde die Calciumphosphat-Transfektion durchgeführt. Die Calcium-Phosphat-Transfektion basiert auf der Feststellung, dass die Aufnahme von Nukleinsäuren in Zellen effizienter erfolgt, wenn diese als Präzipitat mit Calciumphosphat vorliegen (69). Diese unlöslichen Präzipitate lagern sich an die Zellmembran an und werden durch Endozytose aufgenommen.

Hierfür wurden die Zellen einen Tag vor Transfektion in große Zellkulturschalen (150 mm) so ausgesät, dass sie zum Transfektionszeitpunkt circa 80 % Konfluenz erreicht hatten. Eine Stunde vor Transfektion wurde das Medium der Zellen mit serumfreien Medium ausgetauscht. Anschließend wurden 62,3 µl der Calciumchlorid-Lösung und insgesamt 30 µg Plasmid-DNA vermischt und mit der HEPES-Lösung auf 500 µl aufgefüllt. Dieses Gemisch wurde dann tröpfchenweise zu 500 µl 2x HBS unter konstantem Vortexen hinzupipettiert. Das Transfektionsgemisch wurde 45 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend tröpfchenweise zu den Zellen hinzugegeben. Nach einer weiteren Inkubationszeit von circa 24 h wurden die Zellen mit Hilfe eines Zellhebers geerntet und bis zu den weiteren Analysen bei -80 °C eingefroren.

3.2.2 Mikrobiologische Methoden

3.2.2.1 Kultivierung von *E.coli* Bakterien

Die in dieser Arbeit verwendeten Bakterienstämme wurden standardmäßig in Flüssigkultur mit LB-Medium (Abschnitt 3.1.7.2) circa 16 h bei 37 °C und 250 RPM geschüttelt oder auf Agarplatten (Abschnitt 3.1.7.2) ausgestrichen und im Inkubator bei 37 °C inkubiert. Dabei wurde dem LB-Medium entsprechend der Vektorresistenz das Antibiotikum Ampicillin mit einer finalen Konzentration von 200 µg/ml bzw. Kanamycin mit einer finalen Konzentration von 70 µg/ml zugegeben. Die Agarplatten wurden ebenfalls der Vektorresistenz entsprechend wie in Abschnitt 3.1.7.2 beschrieben mit Antibiotikum versetzt.

3.2.2.2 Herstellung chemisch-kompetenter *E.coli* Bakterien

Mit der Rubidiumchlorid-Methode (70) wurden im Rahmen dieser Arbeit chemisch-kompetente Bakterien hergestellt, die dann mittels Hitzeschock-Methode (Abschnitt 3.2.2.3) transformiert werden konnten.

Hierfür wurde eine LB-Agarplatte ohne Antibiotikum mit dem jeweiligen *E.coli*-Stamm bestrichen und bei 37 °C über Nacht inkubiert. Anschließend wurde eine Vorkultur von 20 ml Φ -Medium (Abschnitt 3.1.7.2) mit 5 Kolonien von der LB-Agarplatte angeimpft und bis zu einer optischen Dichte von OD₆₀₀ 0,3 - 0,5 bei 37 °C und 250 RPM geschüttelt. 200 ml Φ -Medium wurden mit 10 ml der Vorkultur inokuliert und weitere 3 - 4 h bis zu einer optischen

Dichte von OD_{600} 0,48 bei 37 °C und 250 RPM geschüttelt. Nach einer 15-minütigen Zentrifugation der Bakteriensuspension bei 3000 RPM (Zentrifuge Avanti J-30I Centrifuge) und 4 °C wurde Bakterienpellet in 20 ml TfbI-Puffer (Abschnitt 3.1.7.2) resuspendiert und 90 min auf Eis inkubiert. Nach einer weiteren Zentrifugation für 15 min bei 3000 RPM (Zentrifuge Avanti J-30I Centrifuge) und 4 °C wurde das Pellet in 2 ml TfbII-Puffer (Abschnitt 3.1.7.2) resuspendiert und mit einem Volumen von 50 μ l aliquotiert. Abschließend wurden die chemisch-kompetenten Bakterien in Flüssigstickstoff eingefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

3.2.2.3 Transformation chemisch-kompetenter Bakterien

Für eine Transformation wurden zu 50 μ l chemisch-kompetenter Bakterien (Abschnitt 3.2.2.2) 5 μ l eines Ligationsansatzes bzw. 1 μ l einer Midi-Präparation (Abschnitt 3.2.3.7) hinzugegeben und 10 min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte ein 2-minütiger Hitzeschock, wonach sofort 450 μ l LB-Medium ohne Antibiotikum zu dem Transformationsansatz hinzugegeben wurde. Nach einer Inkubation von 1 h bei 37 °C und 225 RPM wurden die Bakterien auf LB-Agarplatten mit dem der Vektorresistenz entsprechenden Antibiotikum ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

3.2.2.4 Kultivierung des Hefestammes AH109

Der in dieser Arbeit verwendete Hefestamm AH109 wurde standardmäßig auf YPD-Agarplatten bei 30 °C inkubiert oder in einer Flüssigkultur mit YPD-Medium bei 30 °C und 250 RPM über mehrere Tage geschüttelt. Die Vorkulturen für β -Galactosidase-Assays wurden in -2 SD-Medium bei 30 °C und 250 RPM geschüttelt (Abschnitt 3.1.8.2).

3.2.2.5 Transformation des Hefestammes AH109

Für die Transformation von Hefen wurden die Lithium-Acetat Methode, welche nach Ito *et al.* (71), Schiestl und Gietz (72), Hill *et al.* (73) und Gietz *et al.* (74) modifiziert wurde, durchgeführt. Hierfür wurden die Puffer in Abschnitt 3.1.5.5 verwendet. Zunächst wurde eine Vorkultur mit 5 ml YPD-Medium mit Hefen von einer YPD-Agarplatte inokuliert und 2 - 3 Tage bei 250 RPM geschüttelt. Am Tag der Transformation wurden 50 ml YPD-Medium mit der Vorkultur angeimpft und bis zu einem gewissen Trübungsgrad der Hefesuspension bei 30 °C und 250 RPM geschüttelt. Die Hefen wurden anschließend bei 3000 RPM für 5 min zentrifugiert und in 20 ml sterilem destillierten Wasser resuspendiert. Darauf folgten zwei weitere Waschschrte mit zunächst 1ml 1x TE-Puffer und anschließend 1 ml frisch angesetztem TE/LiAc. Die Hefen wurden im Anschluss in 250 - 300 μ l Te/LiAc aufgenommen. Ein Transformationsansatz bestand aus 50 μ l Hefezellsuspension, 5 μ l

Lachssperma-DNA (Ambion), 300 µl PEG 40 und jeweils 1 µl einer Midi-Präparation bei Kotransformation. Die Transformationsansätze wurden vorsichtig gevortext. Anschließend folgte der Hitzeschock bei 42 °C (Wasserbad) für 15 min. Nach dem Hitzeschock wurden die Hefen für 1 min auf Eis inkubiert und mit einem Volumen von 200 µl auf je eine -2 SD-Platte (Abschnitt 3.1.8.2) ausplattiert.

3.2.3 Molekularbiologische Methoden

3.2.3.1 Bestimmung der Konzentration und Reinheit von DNA-Lösungen

Durch Messung der Absorption bei 260 nm am Spektrophotometer Helios Omega UV-Vis wurde die Konzentration von DNA-Lösungen bestimmt. Hierfür wurde standardmäßig 2 µl DNA-Lösung auf die Nanoküvette pipettiert. Zudem wurde die Reinheit der DNA-Lösung festgestellt, indem der Quotient aus der Absorptionsmessung bei 260 nm und 280 nm ($A_{260 \text{ nm}}/A_{280 \text{ nm}}$) ermittelt wurde. Proteine absorbieren bei einer Wellenlänge von 280 nm. Daher diente der $A_{260 \text{ nm}}/A_{280 \text{ nm}}$ -Wert als Indikator für die mögliche Verunreinigung der Nukleinsäure-Lösung durch Proteine. Ein Quotient zwischen 1,8 - 2,0 wurde als optimal betrachtet.

3.2.3.2 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Amplifikation von spezifischen DNA-Fragmenten erfolgte unter Verwendung verschiedener PCR-Kits und den entsprechenden Polymerasen. Die Polymerasen wurden je nach Länge und Sequenz (z.B. GC-reiche Sequenz) des zu amplifizierenden DNA-Fragments ausgesucht und nach Herstellerangaben verwendet. Bei Bedarf wurden die PCR-Bedingungen verändert, um die PCR-Reaktion zu optimieren.

Standardmäßig wurde zur Amplifizierung von kurzen DNA-Fragmenten (bis zu 1,5 kb), sowie zur Sequenzierung die *Taq*-Polymerase von MP Biomedicals, Qiagen oder 5'Prime nach dem Protokoll des jeweiligen Herstellers eingesetzt.

Für längere PCR-Fragmente wurden Polymerasegemische gemäß den Angaben des Herstellers verwendet, die neben der *Taq*-Polymerase eine zusätzliche Polymerase mit 3'→5'-Exonuklease-Aktivität (Korrekturlese-Aktivität, *proofreading*-Aktivität) aufweisen. Hierzu gehören die *Expand-Long-Range* DNA-Polymerase von Roche, die *High Fidelity Platinum* Polymerase von Fermentas, sowie die *Platinum Taq* DNA-Polymerase von Invitrogen.

Die Amplifikation von spezifischen Promotorregionen erweist sich oft als schwierig aufgrund der GC-reichen DNA-Sequenz. Standardmäßig wurde in diesem Fall das *GC Rich PCR-System* von Roche nach Herstellerangaben verwendet.

Zum Einfügen von krankheits-verursachenden Mutationen, die in Patienten identifiziert wurden, wurde das *QuikChange Site directed Mutagenesis Kit* von Stratagene nach dem Protokoll des Herstellers eingesetzt.

3.2.3.3 Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese diente zur Auftrennung von DNA-Fragmenten aus einer PCR-Reaktion (Abschnitt 3.2.3.2) oder nach Restriktion aus einem Plasmid (Abschnitt 3.2.3.8). Im Rahmen dieser Arbeit wurden je nach DNA-Fragmentlänge 1 - 2 %ige Agarosegele in 1x TBE-Puffer angesetzt und mit 0,33 µg/ ml des DNA-Interkalators Ethidiumbromid versetzt (Abschnitt 3.1.5.2). Die DNA-Proben wurden in DNA-Ladepuffer (Abschnitt 3.1.5.2) 1:3 verdünnt. Restriktionsansätze wurden mit einem speziellen Puffer vom Hersteller (Fermentas) angesetzt, welcher gleichzeitig als DNA-Ladepuffer diente. Als Laufpuffer diente ebenfalls 1x TBE-Puffer. Die Auftrennung erfolgte in einer horizontalen Agarosegelkammer bei 100 – 130 V für 30 – 60 min, je nach Länge der zu analysierenden DNA-Fragmente. Zur korrekten Größenordnung wurde ein adäquater DNA-Größenmarker mit aufgetragen (Abschnitt 3.1.10). Die Auftrennung der DNA-Fragmente wurde abschließend mit Hilfe eines UV-Tisches und einer Kamera visualisiert und dokumentiert.

3.2.3.4 Extraktion und Reinigung von DNA aus einem Agarosegel

PCR-Produkte und Restriktionsansätze wurden wie in Abschnitt 3.2.3.3 beschrieben mittels Agarosegelelektrophorese aufgetrennt und unter UV-Licht sichtbar gemacht. Banden auf der erwarteten Laufhöhe wurden mit einem Skalpell ausgeschnitten und die DNA mit dem *QIAquick Gel extraction* Kit von Qiagen nach dem vorgegebenen Protokoll extrahiert.

3.2.3.5 Ligation

Wurde im ersten Schritt einer Klonierung zur Amplifizierung eines spezifischen DNA-Abschnitts die Taq-Polymerase oder ein Polymerasen-Gemisch mit Taq-Polymerase verwendet, so wurde eine TA-Klonierung mit dem Klonierungsvektor pGEM[®]-T Easy (Promega) durchgeführt. Die Taq-Polymerase fügt an das 3'-Ende des synthetisierten Strangs ein zusätzliches Adenin an, welches aufgrund der fehlenden Korrekturlese-Aktivität (*proofreading activity*) nicht entfernt wird. Dahingegen liegt, in der *multiple cloning site* (MCS) des Klonierungsvektors ein Thymin-Überhang vor, sodass das PCR-Produkt in den Klonierungsvektor inseriert werden kann. Die Ligationsansätze wurden nach dem Protokoll des Herstellers in einem Volumen von 10 µl angesetzt. Dabei wurde darauf geachtet, dass das Verhältnis von Vektor zu *Insert* bei 1:3 (Vektor:*Insert*) lag. Der Ligationsansatz wurde 1 h

bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend 5 µl davon in die Transformation von *E.coli* DH5α erfolgte eingesetzt (Abschnitt 3.2.2.3). Der Rest des Ligationsansatzes wurde über Nacht bei 4 °C gelagert und bei Bedarf erneut zur Transformation verwendet.

Bei der Ligation von mutationsfreien *Inserts* in den Expressionsvektor wurde die T4-Ligase von Roche verwendet. Hierbei war zu beachten, dass sowohl Insert als auch Expressionsvektor zuvor mit den passenden Restriktionsenzymen behandelt und aufgereinigt werden mussten (Abschnitte 3.2.3.8, 3.2.3.4 und 3.2.3.9). Die Ligationsansätze wurden nach Herstellerangaben in einem Volumen von 10 µl angesetzt. Die Inkubation erfolgte für 1 h bei 17 °C, woraufhin 5 µl des Restriktionsansatzes in die Transformation von *E.coli* DH5α eingesetzt (Abschnitt 3.2.2.3) wurden und der Rest über Nacht bei 17 °C weiter inkubiert wurde.

PCR-Produkte, die keinen Adenin-Überhang an ihrem 3'-Ende aufwiesen (z.B. mit der Phusion Polymerase, Finnzymes) wurden in den pCRII Blunt-TOPO-Vektor (Invitrogen) nach den Angaben des Herstellers inseriert (Blunt-End-Klonierung). Auch hier wurde darauf geachtet, dass das Verhältnis von Vektor zu *Insert* bei 1:3 (Vektor:*Insert*) lag. Die Inkubationszeit betrug 5 min bei Raumtemperatur, woran sich die Transformation von *E.coli* DH5α anschloss.

3.2.3.6 Extraktion von Plasmiden in kleinem Maßstab (Mini-Präparation)

Im Verlauf einer Klonierung wurden die Plasmide zunächst in kleinem Maßstab aus den Bakterien extrahiert, um diese anschließend durch Restriktionsanalysen und DNA-Sequenzierung auf die richtige Länge und Sequenz zu untersuchen. Hierfür wurden 3 ml LB-Medium mit dem entsprechenden Antibiotikum (Abschnitt 3.1.7.2) versetzt und anschließend mit je einem Bakterienklon von der Agarplatte inokuliert. Diese Übernacht-Kulturen (ÜN-Kulturen) wurden circa 16 h bei 37 °C und 250 RPM geschüttelt. Für die folgenden Schritte wurden die Puffer in Abschnitt 3.1.5.1 verwendet. Zunächst wird jeweils 1,5 ml der ÜN-Kultur durch eine 5-minütige Zentrifugation bei 5000 RPM pelletiert und anschließend in Puffer 1 resuspendiert. Anschließend erfolgte die alkalische Lyse durch Zugabe von 300 µl Puffer 2 und einer Inkubation von 3 min bei Raumtemperatur. Durch Zugabe von 300 µl eiskaltem Puffer 3 wurde der Lyseansatz neutralisiert und Proteine und RNA präzipitiert. Durch die folgende 15-minütige Zentrifugation bei 10 000 RPM und 4 °C wurden die Präzipitate pelletiert, sodass man den Überstand mit der DNA zur Präzipitation in 500 µl 100 % Ethanol überführen konnte. Nach einer weiteren 20-minütigen Zentrifugation bei 13 000 RPM und 4 °C, wurde das DNA-Pellet mit 300 µl 70 % Ethanol gewaschen, ein letztes Mal für 5 min bei 10 000 RPM zentrifugiert und der gesamte Überstand verworfen. Das DNA-Pellet wurde in der Speed Vac Plus Sc110 A (Savant) für 5 min getrocknet und im Abschluss in 20 µl destilliertem Wasser gelöst.

3.2.3.7 Extraktion von Plasmiden in mittelgroßem Maßstab (Midi-Präparation)

Zur Extraktion von Expressionsplasmiden in mittelgroßem Maßstab und hoher Reinheit wurde das Pure Yield™ Plasmid-Midiprep-System (Promega) nach Herstellerangaben verwendet. Hierfür wurden am Abend zuvor 100 ml LB-Medium mit dem entsprechenden Antibiotikum versetzt (Abschnitt 3.1.7.2) und mit dem Rest der ÜN-Kultur des als positiv identifizierten Klons inokuliert. Diese Bakterienkultur wurde bis zur Midi-Präparation circa 16 h im Inkubator bei 37 °C geschüttelt.

3.2.3.8 Restriktionsverdau

Bei Restriktionsenzymen handelt es sich um bakterielle Endonukleasen, die in der Lage sind, spezifische, meist palindromische Nukleotidsequenzen zu erkennen und an definierten Stellen zu spalten. Hierbei kann eine gerade Spaltung stattfinden, sodass stumpfe Enden (*blunt ends*) entstehen oder eine versetzte Spaltung, bei der ein Überhang von Nukleotiden (*sticky ends*) generiert wird. Letzteres ermöglicht die Durchführung einer gerichteten Klonierung, wenn zwei unterschiedliche Restriktionsenzyme verwendet wurden (Abschnitt 3.2.3.5). In dieser Arbeit wurden ausschließlich Restriktionsenzyme der Firma Fermentas nach Herstellerangaben verwendet, um bei Klonierungen Plasmid-DNA mit dem entsprechenden *Insert* anhand des Restriktionsprofils zu analysieren oder um zu einander kompatible Enden von DNA-Fragmenten zu generieren. Letzteres war ein wichtiger Schritt als Vorbereitung für die Ligation von PCR-Produkten mit den jeweiligen Restriktionsschnittstellen in das entsprechend vorbereitete Plasmid und wurde standardmäßig in einem 30 µl-Ansatz mit universellem 10x Restriktionspuffer angesetzt und 3 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend erfolgte eine Aufreinigung durch Gelfiltration (Abschnitt 3.2.3.9). Die Ansätze für die Erstellung eines Restriktionsprofils wurden standardmäßig in einem Volumen von 15 µl und dem grünen 10x Restriktionspuffer angesetzt, sodass die Restriktions-Ansätze im Anschluss der Inkubation direkt auf ein Agarosegel aufgetragen wurden.

3.2.3.9 Aufreinigung von Plasmid-DNA nach einem Restriktionsverdau

Als Vorbereitung für den Einsatz in einer Klonierung wurden Plasmide mit den benötigten Restriktionsenzymen geschnitten (Abschnitt 3.2.3.8) und anschließend nach Herstellerangaben mit den Millipore Centrifugal Filter Units mittels Gelfiltration aufgereinigt.

3.2.3.10 Sequenzierung von Plasmiden

Die Sequenzierung von Plasmiden erfolgte zum Ausschluss von im Klonierungsverlauf eventuell entstandenen Mutationen. Die hier verwendete Sequenziermethode basiert auf dem Prinzip der Kettenabbruchmethode nach Sanger (75). Dieses Verfahren wird ebenfalls als Didesoxy-Methode bezeichnet, weil dem PCR-Ansatz zusätzlich zu den Standard-Nukleotiden unterschiedlich Fluoreszenz-markierte Didesoxy-Nukleotide hinzugefügt werden. Wird einer dieser Didesoxy-Nukleotide von der Polymerase bei der Amplifizierung des zu sequenzierenden DNA-Abschnitts eingebaut, so kommt es zu einem Kettenabbruch. Damit entstehen DNA-Fragmente von unterschiedlicher Länge, die am Ende ihrer Sequenz eine spezifische Fluoreszenzmarkierung für die jeweils eingebaute Base tragen und durch Kapillarelektrophorese ihrer Länge nach aufgetrennt werden können. Mittels eines Lasers wird die Fluoreszenzmarkierung angeregt und von einem Detektor aufgenommen und umgewandelt, sodass man mit einem entsprechenden Programm das spezifische Elektropherogramm der sequenzierten DNA erhält.

Die Bedingungen für die Sequenzier-PCR sahen standardmäßig wie folgt aus:

<u>Temperatur</u>	<u>Zeit</u>		<u>PCR-Ansatz:</u>	<u>Volumen</u>
96 °C	1 min] 25 Zyklen	BigDye [®] Terminator Mix v 1.1/3.1	2 µl
96 °C	10 s		5 x Sequenzierpuffer	1 µl
48-55 °C	5 s		Sequenzierprimer 5 µM	1-2 µl
60 °C	1 min		DNA aus Mini-Präparation	1-2 µl
			H ₂ O	<u>x µl</u>
				10 µl

Anschließend wurden die Sequenzierproben über DyeEx 2.0 Spin-Säulen oder in Multiscreen-Filterplatten über frisch angesetzte Sephadex G-50-Säulen nach den Protokollen der Hersteller aufgereinigt. 15 µl der aufgereinigten Sequenzierprobe wurden mit 5 µl Formamid (HiDi-Formamid) in einer 96-Wellplatte (96-well Optical Reaction Plate) vermischt und mit dem Standardprotokoll im Sequenziergerät 3130X/Genetic Analyzer mittels Kapillarelektrophorese aufgetrennt. Abschließend wurden die erhaltenen Sequenzen gegen die Referenzsequenz unter Verwendung der Programme SeqMan, Editseq (DNAS^tar) und Chromas (Technelysium Pty Ltd) verglichen.

3.2.3.11 Aufreinigung von DNA mittels Phenol / Chloroform

Zur Aufreinigung von DNA mittels Phenol und Chloroform (76) wurde ein Aliquot einer DNA- bzw. Chromatin-Lösung (Abschnitt 3.2.5.1) in einem 0,5-fachen Volumen an Phenol und einem ebenfalls 0,5-fachen Volumen an Chloroform aufgenommen. Die Zugabe von Phenol und Chloroform führt zum Ausfällen von Proteinen, welche sich dann in der Interphase zwischen der oberen wässrigen und der unteren hydrophoben Phase sammeln. In der

oberen wässrigen Phase löst sich die hydrophile DNA und kann durch Zugabe von Ethanol ausgefällt werden. Nach dem der Ansatz gevortext wurde, folgte eine 30-minütige Zentrifugation bei 13 000 RPM und 4 °C. Anschließend wurde die obere wässrige Phase mit der gelösten DNA in ein frisches Reaktionsgefäß überführt. Die DNA-Lösung wurde in einem 2,5-fachen Volumen an 100 %igem Ethanol und NaCl mit einer finalen Konzentration von 200 mM versetzt, gevortext und 30 min bei 13 000 RPM und 4 °C zentrifugiert. Das DNA-Pellet wurde einmal mit 500 µl 70 %igem Ethanol gewaschen, erneut zentrifugiert und anschließend unter Vakuum in der Speed Vac Plus Sc110 A (Savant) getrocknet. Die DNA wurde standardmäßig in 20 µl destilliertem Wasser gelöst und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

3.2.3.12 Extraktion und Fragmentierung von Chromatin aus humanen

Zellen

Als Vorbereitung für die Chromatin-Immunpräzipitation (Abschnitt 3.2.5.1) wurde das zu untersuchende Chromatin aus humanen Zellen extrahiert und mittels Sonifizierung fragmentiert. Hierfür wurden die Puffer und Lösungen in Abschnitt 3.1.5.9 verwendet. Zunächst wurden SH-SY5Y-Zellen in 144 mm-Zellkulturschalen mit dem THAP1-FLAG- bzw. FLAG-Expressionsplasmid als Negativkontrolle transfiziert (Abschnitt 3.2.1.4), am nächsten Tag in 40 ml DMEM 101 mit einem Zellheber geerntet und die Zellsuspension 10 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden 4 ml *Crosslinking*-Lösung zur Zellsuspension hinzugegeben und weitere 10 min auf Eis inkubiert. Durch die Formaldehyd-Behandlung werden Nukleinsäuren mit Proteinen und Proteine mit Proteinen miteinander verknüpft. Die *Crosslinking*-Reaktion wurde durch Zugabe von 2,2 ml 2,5 M Glycin (1/20 des Gesamtvolumens) abgestoppt. Es folgte eine Zentrifugation bei 2000 g und 4 °C für 10 min. Die Zellen wurden dann zweimal mit gekühltem PBS gewaschen und anschließend in Flüssigstickstoff eingefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

Zur Extraktion der Zellkerne und anschließend des Chromatins wurden die Zellpellets zunächst aufgetaut, in 15 ml Lysepuffer 1 resuspendiert und für 10 min bei 4 °C auf einem Schüttler inkubiert. Es folgte eine 10 minütige Zentrifugation bei 2000 g und 4 °C. Dieser Vorgang wurde mit 12 ml Lysepuffer 2 wiederholt, wobei die Inkubation für 10 min bei Raumtemperatur stattfand. Abschließend wurde das Pellet in 5 ml Lysepuffer 3 aufgenommen und das Chromatin mit dem Ultraschall Homogenisator SONOPULS (Bandelin electronics) im Institut für Physiologie, AG Dr. Reinhard Depping, fragmentiert. Hierfür wurde der Ansatz durchgehend auf Eis gekühlt und 10 - 15 Zyklen mit folgenden Einstellungen sonifiziert: Sonotrode: MS73, Dauer: 30 s, Pulsieren: aus, Amplitude: 60 %, maximale Temperatur: 30 °C, Temperatur Kontrolle: Alarm. Im Anschluss folgte eine Zentrifugation für 10 min bei 10 000 g und 4 °C. So wurden die Zelltrümmer pelletiert, der

Überstand mit dem fragmentierten Chromatin in Aliquots in frische Reaktionsgefäße überführt und diese bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert. Vor dem Einfrieren wurden zur Kontrolle einer erfolgreichen Fragmentierung des Chromatins jeweils $100\text{ }\mu\text{l}$ in ein frisches Reaktionsgefäß überführt und mit 2% Glykogen und $4\text{ }\mu\text{l}$ einer Proteinase K-Lösung mit einer Konzentration von 10 mg/ml für 2 h bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ inkubiert. Es folgte eine zweifache Phenol-Chloroform-Extraktion (Abschnitt 3.2.3.11), woraufhin das DNA-Pellet im Anschluss in $20\text{ }\mu\text{l}$ destilliertem Wasser aufgenommen wurde. Abschließend wurden $10\text{ }\mu\text{l}$ der aufgereinigten DNA-Lösung auf einem 1% igen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt (Abschnitt 3.2.3.3). Bei einer erfolgreichen Fragmentierung des Chromatins sollten die Chromatin-Fragmente eine Länge von $200 - 1000$ Basenpaaren aufweisen, wobei der Hauptanteil bei einer Länge von circa 600 Basenpaaren haben sollte.

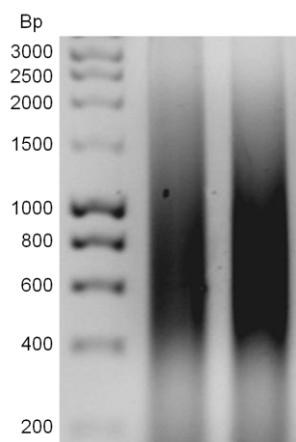


Abbildung 3.1: Fragmentiertes Chromatin.

Exemplarisch sind zwei unterschiedlich konzentrierte Chromatinlösungen gezeigt. Das Chromatin wurde auf einem 1% igen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Die Fragmentierung des Chromatins führte zu Chromatin-Fragmentlängen von $200 -$ circa 1000 Basenpaaren (Bp). Der Hauptanteil des Chromatins weist eine Länge von circa 600 Basenpaaren auf.

3.2.4 Proteinanalytische Methoden

3.2.4.1 Chemische Zellyse

Humane Zellen (sich Abschnitt 3.1.6.1) wurden durch die Behandlung mit RIPA-Puffer (Abschnitt 3.1.5.8) aufgeschlossen. Dabei wird die Zellmembran durch das im RIPA-Puffer enthaltene Detergenz NP-40 zerstört während das HEPES den physiologischen pH-Wert stabilisiert. Die Ionenstärke wird durch das Lithiumchlorid aufrechterhalten und das EDTA dient zur Komplexbildung von Protease-aktivierenden zweiwertigen Kationen. Zudem wurde zum benötigten Volumen RIPA-Puffer ein Protease-Inhibitor-Cocktail (PIC Complete, Mini Protease Inhibitor Cocktail, Roche) im Verhältnis von $250:1$ (PIC:RIPA) frisch hinzugegeben. Abhängig von der Größe des Zellpellets wurde dieses in $30 - 200\text{ }\mu\text{l}$ RIPA-PIC-Lysepuffer resuspendiert und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde der Zelldebris bei 10 000 RPM und $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ für 10 min pelletiert. Der Überstand mit dem Zellextrakt wurde in ein frisches Reaktionsgefäß überführt und für Westernblot-Analysen weiter behandelt (Abschnitt 3.2.4.8).

3.2.4.2 Mechanische Zellyse

Im Anschluss an die Überexpression von rekombinanten Proteinen in *E.coli*-Bakterien (Abschnitt 3.2.4.4) wurde das Bakterienpellet in 20 ml PBS-PIC-Lösung (Verhältnis 250:1) resuspendiert und mit dem Ultraschall Homogenisator SONOPULS (Bandelin electronics) mit der Sonotrode MS73 und folgenden Einstellungen sonifiziert:

Dauer: 5 min, Pulsieren: an, Puls an: 2 s, Puls aus: 1 s, Amplitude: 75 %, maximale Temperatur: 50 °C, Temperatur Kontrolle: Alarm. Dabei wurde die Bakterien-Suspension durchgehend auf Eis gekühlt. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation bei 12 000 RPM und 4 °C für 1 h, um den Zelldebris zu pelletieren. Der Überstand mit dem Zellextrakt wurde in ein frisches 50 ml-Röhrchen überführt und für die GST-Aufreinigung weiterbehandelt (Abschnitt 3.2.4.5). Die mechanische Zellyse mittels Ultraschall Homogenisator erfolgte im Institut für Physiologie, Arbeitsgruppe Dr. Reinhard Depping.

Im Verlauf des β -Galactosidase-Assays wurden die Hefen lysiert, in dem sie für vier bis fünf Zyklen abwechselnd zunächst in Flüssigstickstoff eingefroren und anschließend im Wasserbad bei 37 °C aufgetaut wurden. Diese effektive Methode zum Aufbrechen der Zellwände wurde 1996 von Schneider *et al.* (77) beschrieben.

3.2.4.3 Herstellung *in vitro* translaterter Proteine

Für die Herstellung *in vitro* translaterter Proteine wurde das TNT® *Quick coupled Transcription/Translation* System von Promega nach Herstellerangaben verwendet. Für EMSA-Analysen (Abschnitt 3.2.5.2) wurde das im Kit enthaltene nicht-radioaktiv-markierte Methionin nach Herstellerangaben eingesetzt. Dahingegen wurden für GST-*Pulldown*-Analysen (Abschnitt 3.2.6.1) für einen 50 μ l-Ansatz jeweils 2 μ l radioaktiv-markiertes Methionin ([³⁵S] L-Methionine 18,5Mbq (500 μ Ci) in 50 μ l, Hartmann Analytic) eingesetzt. Bei den Templates für die Herstellung *in vitro* translaterter, radioaktiv-markierter Proteine, die in GST-*Pulldown*-Analysen eingesetzt wurden, handelte es sich um verschiedene THAP1-Konstrukte im pGBKT7-Plasmid.

3.2.4.4 Expression von rekombinantem Protein in dem *E. coli*-Stamm BL21

Zur Expression von GST-gekoppelten Fusionsproteinen wurden *E.coli*-BL21-Bakterien verwendet, die mit dem entsprechenden prokaryotischen Expressionsplasmid pGEX4T2 transformiert waren. Dieses prokaryotische Expressionsplasmid exprimiert nach Induktion mit IPTG (Abschnitt 3.2.4.4) das entsprechend inserierte DNA-Konstrukt als Fusionsprotein mit einer N-terminal gekoppelten GST-Domäne aus *Schistosoma japonicum* (78). Im

Rahmen dieser Arbeit wurde mit GST-THAP1-pGEX4T2 (GST-THAP1-Protein), GST-THAP3-pGEX4T2 (GST-THAP3-Protein) und pGEX4T2 (GST-Protein) gearbeitet.

Zunächst wurden 2 ml Selektions-LB-Medium (Ampicillin) (Abschnitt 3.1.7.2) mit einem Klon der entsprechend transformierten Bakterien von der Agarplatte inokuliert. Nach 5 - 6 h Inkubation bei 37 °C und 250 RPM wurden 100 ml Selektions-LB-Medium mit der kleinen Vorkultur inokuliert und über Nacht bei 37 °C und 250 RPM geschüttelt. Anschließend wurden 500 ml Selektions-LB-Medium mit 5 ml der 100 ml-Vorkultur (1 %) inokuliert. Die Messung der optischen Dichte zum Zeitpunkt der Inokulation ergab dabei in der Regel eine OD_{600} von 0,05. Es folgte eine Inkubation bei 37 °C und 250 RPM bis zu einer OD_{600} von 0,5. Daraufhin wurde Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid (IPTG) in einer finalen Konzentration von 0,5 mM hinzugegeben. Die folgende Induktionsdauer betrug 3 h. Die Ernte der Bakterien erfolgte bei Raumtemperatur und 6000 RPM für 30 min. Die Bakterienpellets wurden bis zur Sonifizierung (Abschnitt 3.2.4.2) und anschließender Aufreinigung mittels Glutathion Sepharose (Abschnitt 3.2.4.5) bei -80 °C gelagert.

3.2.4.5 Aufreinigung von GST-gekoppelten Fusionsproteinen

Die Aufreinigung von Glutathion-S-Transferase (GST)-gekoppelten Fusionsproteinen aus bakteriellem Extrakt (Abschnitt 3.2.4.2) erfolgte mittels Affinitätschromatographie über Glutathion-Sepharose 4B (GE Healthcare). Hierfür wurden die Lösungen und Puffer in Abschnitt 3.1.5.14 verwendet.

Zunächst wurde die Glutathion-Sepharose gut resuspendiert und zweimal mit PBS-KM gewaschen. Alle Zentrifugationsschritte erfolgten bei 4 °C und 3200 RPM für 5 min. Die Bindung der GST-Fusionsproteine an die Glutathion-Sepharose fand in einem Überkopfschüttler bei 4 °C über Nacht statt. Anschließend wurde das Bakterienextrakt-Glutathion-Sepharose-Gemisch abzentrifugiert und viermal mit PBS-KM gewaschen. Die Überstände wurden als „Ungebundene Fraktion und Waschschrift 1 – 4“ bei 4 °C gelagert. Mit dem letzten Waschschrift wurde das Bakterienextrakt-Glutathion-Sepharose-Gemisch in eine Polypropylen-Säulen (Qiagen) überführt. Anschließend erfolgte die Elution in vier bis sechs Schritten mit jeweils 500 μ l Elutionspuffer und 10 - 30 min Inkubation im Überkopfschüttler bei 4 °C. Zur Kontrolle der Aufreinigungsschritte wurden Aliquots von der ungebundenen Fraktion, den Waschschriften und den Elutionsschritten auf mittels SDS-PAGE und anschließender kolloidalen Coomassie-Färbung (Abschnitt 3.2.4.7) analysiert. Daraufhin wurden alle Elutionsfraktionen mit dem GST-gekoppelten Protein vereinigt und in einem Dialyseschlauch (cut-off:12-16 kD, Biomol) gegen 1 l Dialysepuffer über Nacht bei 4 °C dialysiert. Anschließend wurde die Proteinlösung bei Bedarf mit einer Centriprep® Ultracel YM-50 (Millipore) bei 4 °C und 1500 RPM für 5 - 10 min eingeeengt. Es folgte die Bestimmung der Proteinkonzentration wie in Abschnitt 3.2.4.6 beschrieben. Zur Lagerung

wurde die Proteinlösung von GST-THAP1 und GST-THAP3 aliquotiert und bei -80 °C gelagert. Die GST-Protein-Lösung wurde standardmäßig bei 4 °C gelagert.

3.2.4.6 Bestimmung der Konzentration von Proteinen in Lösung

Für die Bestimmung der Konzentration von Proteinen in Lösung wurde in dieser Arbeit die kolorimetrische Methode nach Bradford (79) verwendet. Hierfür wurde eine Standardreihe von 0 - 10,5 µg/µl Protein mit BSA in Doppelansätzen in eine durchsichtige 96-Well-Mikroplatte pipettiert. Die zu untersuchende Proteinlösung wurde ebenfalls in Doppelansätzen mit einem Volumen zwischen je 2 - 8 µl vorgelegt. Anschließend wurden in jeweils 200 µl Bradford-Reagenz (Abschnitt 3.1.5.3) in jeden Ansatz zugegeben und die 96-Well-Mikroplatte auf einem Schüttler für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgte die Messung der Absorption bei 595 nm im ELISA-Reader SLT Rainbow (SLT Labinstrumente GmbH).

3.2.4.7 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die **SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)** diente der Auftrennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht und wurde nach der Methode von Laemmli (64) durchgeführt. In dieser Arbeit wurden Polyacrylamidgele mit 4 %igem Sammelgel und 10 - 16 %igem Trenngel (Abschnitt 3.1.5.3) verwendet. Hierfür wurden die Protein-Proben (Abschnitt 3.2.4.1 und 3.2.4.2) durch Zugabe von einem entsprechenden Volumen an 2x SDS-Probenpuffer 5 min bei 95 °C denaturiert. Die Proteinproben wurden anschließend in definierten Volumina auf das SDS-Gel auftragen und zunächst bei 80 V bei Raumtemperatur bis zum Sammelgel laufen gelassen. Danach wurde die Voltzahl auf 120 - 130 V (Raumtemperatur) erhöht und die Proteine mit einer Laufzeit von 30 - 45 min aufgetrennt. Als Größenstandard wurden standardmäßig 2 µl PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder (Fermentas) aufgetragen. Im Anschluss wurde das SDS-Gel für Westernblot-Analysen (Abschnitt 3.2.4.8) weiter verwendet oder mit kolloidalem Coomassie (Abschnitt 3.1.5.3) gefärbt.

3.2.4.8 Westernblot

Im Anschluss an die elektrophoretische Auftrennung der Proteine mittels SDS-PAGE (Abschnitt 3.2.4.7) wurden die Proteine mittels der Semi-Dry-Technik auf eine Polyvinylidendifluorid (PVDF)-Membran (Roche) transferiert. Hierfür wurde die PVDF-Membran zunächst in 100 %igem (v/v) Methanol aktiviert und anschließend 5 min in Transferpuffer (Abschnitt 3.1.5.3) äquilibriert. Das SDS-Gel wurde ebenfalls 5 min in

Transferpuffer inkubiert, um alle Salze und Detergenzien zu entfernen. Das Whatmanpapier wurde ebenfalls in Transferpuffer getränkt. Für das Blotten wurden die Komponenten in folgender Anordnung geschichtet in der Semi-Dry Transfer Cell (BioRad):

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

Bei der Schichtung des Blots mussten Luftblasen vermieden werden. Der Proteintransfer erfolgte bei 1 A (25 V) für 15 min (RT).

Im Anschluss wurde die Membran 10 min in PBS gewaschen und 1 h bei 4 °C in 4 % Magermilch(w/v)-PBS-Lösung inkubiert, um freie Bindungsstellen auf der Membran abzusättigen. Die Blockierungslösung wurde entfernt und die Membran mit dem spezifischen Primärantikörper (Abschnitt 3.1.11), welcher in der entsprechenden Verdünnung in 3 - 4 % Magermilch(w/v)-PBS-Lösung oder PBS verdünnt war, über Nacht bei 4 °C inkubiert. Am folgenden Tag wurde die Membran drei mal 10 min in PBS gewaschen und anschließend mit dem Sekundärantikörper (Abschnitt 3.1.11), welcher ebenfalls in 4 % Magermilch(w/v)-PBS-Lösung verdünnt war, 1 h bei RT inkubiert. Nach dem die Membran abschließend drei mal 10 min in PBS gewaschen wurde, erfolgte die Detektion über den Meerrettichperoxidase (HRP)-konjugierten Sekundärantikörper bzw. direkt über den HRP-konjugierten anti-Myc-Antikörper. Hierfür wurde das Enhanced Chemiluminescence (ECL)-Kit (Pierce) nach Herstellerangaben verwendet. Die Detektion erfolgte mit dem Westernblot-Dokumentationssystem von Vilber Lourmat nach dem Protokoll des Herstellers.

3.2.4.9 2D-Gelelektrophorese

Die von der *GFP-Trap*-Agarose eluierten Proteine (Abschnitt 3.2.6.2) wurden im nächsten Schritt mittels 2D- (Zweidimensionaler-) Gelelektrophorese nach ihrem isoelektrischen Punkt (IEF, erste Dimension) und ihrem Molekulargewicht (zweite Dimension) aufgetrennt (80). Dieses Verfahren wurde im chirurgischen Forschungslabor in der Klinik für Chirurgie von Dr. Timo Gemoll, Arbeitsgruppe Prof. Dr. Dr. Jens Habermann, durchgeführt.

Die THAP1-GFP- und die GFP-Probe (Negativkontrolle) wurden zunächst mit dem ReadyPrep™ 2-D Cleanup Kit (Bio-Rad) nach dem Protokoll des Herstellers aufgereinigt, entsalzt und in 10 µl 2D-Lysepuffer. Zum Auftragen von vergleichbaren Mengen an Protein wurden anschließend die Konzentrationen der Proteine in Lösung mit dem EZQ® Protein Quantitation Kit (Invitrogen) nach Herstellerangaben bestimmt. Die Proteine wurden in einer definierten Konzentration in 450 µl Rehydrationspuffer aufgenommen und auf einen

immobilisierten pH-Gradienten-Streifen (Immobiline DryStrip pH 4 - 7, 24 cm, GE Healthcare) inkubiert. Die isoelektrische Fokussierung fand stufenweise in einer Protean-IEF-Zelle (Bio-Rad) bei 20 °C und 500 Volt (1 h), über 1000 Volt (Gradient, 1 h) und 10 000 Volt (Gradient, 3 h), bis zu einem abschließenden Fokussierungsschritt für 4 h bei 10 000 Volt statt. Die pH-Gradienten-Streifen wurden im HPE™-Puffer-Kit (Serva) zweimal für 15 min äquilibriert. Anschließend folgte die Auftrennung der Proteine auf einem ultradünnen, 12,5 %igen Acrylamidgel (HPE™-Gele, Serva) nach ihrem Molekulargewicht bei 40 mA und 12 °C im HPE™ FlatTop-Tower-System (Serva).

Für die Silberfärbung wurde das 2D-Gel zweimal 30 min in 250 ml Fixierungslösung fixiert, in 250 ml Sensibilisierungslösung über Nacht inkubiert und für 40 min in 250 ml Silberfärbelösung geschwenkt. Zwischen den einzelnen Inkubationsschritten wurde das Gel viermal für 5 min in 500 ml aqua dest gewaschen. Die Entwicklung erfolgte durch eine 2,5 minütige Inkubation in 250 ml Entwicklerlösung, welche durch eine 30 minütige Inkubation in 250 ml Stopplösung gestoppt wurde. Abschließend wurde das Gel zur Konservierung 30 min in 250 ml Konservierungslösung inkubiert und in Folie eingeschweißt.

Die Auswahl der zu untersuchenden *Spots* wurde manuell mit Hilfe des Bildanalyseprogramms Progenesis Same Spots (Nonlinear dynamics) durchgeführt.

Im Anschluss zur Silberfärbung bzw. Visualisierung der *Spots* mit dem Typhoon FLA900 wurden die manuell ausgewählten *Spots* (klar voneinander abzugrenzende *Spots* im Vergleich THAP1-GFP zu GFP) mit dem Etton Spot Picker (GE Healthcare) ausgestanzt und zur massenspektrometrischen Analyse in das Deutsche Diabeteszentrum in Düsseldorf (Ansprechpartner: Dr. Stefan Lehr) geschickt. Die Zuordnung bzw. Identifizierung der unbekannt Proteine erfolgte durch den Vergleich des observierten Spektrums mit dem Spektrum von bereits bekannten Proteinen aus einer Datenbank. Dabei beschreibt der *Mascot-Score* mit der Formel $-10 \cdot \log(P)$ die Wahrscheinlichkeit, mit der die beobachtete Übereinstimmung zufällig ist und wird als Grenzwert für die Identifizierung von unbekannt Proteinen verwendet.

3.2.5 Untersuchung von Protein-DNA-Interaktionen

3.2.5.1 Chromatin-Immunpräzipitation (ChIP)

Zum Nachweis der spezifischen Bindung des THAP1-Proteins an bekannte bzw. zu untersuchende Promotoren wurden in dieser Arbeit **Chromatin-Immunpräzipitationen (ChIP)** (81) durchgeführt. Diese Technik ermöglicht die Zuordnung von Protein-DNA-Interaktionen an eine spezifische Region im Genom *in vivo*. Hierfür werden Zellen mit Formaldehyd behandelt, sodass die DNA und Proteine miteinander verknüpft werden (*Cross-Link*). Das Chromatin wird durch Sonifizierung (Abschnitt 3.2.3.12) in kleine Fragmente

geschert und mit Hilfe eines spezifischen Antikörpers präzipitiert. Anschließend wird der *Cross-Link* zwischen DNA und Protein aufgehoben, die DNA aufgereinigt und der genomische Locus von Interesse mittels PCR und spezifischer Primer untersucht.

Für die ChIP-Analysen wurden die Puffer und Lösungen in Abschnitt 3.1.5.10 verwendet. Zu Beginn wurden jeweils 100 µl anti-FLAG M2-Agarose (Sigma) in ein Reaktionsgefäß überführt und dreimal mit 1 ml einer 5 mg/ml BSA-PBS-Lösung gewaschen. Die Zentrifugation erfolgte für 1 min bei 2000 g und 4 °C. Die anti-FLAG M2-Agarose wurde in 1 ml der 5 mg/ml BSA-PBS-Lösung aufgenommen und mit 10 µl einer Lachssperma-DNA-Lösung mit einer Konzentration von 9 mg/ml versetzt. Es erfolgte eine Prä-Inkubation zur Absättigung der unspezifischen Bindestellen für 6 h auf einem Überkopfschüttler bei 4 °C. Im Anschluss folgte eine Zentrifugation und die Resuspension der anti-FLAG M2-Agarose in je 1 ml Lysepuffer 3 (Abschnitt 3.1.5.9). Zu diesem Ansatz wurden 250 µl der Chromatin-Lösung aus den mit THAP1-FLAG- bzw. FLAG-Expressionsplasmid transfizierten SH-SY5Y (Abschnitt 3.2.3.12) hinzupipettiert. Nach einer Inkubation bei 4 °C über Nacht auf einem Überkopfschüttler wurden die ChIP-Ansätze dreimal mit je 1 ml vorgekühltem RIPA-Puffer gewaschen und anschließend in jeweils 50 µl Elutionspuffer aufgenommen. Es folgte eine 10-minütige Inkubation bei 65 °C und 450 RPM, die mit einer Zentrifugation für 1 min bei 2000 g und 4 °C abgeschlossen wurde. Der Überstand wurde in ein frisches Reaktionsgefäß überführt und mit einem 3-fachen Volumen an *Reverse-Crosslink*-Puffer versetzt. Zur Aufhebung der Bindungen zwischen DNA und Proteinen wurden die ChIP-Ansätze über Nacht bei 65 °C inkubiert. Als nächstes wurde die DNA durch Zugabe von einem 2,5-fachen Volumen an 100 %igem Ethanol und einer Inkubation bei -20 °C über Nacht präzipitiert. Es folgte eine Zentrifugation für 30 min bei 14 000 RPM und 4 °C. Das DNA-Pellet wurde einmal mit 70 %igem Ethanol gewaschen, anschließend in der Speed Vac getrocknet und in 120 µl Proteinase K-Lösung aufgenommen. Nach einer 4-stündigen Inkubation bei 37 °C wurde die DNA-Lösung in einem 5-fachen Volumen an PB-Puffer (Qiagen) aufgenommen und mit dem QIAquick Gel Extraction Kit von Qiagen nach dem Protokoll des Herstellers aufgereinigt. Die Elution erfolgte in 40 µl DNase-freiem Wasser.

Für die folgenden PCR-Analysen wurden 2 µl (5 %) der immunpräzipitierten DNA von einem ChIP-Ansatz in 25 µl Reaktionsansatz eingesetzt. Die PCRs wurden mit der Taq-Polymerase von MP Biomedicals nach dem Protokoll des Herstellers durchgeführt. Als Kontrollen wurden Ansätze mit jeweils 50 ng genomischer DNA, 50 ng der entsprechende Plasmid-DNA und einer Wasserkontrolle mitgeführt. Zum Nachweis der spezifischen Bindung von THAP1 an die jeweilige Promotorregion des zu untersuchenden Zielgens wurden ebenfalls PCR-Ansätze mit Primern für nicht-relevante Promotoren (Kern-Promotor-Bereich des *NIPBL*-Gens und des *Ptch*-Gens) mitgeführt. Die PCR-Produkte wurden im Anschluss auf einem 2 %igen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt.

3.2.5.2 Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA)

Als zusätzliche Methode zu Untersuchung der spezifischen Bindung des Transkriptionsfaktors THAP1 an bekannte oder zu untersuchende Promotorregionen wurde der *Electrophoretic Mobility Shift Assay* (EMSA) durchgeführt. Im Allgemeinen wird hierfür das Protein mit dem zu untersuchenden, radioaktiv-markierten DNA-Fragment inkubiert, auf einem nativen Polyacrylamid-Gel aufgetrennt und das radioaktive Signal der DNA mit Hilfe eines Phosphorimagers visualisiert. Findet eine Interaktion zwischen Protein und DNA-Fragment statt, so ist eine Verschiebung (*Shift*) des Protein-DNA-Komplexes im Vergleich zur freien DNA zu beobachten. Dieser *Shift* ist abhängig von der Ladung, der Konformation und der Größe des Protein-DNA-Komplexes und kann durch Zugabe eines spezifischen Antikörpers verstärkt werden (*Supershift*).

Die EMSAs wurden im Institut für Physiologie, Arbeitsgruppe Dr. Reinhard Depping, von Frau Bettina Stier durchgeführt. Hierfür wurden die Puffer in Abschnitt 3.1.5.11 verwendet. Zunächst wurde die zu untersuchende Promotorregion als DNA von der Firma Biomers bezogen und [³²P]-radioaktiv-markiert. Hierfür wurde ein 10 µl-Ansatz mit 2 µl des *Sense*-Strangs von einer 1 µM-*Stocklösung*, 2 µl 5x Puffer, 1 µl T4 Polynukleotid Kinase (Invitrogen), 2 µl [³²P]-γ-ATP (1,48 MBq; Hartmann Analytic) und 3 µl Nuklease freiem Wasser angesetzt und 20 min in einem Wasserbad bei 37 °C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von EDTA in einer finalen Konzentration von 50 mM abgestoppt. Anschließend wurde MgCl₂ in einer finalen Konzentration von 1 mM zur Stabilisierung der DNA-Stränge hinzugegeben. Der Hybridisierungsschritt wurde durch Zugabe des *Antisense*-Strangs in zweifachem Überschuss (4 µl von der 1 µM-*Stocklösung*) und Hineinstellen der Sonden in ein Wasserbad bei 70 - 90 °C eingeleitet. Das Wasserbad wurde sofort ausgeschaltet und der Hybridisierungsansatz über Nacht im abkühlenden Wasser inkubiert. Im Falle der EMSA-Analysen zur Untersuchung der Bindung des THAP1-Proteins an seinen eigenen Kernpromotor wurde das 480 Basenpaar-lange Oligonukleotid in einer Klenow-Reaktion nach einem modifizierten Protokoll von Feinberg und Vogelstein radioaktiv markiert (82). Die radioaktiven Sonden wurden am nächsten Tag in 100 µl destilliertem Wasser verdünnt und über eine adäquate Menge Sephadex G50 (Sigma-Aldrich) aufgereinigt. 1 µl der aufgereinigten, radioaktiv-markierten Sonden wurde im Szintillationscounter gemessen. Alle Sonden mit einem CPM-Wert von über 60 000 (optimaler CPM-Wert: 100 000) wurden in EMSAs eingesetzt. Ein 20 µl EMSA-Ansatz setzte sich standardmäßig wie folgt zusammen:

EMSA-Ansatz:	Volumen
EMSA-Puffer	2 μ l
5 x Bindepuffer	4 μ l
Lachsperma-DNA	5 μ l
radioaktiv-markierte Sonde	1 μ l
(nicht-radioaktiv-markierte Sonde)	2,5 μ l) bei Wettbewerbsansätzen
<i>in vitro</i> translatiertes Protein	x
H ₂ O	<u>x μl</u> 20 μ l

Zur Prüfung der Bindungsspezifität wurden ebenfalls Wettbewerbsansätze mitgeführt, bei denen die nicht-radioaktiv-markierte Sonde in 2,5-fachem Überschuss zur radioaktiv-markierten Sonde hinzugegeben wurde. Das Volumen der zu untersuchenden *in vitro* translatierten Proteine (Abschnitt 3.2.4.3) wurde nach der *in-vitro* Transkription/Translation und anschließendem Westernblot (je 2 μ l aufgetragen) und Quantifizierung der entsprechenden Banden mit dem Programm AIDA bestimmt. So konnte bei der Untersuchung verschiedener *in vitro* translaterter Proteine eine vergleichbare Menge in den EMSA-Ansatz eingesetzt werden. Die EMSA-Ansätze wurden über Nacht in einer Plexiglasbox bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurde bei Bedarf 1 μ l anti-c-Myc-Antikörper (Roche) für einen möglichen *Supershift* hinzugegeben und 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die EMSA-Ansätze mit jeweils 4 μ l EMSA-Ladepuffer versetzt und auf einem nativen 7,5 %igen Polyacrylamidgel bei 180 - 220V aufgetrennt. Das Gel wurde für eine 1 h auf Whatmanpapier und mit Frischhaltefolie überdeckt bei 80 °C auf einem Vakuumtrockner getrocknet und im Anschluss für 16 - 48 h gegen eine Imaging Platte (BAS-MP 2040S, 20x40cm, Fuji Photofilm CO., Ltd) exponiert. Die abschließende Visualisierung und Auswertung der Banden erfolgte mit dem Phosphorimager CR35B (Dürr Medical) und dem Programm AIDA.

3.2.5.3 Luciferase-Reportergen-Analysen

Die Luciferase-Reportergen-Analysen zur Charakterisierung von Promotoren und Untersuchung des Einflusses verschiedener Proteine auf die Promotoraktivität wurden mit dem Dual-Luciferase® Reporter Assay System von Promega durchgeführt. Der Begriff „Dual“ bezeichnet den Vorgang, dass sukzessiv zwei individuelle Reporter-Enzyme in derselben Probe gemessen werden und damit eine Normalisierung der gemessenen *Firefly*-Luciferase möglich ist. Dieses System nutzt die Tatsache, dass *Firefly*- und *Renilla*-Luciferasen aufgrund ihrer unterschiedlichen evolutionären Herkunft unterschiedliche Substrate spalten, sodass eine selektive Unterscheidung ihrer Biolumineszenz-Reaktionen möglich ist. Während die *Firefly* Luciferase in Anwesenheit von ATP, Mg²⁺ und O₂ das Substrat Luciferin in Oxoluciferin enzymatisch umwandelt, setzt die *Renilla* Luciferase in Anwesenheit von O₂ das Substrat Coelenterazin in Coelenteramid enzymatisch um. Alle Promotor-Konstrukte

wurden 5' zum Luciferase-Reporter-Gen des pGL4.10[*luc2*] Expressionplasmids inseriert. Das *Renilla hRluc* Luciferase-Gen (*Renilla Reniformis*) im pGL4.74 Expressionsplasmid wurde standardmäßig mit dem pGL4.10[*luc2*]-Konstrukten und den zu analysierenden Konstrukten in pcDNA Myc/His kotransfiziert und diente der Normalisierung der Firefly Luciferase-Werte.

Für Luciferase-Reporter-Gen-Analysen wurden die Zellen mit 20 000 Zellen/Well ausgesät und am nächsten Tag wie in Abschnitt 3.2.1.4 beschrieben transfiziert. 24 h nach Transfektion wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen und nach Herstellerangaben behandelt. Die Lysate der transfizierten Zellen wurden in weiße 96 Well-Mikroplatten übertragen und die Luciferase-Aktivitäten mit Hilfe des Luminometers LB 942 TriStar² (Berthold Technologies) gemessen. Die Auswertung erfolgte anschließend mit dem Programm Excel (Microsoft).

3.2.6 Untersuchung von Protein-Protein-Interaktionen

3.2.6.1 GST-Pulldown-Analysen

Zum Nachweis von Protein-Protein-Interaktionen wurden in dieser Arbeit GST-Pulldown-Analysen durchgeführt. Bei dieser *in vitro* Methode wird ein GST-(Glutathion-S-Transferase-) Fusionsprotein (Abschnitt 3.2.4.5) an eine mit Glutathion überzogene Matrix (Glutathion-Sepharose 4B, GE Healthcare) immobilisiert und die Bindung an mögliche Interaktionspartner in Form *in vitro* translatierter, [³⁵S]-markierter Proteine nachgewiesen.

Hierfür wurden 5 µg GST-Fusionsprotein bzw. GST-Protein als Negativkontrolle wie in Abschnitt 3.1.5.14 ausführlich beschrieben an die Glutathion-Sepharose über Nacht bei 4 °C auf einem Überkopf-Schüttler immobilisiert. Zur Absättigung von unspezifischen Bindestellen wurden insgesamt 1 mg BSA in PBS (50 µl einer 20 mg/ml BSA-PBS-Lösung) zum Ansatz hinzugegeben. Nach dieser Inkubation wurden die Ansätze einmal bei 3600 RPM und 4 °C für 2 min zentrifugiert und der Überstand verworfen. Anschließend wurde die mit dem GST-Fusionsprotein bzw. GST-Protein immobilisierte Glutathion-Sepharose in 200 µl NETN (Abschnitt 3.1.5.15) aufgenommen und 5 µl des zu untersuchenden *in vitro* translatierten und [³⁵S]-markierten Proteins zum Ansatz hinzugegeben. Nach einer weiteren Inkubation über Nacht bei 4 °C auf einem Überkopfschüttler wurden die Ansätze sechsmal mit stringenter Waschpuffer (Abschnitt 3.1.5.15) vorsichtig gewaschen. Dabei wurde zwischen den Waschschritten mit 3600 RPM und 4 °C für 2 min zentrifugiert. Die Ansätze wurden mit dem letzten Waschschriff in ein frisches Sure-Lock-Reaktionsgefäß überführt, in 30 µl SDS-Probenpuffer aufgenommen und 5 min bei 95 °C denaturiert. Es folgte eine letzte Zentrifugation, woraufhin 15 µl des Überstands auf ein 10 - 16 %iges SDS-PAGE-Gel aufgetragen und bei 120 Volt 15 - 45 min aufgetrennt wurden. Standardmäßig wurde jeweils

1 µl der *in vitro* translatierten, [³⁵S]-markierten Proteine für eine Erleichterung der Auswertung mitgeführt. Im Anschluss wurde das SDS-PAGE-Gel zum Nachweis des GST-Fusionsproteins bzw. GST-Proteins mit Coomassie gefärbt, dokumentiert und für 1 h auf einem Stück Whatmanpapier und mit Frischhaltefolie überdeckt auf einem Vakuumtrockner bei 80 °C getrocknet. Danach erfolgte die Exposition gegen eine Imaging Platte (BAS-MP 2040S, 20x40cm, Fuji Photofilm CO., Ltd) für 16 - 48 h. Abschließend wurde die Imaging Platte mit Hilfe des Phosphorimager CR35B (Dürr Medical) eingescannt und mit der Software AIDA ausgewertet.

3.2.6.2 GFP-Traps®

Zur Identifizierung unbekannter Interaktionspartner des THAP1-Proteins wurden *GFP-Traps*® (83) mit THAP1-GFP (grün fluoreszierendes Protein)-Fusionsprotein aus transient bzw. stabil-transfizierten SH-SY5Y-Zellen durchgeführt. Diese Methode basiert auf rekombinant hergestellten Bindeproteinen, welche von den Antikörpern aus dem Lama (Familie der *Camelidae*) abgeleitet sind. Diese Antikörper bestehen ausschließlich aus einer schweren Kette und erkennen und binden das entsprechende Antigen mit einer sehr hohen Spezifität. Im Rahmen dieser Arbeit wurde Agarose von Chromotek verwendet, welche mit dem oben beschriebenen GFP-bindenden Protein überzogen ist. So wurde das GFP-THAP1-Fusionsprotein spezifisch gebunden, angereichert und aufgereinigt. Dabei wurden mögliche Interaktionspartner kopräzipitiert, durch eine 2D-Gelelektrophorese (Abschnitt 3.2.4.9) aufgetrennt und mittels Massenspektrometrie (84) identifiziert.

Zunächst wurde das Zellpellet von einer 144 mm-Zellkulturschale in 200 µl RIPA-PIC-Puffer (250:1) resuspendiert, 30 min auf Eis lysiert und anschließend bei 13 000 RPM und 4 °C für 10 min zentrifugiert. Standardmäßig wurde ein Ansatz mit GFP-Protein als Negativkontrolle mitgeführt. Der Überstand wurde anschließend in ein vorgekühltes Reaktionsgefäß überführt und mit gekühltem *GFP-Trap*-Equilibrierungspuffer auf 500 µl aufgefüllt. Je 25 µl *GFP-Trap*-Agarose wurde nach Herstellerangaben äquibriert und mit dem Überstand von der Zellyse für 2 h bei 4 °C auf einem Überkopfschüttler inkubiert. Die anschließende Zentrifugation erfolgte für 2 min bei 4500 RPM und 4 °C. Die *GFP-Trap*-Ansätze wurden zweimal mit vorgekühltem *GFP-Trap*-Waschpuffer vorsichtig gewaschen, abschließend in 40 µl 2D-Ladepuffer aufgenommen und 30 min bei 25 °C und 300 RPM inkubiert. Durch dieses Verfahren wurden die Proteine von der *GFP-Trap*-Agarose eluiert und denaturiert, sodass man die Proteine im Überstand nach einem letzten Zentrifugationsschritt in eine frisches Reaktionsgefäß überführen konnte. Bis zur anschließenden Analyse mittels 2D-Gelelektrophorese, welche in der Klinik für Allgemeine Chirurgie, Arbeitsgruppe Prof. Dr. Dr. Jens Habermann, durchgeführt wurde, wurden die Proteinproben bei -80 °C gelagert.

3.2.6.3 Hefe-Zwei-Hybrid-Analysen

Für die Untersuchung von Protein-Protein-Interaktionen im Hefesystem wurde die Hefe-Zwei-Hybrid-Methode (85,86) verwendet.

Diese Methode basiert auf dem Köder-Beute-Prinzip (*bait-prey*), bei dem die zu untersuchenden Proteine als Köder-(*bait*)-Protein mit einer Gal4-Bindedomäne bzw. als Beute-(*prey*)-Protein mit einer Gal4-Aktivierungsdomäne vorliegen. Bei einer Interaktion der Proteine mit den entsprechenden Fusionsproteinen, bindet die Gal4-Aktivierungsdomäne an die Gal4-Domäne. Es entsteht somit ein aktiver Transkriptionsfaktor, der an Gal4-*upstream activating sequences* (UAS) und TATA-Boxen bindet und damit die Expression von insgesamt vier Reportergenen (*ADE2*, *HIS3*, *lacZ* und *MEL1*) anschaltet. Diese vier Reportergene sind im Genom des Hefestammes *AH109*, welcher auxotroph für Adenin, Histidin, Tryptophan und Leucin ist (Abschnitt 3.1.8.1), inseriert. Dies bedeutet, dass die Hefen nur bei erfolgreicher Kotransformation der Plasmide (*Insert1*-pGADT7 und *Insert2*-pGBKT7) in der Lage sind auf -2 SD-Platten (-Leucin und -Tryptophan) zu wachsen und ausschließlich bei stattfindender Interaktion der beiden zu untersuchenden Proteine auf -4 SD-Platten (-Leucin, -Tryptophan, -Adenin und -Histidin) wachsen können.

Die Transformation der Hefen erfolgte wie in Abschnitt 3.2.2.5 beschrieben. Nach einer Inkubation von circa 3 - 5 Tagen bei 30 °C wurden die Hefekolonien auf -2 SD- und -4 SD-Agarplatten, welche in acht gleichmäßige Teilstücke aufgeteilt wurden, ausgestrichen. Darauf folgte eine weitere Inkubation von 7 - 14 Tagen bis man eindeutig das Wachsen bzw. Nicht-Wachsen der Hefen auf den -4 SD-Agarplatten zuordnen konnte. Gegebenenfalls wurden dann β -Galactosidase-Analysen (Abschnitt 3.2.6.4) durchgeführt.

3.2.6.4 β -Galactosidase-Quantifizierung

Zur quantitativen Untersuchung der Interaktion von Proteinen wurde der Hefe-Zwei-Hybrid-Methode eine β -Galactosidase-Analyse angeschlossen. Das Prinzip dieser quantitativen Messung basiert auf dem Umsatz des Substrats *o*-Nitrophenyl- β -D-galactopyranosid (ONPG) zu *o*-Nitrophenyl und D-Galaktose durch das Enzym β -Galactosidase und der Messung der Intensität des Farbumschlags während dieses hydrolytischen Vorgangs. Die β -Galactosidase wird durch das *lacZ*-Gen kodiert, welches ebenfalls im Genom des *AH109*-Hefestamms inseriert ist und im Falle einer Interaktion zwischen den zu untersuchenden Proteinen exprimiert wird. Dabei ist die Stärke der Expression des β -Galactosidase-Gens direkt abhängig von der Stärke der Interaktion der zu untersuchenden Proteine. Damit korreliert die Intensität des Farbumschlags von farblos zu gelb direkt mit der Interaktionsstärke der Proteine.

Zu Beginn dieses Versuchs wurden Vorkulturen mit je 3 ml -2 SD-Flüssigmedium mit einem Hefeklon des entsprechenden Ansatzes inokuliert und über Nacht bei 30 °C und 220 RPM inkubiert. Die Vorkulturen wurden leicht gevortext und jeweils 1 ml einer Vorkultur in 4 ml YPD-Medium überführt. Anschließend folgte eine Inkubation für 3 - 5 h bei 30 °C und 220 RPM bis die Hefekulturen die Log-Phase mit einer OD_{600} von 0,5 - 0,8 erreichten. Die OD_{600} aller Hefekulturen wurde gemessen und für die abschließende Auswertung notiert. Im Anschluss wurden jeweils 1,5 ml der Hefekultur in ein Reaktionsgefäß überführt und für 5 min bei 14 000 RPM zentrifugiert. Ein weiteres Aliquot von derselben Hefekultur wurde entsprechend behandelt und das Hefepellet bis zur Untersuchung der Expression der Fusionsproteine mittels Westernblot (Abschnitt 3.2.4.8) bei -80 °C gelagert. Das Hefepellet, welches nicht eingefroren wurde, wurde in 1,5 ml Z-Puffer ohne β -Mercaptoethanol (Abschnitt 3.1.5.6) resuspendiert und ein weiteres Mal für 30 s bei 14 000 RPM zentrifugiert. Es folgte die Resuspension des Hefepellets in 300 μ l Z-Puffer ohne β -Mercaptoethanol und das Überführen von jeweils 100 μ l in dreifacher Ausführung in frische Reaktionsgefäße. Die Hefezellen wurden dann mit Hilfe von Flüssigstickstoff (Abschnitt 3.2.4.2) lysiert und mit 700 μ l Z-Puffer mit β -Mercaptoethanol und 160 μ l ONPG-Lösung versetzt. Hierbei wurde ein Ansatz nur mit Z-Puffer als Nullwert (*blank*) mitgeführt. Es folgte eine Inkubation bei 30 °C für 30 min bis 24 h. Bei einem Farbumschlag wurde die Reaktion mit 400 μ l der Stopp-Lösung (Abschnitt 3.1.5.6) abgestoppt und die Ansätze für 10 min bei 14 000 RPM zentrifugiert. Je 1 ml der Überstände wurde in Halbmikroküvetten überführt und die optische Dichte bei einer Wellenlänge von 420 nm (OD_{420}) gemessen.

Für die weitere Auswertung wurde folgende Definition verwendet: 1 Unit β -Galactosidase entspricht der Menge an Enzym, die 1 μ mol ONPG-Substrat in 1 min in o-Nitrophenyl und D-Galaktose umsetzt (87). Als Formel ausgedrückt sieht diese Definition wie folgt aus:

$$\beta\text{-Galactosidase Units} = \frac{1000 \times OD_{420}}{t \times V \times OD_{600}}$$

Dabei steht die Variable t für die Inkubationszeit (in Minuten) bis zum Abstoppen der Farbreaktion. Das Volumen V setzt sich aus 100 μ l Hefesuspension in Z-Puffer für jeden Reaktionsansatz und dem Konzentrationsfaktor, welcher in diesem Fall 5 beträgt, zusammen ($V = 0,1 \text{ ml} \times \text{Konzentrationsfaktor}$). Der Konzentrationsfaktor ist der Quotient aus den anfänglichen 1,5 ml Hefesuspension, die pelletiert und in 0,3 ml Z-Puffer aufgenommen wurden ($1,5 \text{ ml} / 0,3 \text{ ml} = 5$). Diese Formel beinhaltet die optische Dichte der Hefezellen in LB-Medium, die bei einer Wellenlänge von 600 nm (OD_{600}) gemessen wurde, und die optische Dichte der abschließenden Farbreaktion, die bei einer Wellenlänge von 420 nm (OD_{420}) gemessen wurde. Die Auswertung einer β -Galactosidase-Quantifizierung erfolgte mit Hilfe des Programms Excel (Microsoft).

4 Ergebnisse

4.1 Charakterisierung der Transkriptionsfaktor-Aktivität des THAP1-Proteins

4.1.1 Identifizierung des *TOR1A*-Gens als THAP1-Zielgen

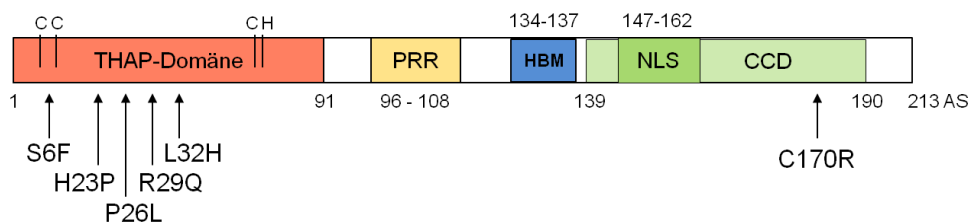
Dem Transkriptionsfaktor THAP1 wurden bereits regulatorische Eigenschaften bezüglich der Expression folgender Gene nachgewiesen: *RRM1* (*ribonucleoside-diphosphate reductase large subunit 1*), *MAD2* (*mitotic arrest deficient 2*), *BIRC5* (*survivin*), *HMMR* (*hyaluronan-mediated motility receptor*), *RRM2* (*ribonucleoside-diphosphate reductase large subunit 2*), *CDC2* (*cell division cycle 2*), *CyclinB1* und *DLG7* (*disks larke homolog 7*) (33).

Aufgrund der phänotypischen Ähnlichkeit der Dystonie 6 (DYT6) und einer weiteren primären Dystonie, der Dystonie 1 (DYT1), wurde das *TOR1A*-Gen als weiteres mögliches THAP1-Zielgen untersucht. Hierzu lieferten Vorarbeiten von Dr. cand. med. Alma Osmanovic erste grundlegende Daten (1). Die Promotor-Region des *TOR1A*-Gens wurde zunächst in Luciferase-Reporter-Gen-Analysen charakterisiert und der *TOR1A*-Kernpromotor somit auf ein 221 Basenpaar-umfassendes Fragment (-830 / +147 relativ zum Translationsstartpunkt) eingegrenzt. In CHIP-Analysen mit dem Chromatin aus THAP1-FLAG bzw. FLAG-leer transfizierten SH-SY5Y-Zellen wurde eine spezifische Bindung des THAP1-Proteins an den *TOR1A*-Kernpromotor nachgewiesen. Weitere Luciferase-Reporter-Gen-Analysen zeigten eine spezifische Repression der Aktivität des *TOR1A*-Kernpromotors durch das THAP1-Protein (1).

Nachdem gezeigt werden konnte, dass THAP1 spezifisch an den *TOR1A*-Kernpromotors bindet und dessen Aktivität reprimiert, erfolgten in der hier vorliegenden Arbeit fortführende Analysen zur Untersuchung des Einflusses DYT6-verursachender Mutationen auf die THAP1-vermittelte Repression des *TOR1A*-Gens. Dafür wurden zunächst THAP1-Myc-Konstrukte mit den fünf Missense-Mutationen p.S6F (88), p.H23P, p.P26L (89), p.R29Q (90) und die in Patienten als homozygot identifizierte Mutation p.L32H (2) mittels Mutagenese-PCR generiert. Alle Missense-Mutationen sind innerhalb der DNA-bindenden THAP-Domäne lokalisiert. Zusätzlich wurde die im C-terminalen Bereich des THAP1-Proteins liegende Missense-Mutation p.C170R (91) in die Analysen aufgenommen. Die Analyse der untersuchten Missense-Mutationen sind in der schematischen Darstellung des THAP1-Proteins in Abbildung 4.1A dargestellt. Es folgten Luciferase-Reporter-Gen-Analysen, in denen der *TOR1A*-Kernpromotor mit dem Wildtyp- bzw. den mutierten THAP1-Myc-Konstrukten kotransfiziert und nach 24 h die relative Luciferase-Aktivität gemessen wurde. Die in Abbildung 4.1B dargestellte THAP1-Aktivität bezieht sich auf die Fähigkeit des THAP1-Proteins die *TOR1A*-Kernpromotoraktivität zu reprimieren. D.h. die 100 % THAP1-

Aktivität (weißer Balken) repräsentiert die vom Wildtyp-THAP1-Protein vermittelte Hemmung der *TOR1A*-Kernpromotoraktivität um circa 60 % (1). In Abbildung 4.1 ist zu erkennen, dass alle Missense-Mutationen in der DNA-bindenden THAP-Domäne zu einer signifikanten Abnahme der THAP1-Aktivität führen. Der stärkste Effekt wurde dabei für die Missense-Mutationen p.H23P und p.P26L nachgewiesen. Diese beiden Mutationen führen zu einer Abnahme der THAP1-Aktivität um 90 – 95 % verglichen zum Wildtyp-Protein. Die anderen drei Mutationen in der THAP-Domäne führten zu einer Abnahme der THAP1-Aktivität um circa 30 - 65 %. Im Gegensatz dazu, weist die C-terminale Missense-Mutation p.C170R eine zum Wildtyp-THAP1-Protein vergleichbare Aktivität auf (1,2).

A



B

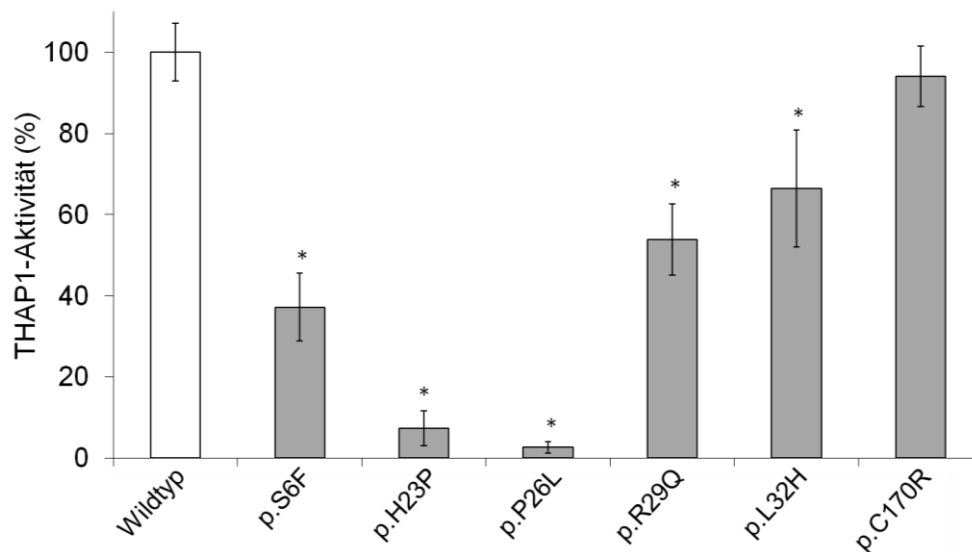


Abbildung 4.1: DYT6-verursachende Mutationen in der THAP-Domäne vermindern die THAP1-Aktivität.

(A) Zur Charakterisierung des Einflusses DYT6-verursachender Missense-Mutationen auf die THAP1-Aktivität wurden Luciferase-Reportergen-Analysen mit fünf Missense-Mutationen in der DNA-bindenden THAP-Domäne und einer Missense-Mutation im C-Terminus des Proteins durchgeführt. PRR: Prolin-reiche Region, HBM: HCF-1 Bindemotiv, NLS: *nuclear localization signal*, CCD: *Coiled-coil*-Domäne, AS: Aminosäure. (B) Die Missense-Mutationen in der THAP-Domäne führen alle zu einer signifikanten Abnahme der THAP1-Aktivität, welche bei der p.H23P und p.P26L mit 90 – 95 % im Vergleich zum Wildtyp am stärksten ausgeprägt ist. Für die Mutation p.C170R, welche eine Aminosäuren-Substitution außerhalb der DNA-bindenden THAP-Domäne bewirkt, konnte kein Einfluss auf die THAP1-vermittelte Repression gezeigt werden. Die hier dargestellten Ergebnisse bilden die Zusammenfassung aus mindestens drei unabhängigen Versuchen, die jeweils in Triplikaten analysiert wurden (n = 3).

Nachdem mittels *in vitro* Reporter-gen-Analysen ein funktioneller Effekt verschiedener DYT6-verursachender Mutationen auf die THAP1-vermittelte Regulation der *TOR1A*-Expression nachgewiesen wurde, ergab sich die Frage, welchen Effekt diese Mutationen auf die *TOR1A*-Expression *in vivo*, also in Zellen entsprechender Mutationsträger, haben. Hierfür wurden im Rahmen der Doktorarbeit von Dr. cand. med. Nils Uflacker Expressionsanalysen mittels quantitativer PCR mit der RNA aus primären Fibroblasten von zwei DYT6-Mutationsträgern und drei gesunden Individuen im Institut für Neurogenetik durchgeführt (1). Diese Expressionsanalysen zeigten keine signifikanten Unterschiede der *TOR1A*-Expressionslevel in den primären Fibroblasten mit DYT6-Mutationen im Vergleich zu der Expression in den Wildtyp-Fibroblasten. Aufgrund dieser unerwarteten Ergebnisse der *TOR1A*-Expressionsanalysen *in vivo*, wurde anschließend die *THAP1*-Expression in den Fibroblasten-Kulturen analysiert. In diesem Fall wurde ein Trend zu einer erhöhten *THAP1*-Expression in den Fibroblasten mit DYT6-Mutationen im Vergleich zu den Wildtyp-Fibroblasten gemessen (1).

4.1.2 THAP1 reguliert seine eigene Expression *in vitro* und *in vivo*

Die unerwarteten Ergebnisse der Expressionsanalysen in Fibroblasten von *THAP1*-Mutationsträgern mit einer unveränderten *TOR1A*- jedoch erhöhten *THAP1*-Expression führten dazu, dass die regulatorische Aktivität des *THAP1*-Proteins auf seine eigene Genexpression in der hier vorliegenden Arbeit untersucht wurde.

4.1.2.1 Charakterisierung des *THAP1*-Promotors

Zur Identifizierung und Charakterisierung des *THAP1*-Promotors wurden *in-silico* Vorhersagen mit den Internet-Anwendungen *Promoter2.0*, *CorePromoter* und *Promoter 2.0 Prediction Server* durchgeführt. Dadurch konnte ein DNA-Bereich von 1162 Basenpaaren, welcher bis in das Exon 1 hineinragt, als Promotor identifiziert werden. Diese Vorhersagen stimmten mit den Informationen des *UCSC Genome Browser* überein. In Abbildung 4.2 ist zu erkennen, dass in der 5'-Region bis in das Exon 1 des *THAP1*-Gens (Genlokus: 42 697 058 – 42 699 277 auf Chromosom 8) eine DNase I-hypersensitive Region, Transkriptionsfaktorbindestellen und eine Anreicherung der Histonmodifikation H3K27Ac vorhanden ist. Diese Eigenschaften bzw. Histonveränderungen deuten auf einen aktiven Promotor und andere aktive regulative Elemente hin (92). Darüber hinaus fasst diese Darstellung die Ergebnisse des ENCODE (*The Encyclopedia of DNA Elements*) Projekt Konsortiums (59) zusammen. Für die Charakterisierung des Chromatinstatus wurden epigenetische Veränderungen des Chromatins in neun verschiedenen Zelltypen untersucht

und mit Hilfe eines bioinformatischen Ansatzes spezifischen funktionellen Zuständen zugeordnet (93,94). Dabei entspricht ein roter Balken in der Darstellung des *UCSC Genome Browsers* einem aktiven Promotor. In der *in silico* vorhergesagten Promotorregion des *THAP1*-Promotors ist in allen untersuchten Zelllinien ein aktiver Promotorbereich zu erkennen.

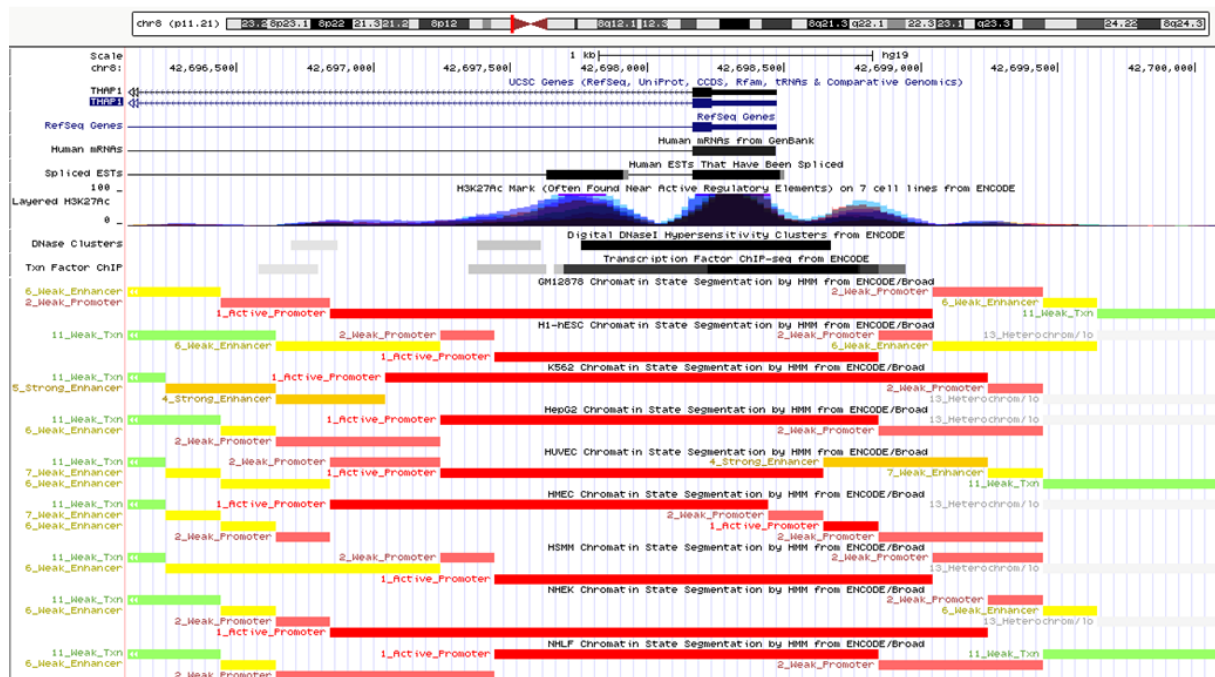


Abbildung 4.2: In-silico Vorhersage des *THAP1*-Promotors.

Im *UCSC Genome Browsers* ist in einem Bereich von circa 300 Basenpaaren, welcher die 5'-Region und das Exon 1 des *THAP1*-Gens umfasst, eine DNase-hypersensitive Region (*DNase Cluster*, schwarzer Balken) und Transkriptionsfaktorbindestellen (*Txn Factor ChIP*, schwarzer Balken) vorhanden, die auf einen aktiven Promotor hindeuten. Zudem weist die Anhäufung der Histonmodifikation H3K27Ac (layered H3K27Ac) auf ein regulatives Element hin. Die roten Balken repräsentieren einen aktiven Promotor, der in neun verschiedenen Zelllinien nachgewiesen wurde.

Zur Bestätigung der Promotorvorhersagen wurde die 1162 Basenpaar-umfassende Region (Fragment 2) und zwei kürzere Fragmente (Fragment 1 und 3) 5' zum Luciferase-Reporter-Gen des pGL4.10[*Luc2*]-Expressionplasmids inseriert. Das Ergebnis der im Anschluss durchgeführten Reporter-Gen-Analysen in SH-SY5Y- und HEK293-Zellen ist in Abbildung 4.3 dargestellt. Das Fragment 1 umfasst eine Länge von 480 Basenpaaren (-471 / +9 relativ zum Translationsstartpunkt) und wies die höchste relative Luciferase-Aktivität auf. Daher wurden alle sich anschließenden funktionellen Analysen mit diesem als *THAP1*-Kernpromotor identifizierten Fragment 1 durchgeführt.

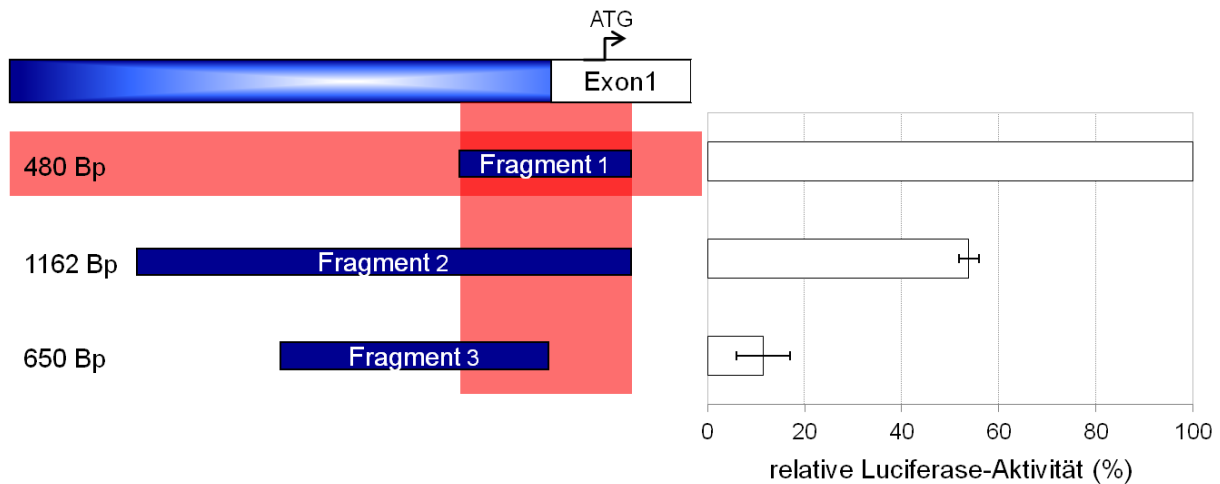


Abbildung 4.3: Charakterisierung des THAP1-Promotors.

Die 1162 Basenpaar-umfassende, *in silico* vorhergesagte Promotorregion (Fragment 2) und zwei trunkierte Fragmente wurden in das pGL4.10[*luc2*]-Expressionsplasmid inseriert. In Luciferase-Reportergen-Analysen in SH-SY5Y- und HEK293-Zellen wurde das Fragment 1 (480 Basenpaare, rot markiert) als Kernpromotor identifiziert. Die relative Luciferase-Aktivität des Fragments 1 wurde auf 100 % gesetzt.

Interessanterweise wurden in der als THAP1-Kernpromotor zugeordneten Genregion fünf THABS-Motive identifiziert (Abbildung 4.4).

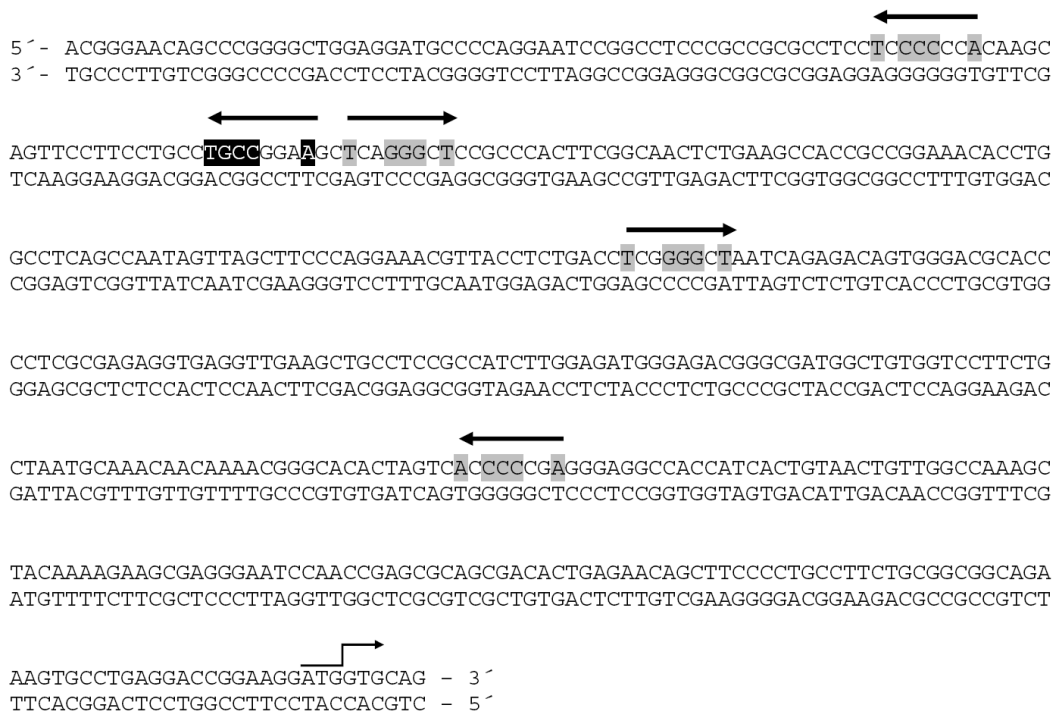


Abbildung 4.4: DNA-Sequenz des THAP1-Kernpromotors mit THABS-Motiven.

In dem THAP1-Kernpromotor befinden sich fünf THAP1-Bindemotive (THABS) mit der Konsensussequenz TxxGGCA (37) (schwarz unterlegt) und TxxGGGx(A/T) (39) (grau unterlegt). Der Translationsstartpunkt ist mit einem abgeknickten Pfeil markiert.

4.1.2.2 THAP1 bindet spezifisch an seinen eigenen Promotor

Im nächsten Schritt wurde mittels ChIP- und EMSA-Analysen untersucht, ob das THAP1-Protein tatsächlich an seinen eigenen Promotor bindet.

Zunächst wurden hierfür ChIP-Analysen mit dem Chromatin aus THAP1-FLAG bzw. FLAG-leer transfizierten SH-SY5Y-Zellen, wie in Abschnitt 3.2.5.1 beschrieben, durchgeführt. Auch hier wurde mit überexprimiertem THAP1-FLAG gearbeitet, weil kein ausreichend spezifischer Antikörper für diese Art von Analysen erhältlich war. Die anschließende PCR wurde mit Primern für den *THAP1*-Kernpromotor (Abbildung 4.5, Spur 1 – 5) durchgeführt. Die spezifische *THAP1*-Bande mit einer Größe von 480 Basenpaaren ist ausschließlich in der ChIP-Probe THAP1-FLAG transfizierter Zellen zu erkennen (Spur 4). Die gleichen Analysen unter Verwendung des Chromatins aus mit leerem FLAG-Plasmid transfizierten Zellen ergaben keine entsprechende Bande (Spur 5). Als zusätzliche Kontrollen wurden PCRs mit spezifischen Primern für zwei weitere irrelevante Promotoren, welche in SH-SY5Y-Zellen exprimiert werden, durchgeführt. Wie in Abbildung 4.5 in Spur 8 - 9 und 12 - 13 zu erkennen, ist auch hier keine Bande auf der zu erwartenden Höhe vorhanden, die jedoch in den Inputkontrollen zu sehen ist.

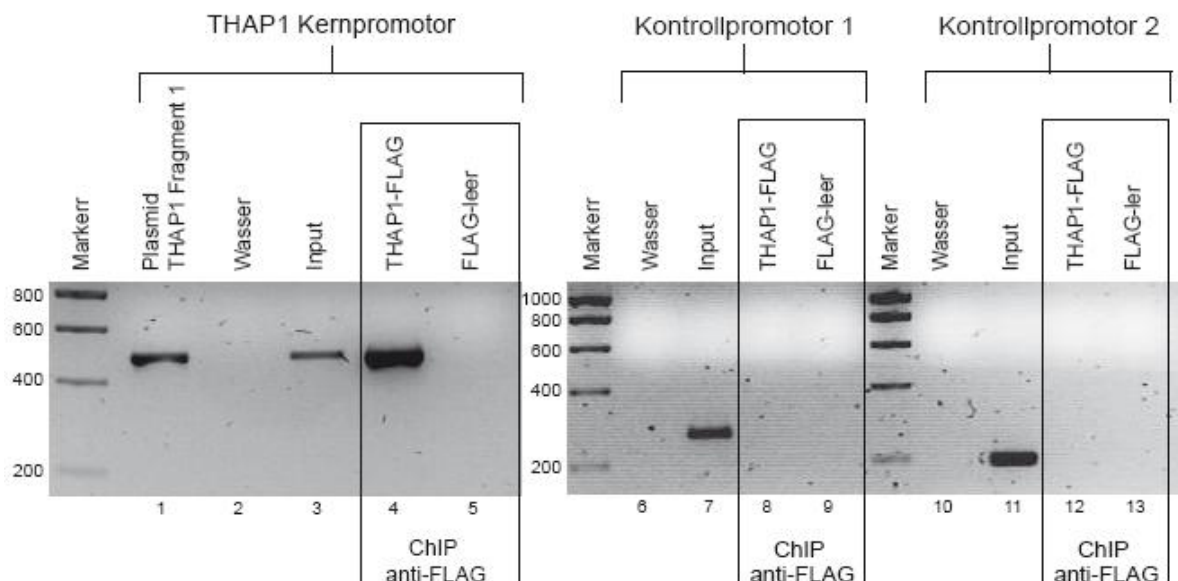


Abbildung 4.5: ChIP-Analysen zur Untersuchung einer Bindung des THAP1-Proteins an seinen eigenen Kernpromotor.

Mittels ChIP-Analyse mit dem Chromatin aus mit THAP1-FLAG bzw. FLAG-leer transfizierten SH-SY5Y-Zellen wurde die Bindung des THAP1-Proteins an seinen eigenen Promotor untersucht. Die anschließende PCR wurde mit spezifischen Primern für den *THAP1*-Kernpromotor (Spur 1 - 5) oder mit Primern für zwei irrelevante Kontrollpromotoren (Spur 6 - 12) durchgeführt. Ein spezifisches PCR-Produkt für den *THAP1*-Kernpromotor mit einer erwarteten Größe von 480 Basenpaaren wurde mit der Plasmidkontrolle (Spur 1), der Input-Kontrolle (Spur 2) und der THAP1-FLAG ChIP-Probe (Spur 4) nachgewiesen, jedoch nicht mit der FLAG-leer ChIP-Probe (Spur 5). Es sind keine Banden für den Kontrollpromotor in den ChIP-Proben zu erkennen (Spur 8 - 9 und 12 - 13), die jedoch in den Input-Kontrollen (Spur 7 und 11) vorhanden sind. Für alle Primerpaare wurden Wasserkontrollen mitgeführt, die keine PCR-Produkte aufweisen (Spur 2, 6 und 10).

EMSA-Analysen konnten die spezifische Bindung des THAP1-Proteins an seinen eigenen Promotor verifizieren. Für diese EMSAs wurde ein 480 Basenpaar-langes Oligonukleotid, welches die THAP1-Kernpromotorregion repräsentiert, radioaktiv markiert und mit *in vitro* hergestelltem Myc-gekoppelten THAP1-Protein (wie in Abschnitt 3.2.5.2 beschrieben) inkubiert. Anschließend wurden die Protein-DNA-Komplexe auf einem nativen 7,5 %-Polyacrylamidgel aufgetrennt, das Gel getrocknet und gegen eine *Imaging*-Platte exponiert. Das Radiogramm in Abbildung 4.6 zeigt die Ausbildung von Protein-DNA-Komplexen bei Inkubation des radioaktiv-markierten *THAP1*-Kernpromoters mit dem THAP1-Myc-Protein. Die Spezifität dieser Bindung wird bestätigt durch einen *Supershift* nach Zugabe eines gegen den Myc-Tag des THAP1-Myc-Proteins gerichteten Antikörpers. Eine weitere Bestätigung der Bindungsspezifität ist ein nahezu vollständiger Verlust des Signals nach Zugabe des nicht-radioaktiv-markierten Oligonukleotids als Kompetitor.

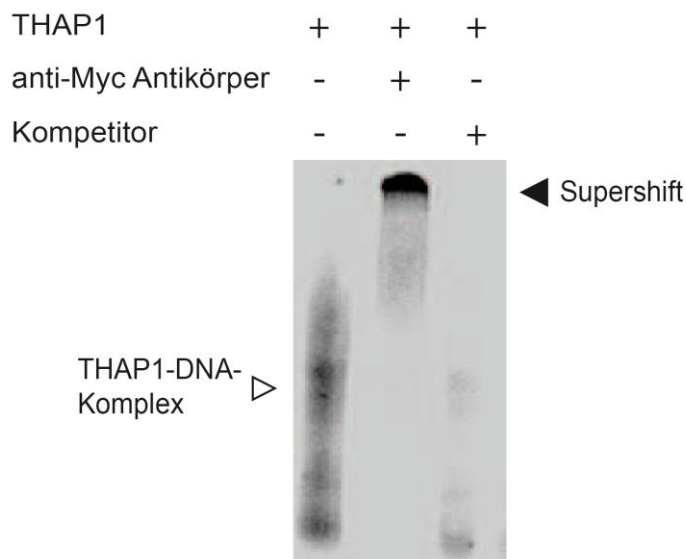


Abbildung 4.6: Untersuchung der Bindung des THAP1-Proteins an seinen eigenen Promotor mittels EMSA.

In EMSAs mit dem radioaktiv-markierten *THAP1*-Kernpromotor und THAP1-Myc-Protein ist die Ausbildung eines THAP1-DNA-Komplexes gut zu erkennen. Der Supershift nach Zugabe des Anti-Myc-Antikörpers und die nahezu verschwundene Bande nach Zugabe des nicht-radioaktiv-markierten *THAP1*-Kernpromotors (Kompetitor) ist eine zusätzliche Kontrolle für die Spezifität dieser Bindung.

4.1.2.3 THAP1 reguliert seinen eigenen Promotor *in vitro*

Die folgenden Luciferase-Reportergen-Analysen wurden unter der Fragestellung durchgeführt, welchen Effekt das Wildtyp-THAP1-Protein auf die Aktivität seines Kernpromotors und welchen Einfluss spezifische DYT6-verursachende Mutationen auf die THAP1-Transkriptionsfaktor-Aktivität haben.

Hierfür wurden HEK293-Zellen mit dem *THAP1*-Fragment 1 im pGL4.10[*luc2*] Expressionsplasmid und unterschiedlichen Mengen an Wildtyp-THAP1 (THAP1-pcDNA 3.1B) kotransfiziert und die relative Luciferase-Aktivität nach 24h gemessen. Abbildung 4.7 zeigt eine Konzentrations-abhängige Repression der *THAP1*-Kernpromotoraktivität durch das THAP1-Protein. Bereits eine THAP1-Plasmidmenge von 100 ng/Well führt zu einer 30 %-Abnahme der THAP1-Kernpromotoraktivität, die bei 800 ng/Well THAP1-Plasmid nur noch bei 50 % ihrer Ausgangsaktivität aufweist.

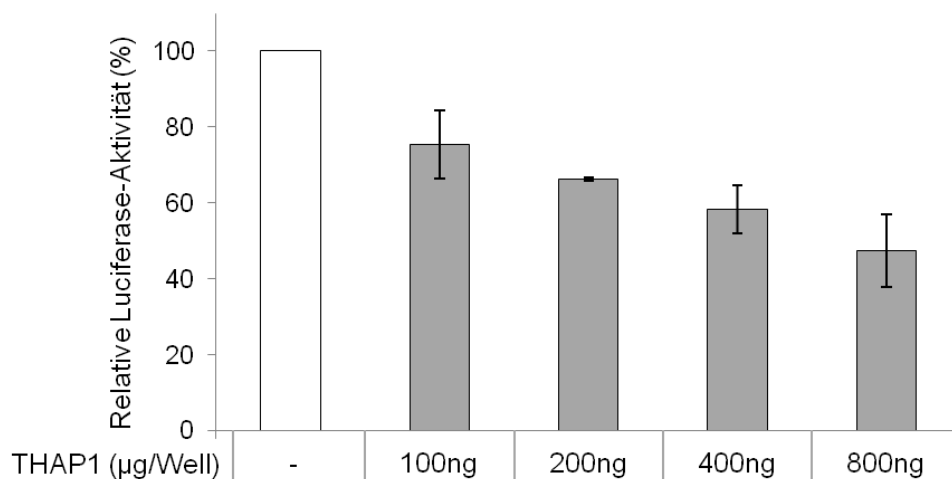
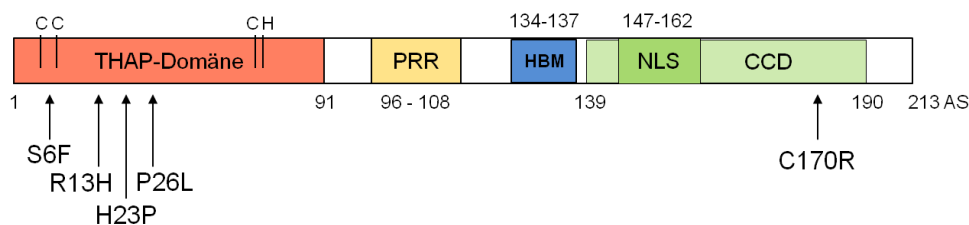


Abbildung 4.7: Der *THAP1*-Promotor wird konzentrationsabhängig durch THAP1 reprimiert.

HEK293-Zellen wurden mit dem *THAP1*-Kernpromotor (200 ng/Well) und verschiedenen Menge an Wildtyp-THAP1 (100 – 800 ng/Well) transient kotransfiziert. Die Aktivität des THAP1-Kernpromotors weist mit ansteigender THAP1-Plasmidmenge eine Abnahme bis zu 50 % auf. Die Aktivität des mit leerem pcDNA 3.1B-Plasmid kotransfizierten *THAP1*-Kernpromotors wurde auf 100 % gesetzt (-).

Im folgenden Schritt wurde der Einfluss der DYT6-verursachenden Missense-Mutationen p.Ser6Phe, p.Arg13His (95), p.His23Pro, p.Pro26Leu und p.Cis170Arg (Abbildung 4.8A) auf die THAP1-vermittelte Repression des *THAP1*-Promotors untersucht. Hierfür wurden HEK293-, HeLa- und SH-SY5Y-Zellen erneut mit unterschiedlichen THAP1-Konstrukten (alle Konstrukte lagen in pcDNA 3.1B vor) transient kotransfiziert und nach 24h die relative Luciferase-Aktivität gemessen. In Abbildung 4.8B ist eine um 40 % verminderte *THAP1*-Kernpromotoraktivität durch das Wildtyp-Protein gut zu erkennen. Dahingegen führten alle Missense-Mutationen, die in der DNA-bindenden THAP-Domäne liegen zu einem Verlust der THAP1-vermittelten Repression. Interessanterweise zeigte die C-terminale Missense-Mutation p.C170R keinen signifikanten Einfluss auf die THAP1-vermittelte Repression.

A



B

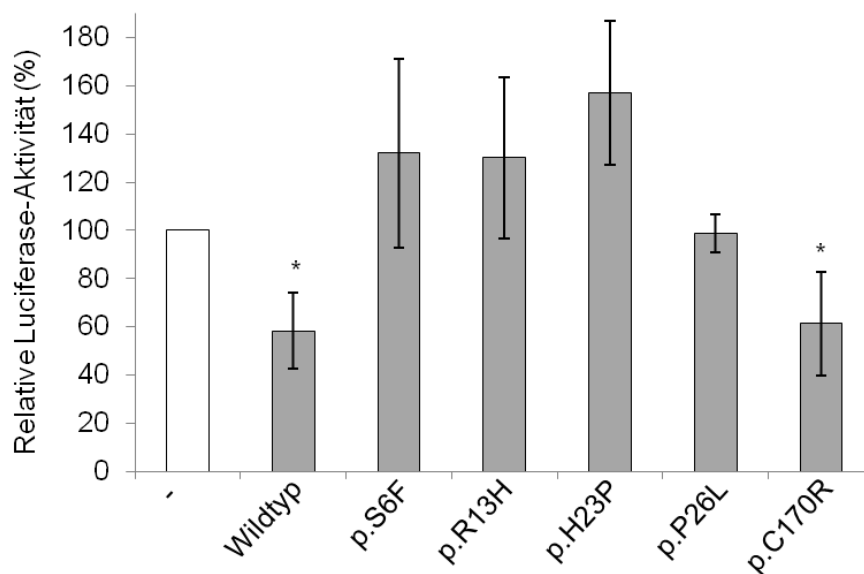


Abbildung 4.8: DYT6-verursachende Mutationen vermindern die THAP1-vermittelte Repression des *THAP1*-Kernpromotors.

(A) In Luciferase-Reportergen-Analysen wurde der Effekt der fünf dargestellten Missense Mutationen auf die THAP1-vermittelte Repression des *THAP1*-Promotors untersucht. PRR: Prolin-reiche Region, HBM: HCF-1 Bindemotiv, NLS: *nuclear localization signal*, CCD: *Coiled-coil*-Domäne, AS: Aminosäure
(B) Alle Missense-Mutationen die in der DNA-bindenden THAP-Domäne lokalisiert sind, führen zu einer vollständigen Aufhebung der THAP1-vermittelten Repression des *THAP1*-Kernpromotors. Die außerhalb der THAP-Domäne liegende Missense-Mutation p.C170R hat keinen Einfluss auf die THAP1-vermittelte Repression. Die Plasmidmengen betragen für den *THAP1*-Kernpromotor 100 ng/Well und für die THAP1-Konstrukte 400 ng/Well. Die Grund-Aktivität des *THAP1*-Kernpromotors wurde auf 100 % gesetzt (-). Die Ergebnisse setzen sich aus mindestens drei unabhängigen Versuchen zusammen.

Die hier aufgeführten Ergebnisse konnten in unterschiedlichen Zelllinien (HeLa- und SH-SY5Y-Zellen) bestätigt werden (Abbildung 4.9A und B).

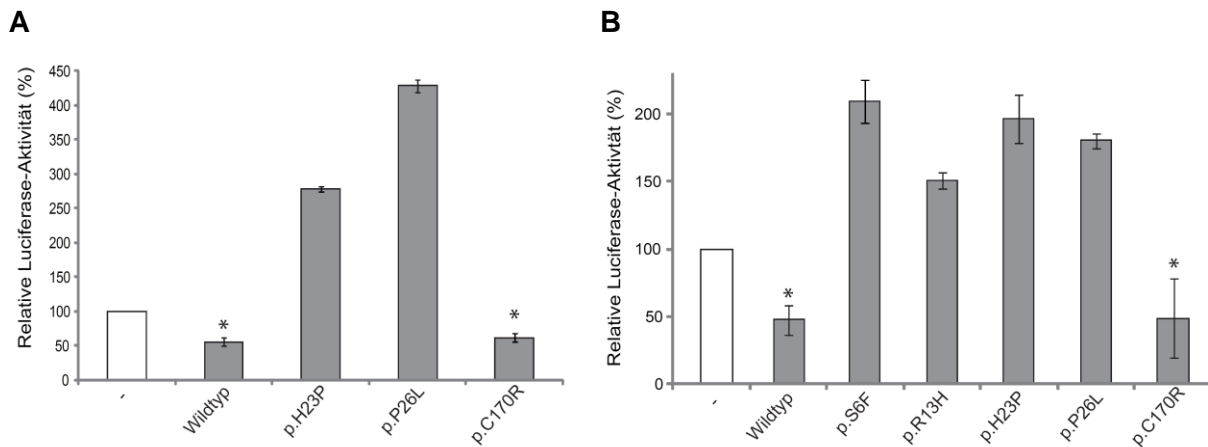


Abbildung 4.9: Untersuchung des Einflusses DYT6-verursachender Mutationen in HeLa- und SH-SY5Y-Zellen.

HeLa- und SH-SY5Y-Zellen wurden mit dem *THAP1*-Kernpromotor (100 ng/Well) und verschiedenen *THAP1*-Konstrukten bzw. leerem pcDNA 3.B-Plasmid (400 ng/Well) transient kotransfiziert. Die Aktivität des mit leerem pcDNA 3.1B-Plasmid kotransfizierten *THAP1*-Kernpromotors wurde auf 100 % gesetzt (-). Die Ergebnisse setzen sich aus mindestens drei unabhängigen Versuchen zusammen. **(A)** Die durch Wildtyp-*THAP1*-vermittelte Repression des *THAP1*-Promotors wurde durch die Missense-Mutationen p.His23Pro und p.Pro26Leu in HeLa-Zellen aufgehoben. Die C-Terminale Mutation p.Cis170Arg weist eine zum Wildtyp-Protein vergleichbare Repression auf. **(B)** In SH-SY5Y-Zellen führt das Wildtyp-*THAP1*-Protein zu einer vergleichbaren Repression der *THAP1*-Kernpromotoraktivität um circa 50 %. Dieser Effekt wurde von allen Missense Mutationen, außer der p.Cis170Arg, aufgehoben.

4.1.2.4 Untersuchung der *THAP1*-Expression in aus iPS-Zellen differenzierten Neuronen mit DYT6-Mutationen

Für die Untersuchung der *THAP1*- und *TOR1A*-Expressionslevels *in vivo* wurden zunächst iPS-Zellen aus Fibroblasten von zwei DYT6-Mutationsträgern mit der Missense-Mutation p.R13H und der Frameshift-Mutation p.Leu159fs*180X und zwei gesunden Individuen generiert. Die Herstellung von iPS-Zellen bedeutet die Reprogrammierung von ausdifferenzierten Zellen, in diesem Fall Fibroblasten, in induzierte pluripotente Stammzellen (iPS-Zellen). Diese iPS-Zellen können anschließend durch eine spezielle Behandlung mit spezifischen Faktoren in Neurone differenziert werden. Diese Methode ermöglicht somit die Untersuchung von pathophysiologischen Vorgängen in spezifischen humanen Zellen bzw. Zelltypen von Mutationsträgern. Die Herstellung der iPS-Zellen und die neuronale Differenzierung wurde von Dr. Philip Seibler (Institut für Neurogenetik) durchgeführt. Alle anschließenden Analysen in den differenzierten Neuronen erfolgten ebenfalls in Kooperation mit dem Institut für Neurogenetik.

Die *THAP1*-Expression wurde in den Wildtyp- und DYT6-Mutationen-tragenden Neuronen mittels quantitativer PCR gemessen und gegen die drei Referenzgene *β-Actin*, *G6PD* und *YWHAZ* normalisiert. Die Abbildung 4.10 zeigt eine Zusammenfassung der Genexpressionsanalysen für die Wildtyp-Neuronen (Neuronen-WT) und die Neuronen mit DYT6-Mutationen (Neuronen-MUT). Wie nach den *in vitro* Analysen erwartet, war in den Neuronen mit DYT6-Mutationen eine 1,5 – 1,75-fach erhöhte *THAP1*-Expression im Vergleich zu den Wildtyp-Neuronen zu beobachten. Die *TOR1A*-Expression war wie schon in den primären Fibroblasten von DYT6-Mutationsträgern unverändert (Erogullari, Seibler *et al.* in Revision).

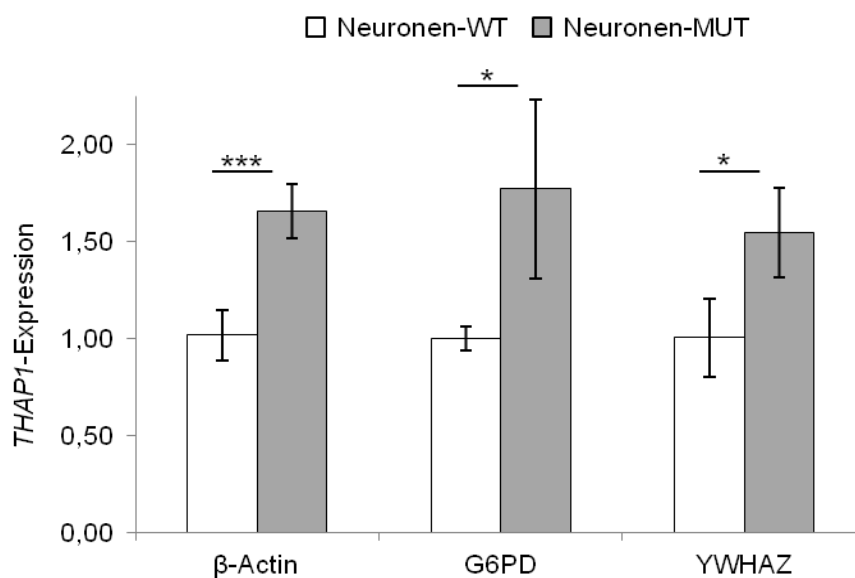


Abbildung 4.10: Untersuchung *THAP1*-Expression in Wildtyp-Neuronen und Neuronen mit DYT6-Mutationen.

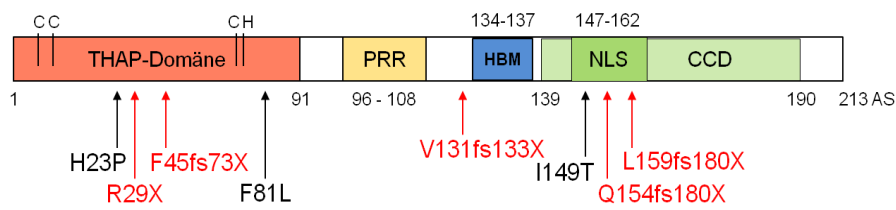
Zur Vereinfachung wurden die Daten der zwei Wildtyp-Neuron-Zelllinien (Neuronen-WT) und der zwei neuronalen Zelllinien mit DYT6-Mutation (Neuronen-MUT) zusammengefasst. Die Expression in den wildtyp Neuronen wurde auf 1 gesetzt. (n = 4; *: p < 0,05; **: p < 0,01; ***: p < 0,001). Die *THAP1*-Expression wurde gegen die drei Referenzgene *β-Actin*, *G6PD* und *YWHAZ* normalisiert. In den Neuronen mit DYT6-Mutationen (Neuronen-MUT) wurde eine signifikant erhöhte *THAP1*-Expression (1,5 – 1,75fach) verglichen zu den wildtyp Neuronen gemessen.

4.1.3 Untersuchung des Einflusses trunkierender Mutationen auf die intrazelluläre Lokalisierung des THAP1-Proteins

Neben zahlreichen Missense-Mutationen, die zu Substitutionen einzelner Aminosäuren, besonders innerhalb der THAP-Domäne führen, sind auch Protein-trunkierende Mutationen, wie Insertionen, Deletionen aber auch Nonsense-Mutationen im *THAP1*-Gen nachgewiesen. Im folgenden Teil dieser Arbeit wurde der Einfluss von fünf ausgewählten trunkierenden Mutationen (p.R29X (96), p.F45fs73X (31), p.V131fs133X (97), p.Q154fs180X (96) und p.L159fs180X (97)) auf die Kernlokalisierung des THAP1-Proteins untersucht. Zusätzlich wurde eine Missense-Mutation (p.I149T (98)) analysiert, welche zu einer Substitution des Isoleucins 149 innerhalb der vorhergesagten Kernlokalisierungssequenz des THAP1-Proteins (¹⁴⁷KRIHQLEQQVEKLRKK¹⁶²) führt. Als zusätzliche Kontrolle wurden zwei weitere Missense-Mutationen (p.H23P, p.F81L) mitgeführt, die verschiedene Aminosäuren innerhalb der THAP-Domäne betreffen. Die Analysen der DYT6-Mutationen p.H23P, p.F81L, p.V131fs133X, p.Q154fs180X und p.L159fs180X erfolgten im Rahmen der Doktorarbeit von Dr. cand. med. Alma Osmanovic. In der hier vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss der DYT6-Mutationen p.I149T, p.R29X und p.F45fs73X auf den THAP1-Kerntransport untersucht. Der Übersichtlichkeit halber werden alle Daten in Abbildung 4.11 zusammengefasst. Diese Analysen wurden in Kooperation mit dem Institut für Pharmakologie durchgeführt (Ansprechpartner: Prof. Dr. Andreas Dendorfer)

Das Wildtyp-THAP1-Konstrukt sowie alle in Abbildung 4.11A aufgeführten Mutationen wurden durch Verkürzung der THAP1-DNA-Sequenz oder durch Mutagenese-PCRs generiert (Abschnitt 3.2.3.2) und in das pEGFP-N3 Expressionsplasmid inseriert. So konnten alle THAP1-Konstrukte mit einem GFP-Tag in humanen OVCAR-3-Zellen für 48h überexprimiert und mit einem konfokalen *Laser Scanning* Mikroskop visualisiert werden. Wie erwartet war das Wildtyp-THAP1-Protein nahezu ausschließlich im Kern lokalisiert (Abbildung 4.11, linke Spalte, ganz oben). Die beiden THAP1-Proteine mit Mutationen innerhalb der THAP-Domäne wiesen eine mit dem Wildtyp-Protein übereinstimmende intrazelluläre Verteilung auf. Interessanterweise führt die Missense-Mutation in der vorhergesagten NLS-Region zu einer veränderten intrazellulären Lokalisation des THAP1-Proteins, welches neben einer Anreicherung innerhalb des Zellkerns nun auch deutlich im Zytoplasma detektierbar war. Ein(e) durch trunkierende Mutationen verursachte(r) Verlust bzw. Verkürzung der NLS-Region führte ebenfalls zu einer erhöhten zytoplasmatischen Lokalisierung entsprechender THAP1-Proteine (Osmanovic, Dendorfer, Erogullari *et al.*, *Mov Disord*, 2011 (3)).

A



B

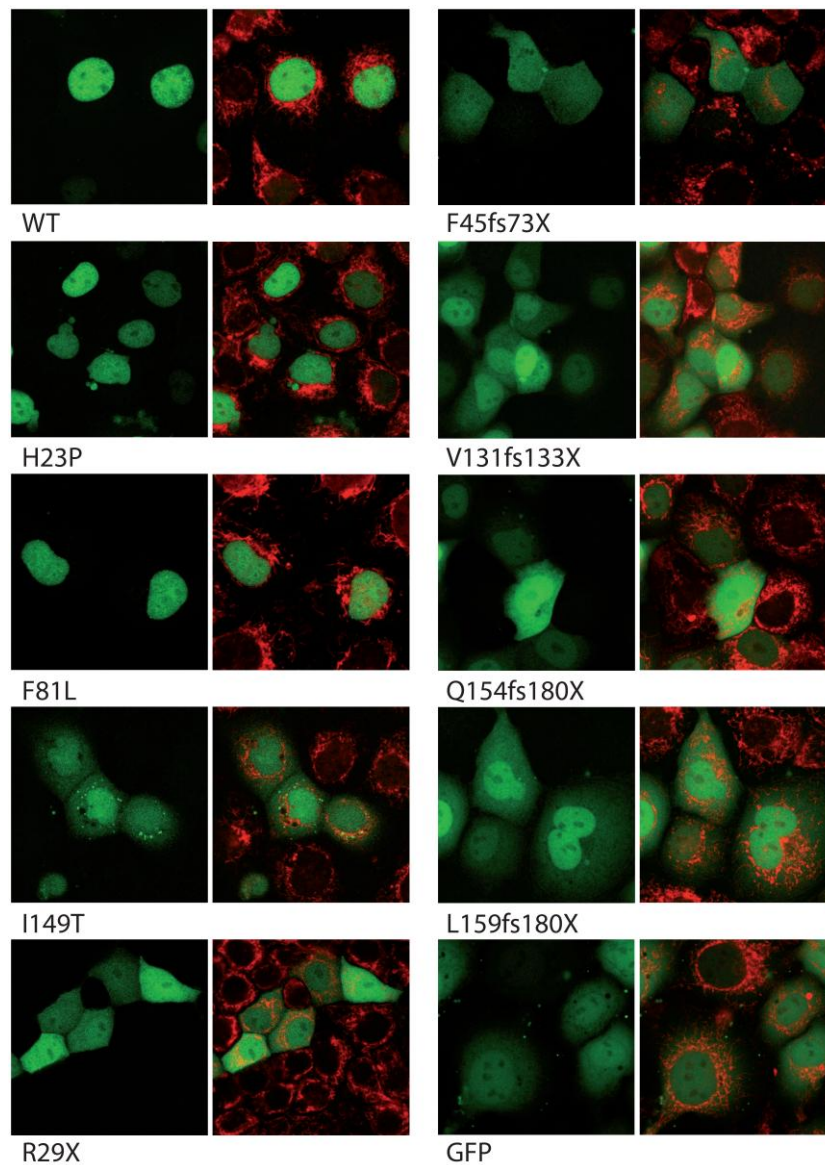


Abbildung 4.11: Untersuchung des Effekts trunkierender THAP1-Mutation auf die Kernlokalisierung.

(A) Schematische Darstellung des THAP1-Proteins und der im Folgenden untersuchten Mutationen. In rot sind die trunkierenden Mutationen und in schwarz die Missense-Mutationen dargestellt. PRR: Prolin-reiche Region, HBM: HCF-1 Bindemotiv, NLS: *nuclear localization signal*, CCD: *Coiled-coil*-Domäne, AS: Aminosäure (B) Die intrazelluläre Lokalisation von GFP-gekoppeltem Wildtyp-THAP1 bzw. THAP1 mit verschiedenen Missense und trunkierende Mutationen wurde in OVCAR-3-Zellen mittels konfokaler *Laser Scanning* Mikroskopie untersucht. Alle trunkierenden Mutationen und die Missense Mutation innerhalb der vorhergesagten NLS-Region führen zu einer Verteilung der Proteine innerhalb der gesamten Zelle. Dahingegen befinden sich Wildtyp-THAP1, sowie die beiden THAP1-Konstrukte mit den Missense Mutationen in der THAP-Domäne ausschließlich im Nukleus der Zellen. Als Kontrolle wurde das GFP-Protein mitgeführt. Das Zytoplasma der Zellen ist rot gefärbt.

Für eine genauere Aussage über die intrazelluläre Verteilung des THAP1-Proteins wurde zusätzlich eine Quantifizierung der im Zytoplasma und Zellkern lokalisierten THAP1-Proteine durchgeführt. Hierfür wurden die Zellkerne durch einen Sukrose-Dichte-Gradienten von der zytosolischen Fraktion getrennt. Anschließend erfolgte eine direkte photometrische Quantifizierung der GFP-gekoppelten Proteine mit einem Spektralfluorometer (Kontron SFM25). In Abbildung 4.12 ist klar zu erkennen, dass alle trunkierten THAP1-Proteine mit einer fehlerhaften bzw. fehlenden NLS-Region einen signifikant kleineren Anteil im Zellkern ausmachen als das Wildtyp-THAP1-GFP-Protein (Nukleärer Anteil wurde auf 1 gesetzt). Der nukleäre Anteil für die p.R29X-Mutation betrug 3 %, für die p.F45fs73X-Mutation 37 %, für die p.V131fs133X-Mutation 23 %, für die p.Q154fs180X-Mutation 40 % und für die p.L159fs180X-Mutation 41 %. Die Missense Mutationen p.H23P und p.F81L wiesen einen zum Wildtyp-THAP1-GFP-Protein vergleichbaren Anteil in den Zellkernen auf (Osmanovic, Dendorfer, Erogullari *et al.*, *Mov Disord*, 2011 (3)).

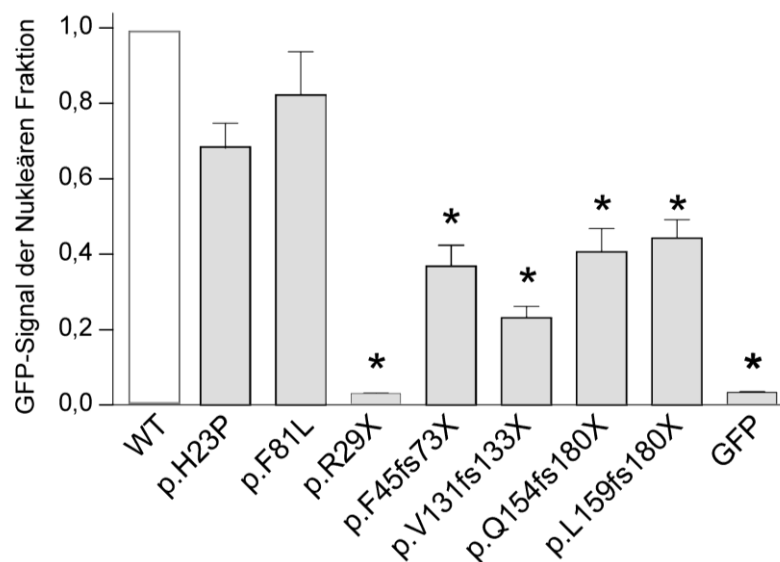


Abbildung 4.12: Quantifizierung der GFP-gekoppelten THAP1-Proteine im Zellkern.

Für die photometrische Quantifizierung wurden die Zellkerne mittels Sukrose-Dichte-Gradienten von der zytosolischen Fraktion getrennt. Im Vergleich zum Wildtyp-THAP1-GFP-Protein (nukleärer Anteil wurde auf 1 gesetzt) weisen alle trunkierenden Mutationen einen signifikant verminderten nukleären Anteil auf. Die Missense Mutationen p.H23P und p.F81L haben einen ähnlichen nukleären Anteil wie das Wildtyp-THAP1-GFP-Protein. (* : $p < 0,05$)

4.2 Untersuchungen zu THAP1-Protein-Protein-Interaktionen

Mit den Ergebnissen zu den Analysen des Effekts von Mutationen, die zu einem verkürzten THAP1-Protein (Abschnitt 4.1.3) führen, konnte zusätzlich zu bereits bekannten Mutationsbedingt veränderten DNA-Bindeeigenschaften von THAP1 (Abschnitt 4.1.1 und Abschnitt 4.1.2.3) eine veränderte intrazelluläre Verteilung als mögliche pathophysiologische Ursache für die Dystonie 6 identifiziert werden. Jedoch sind weitere DYT6-verursachende Mutationen bekannt, für die kein direkter Einfluss auf die DNA-Bindeeigenschaft bzw. die Kernlokalisierung des THAP1-Proteins nachgewiesen werden konnte. Eine mögliche Konsequenz dieser Mutationen könnte die Veränderung von Protein-Protein-Interaktionen sein, die wichtig für die spezifischen THAP1-Funktionen sind.

Neben der DNA-bindenden THAP-Domäne im N-Terminus des THAP1-Proteins und der NLS-Region im C-terminalen Bereich, gibt es noch weitere funktionelle Domänen. Dazu gehört im Besonderen die innerhalb der zwölf Mitglieder aus der THAP-Familie konservierte *Coiled-Coil*-Domäne im C-Terminus des THAP1-Proteins.

4.2.1 Charakterisierung der *Coiled-Coil*-Domäne des THAP1-Proteins

Das *Coiled-coil*-Motiv ist eines der bekanntesten Struktur motive in Proteinen, welches Protein-Protein-Interaktionen vermittelt und somit essentiell für die Regulation der spezifischen Proteinfunktion(en) sein kann (99). Mutationen innerhalb der *Coiled-Coil*-Domäne des THAP1-Proteins können somit zu einer veränderten Fähigkeit der Ausbildung von Protein-Protein-Interaktionen führen. In den folgenden Untersuchungen wurde die *Coiled-Coil*-Domäne des THAP1-Proteins zunächst funktionell charakterisiert. Hierzu wurden die über die *Coiled-Coil*-Domäne vermittelten Protein-Protein-Interaktionen untersucht.

4.2.1.1 Überexpression und Aufreinigung von GST-gekoppeltem THAP1-Protein

Im Rahmen dieser Arbeit wurden GST-*Pulldown*-Analysen mit GST-gekoppeltem THAP1-Protein (GST-THAP1) durchgeführt. Hierfür wurde der *E.coli* BL21-Stamm mit dem Wildtyp-THAP1-pGEX-4T2 Expressionsplasmid transformiert und das GST-THAP1-Fusionsprotein wie in Abschnitt 3.2.4.4 beschrieben überexprimiert. Das theoretische Molekulargewicht des GST-THAP1-Fusionsproteins beträgt circa 50 kDa und setzt sich aus den 25 kDa des THAP1-Proteins und dem 25 kDa-großen GST-Tag zusammen. Im SDS-Polyacrylamidgel in Abbildung 4.13 läuft das GST-gekoppelte THAP1-Protein auf einer Höhe von 55 kDa. Es ist deutlich zu erkennen, dass eine ausgeprägte Proteinbande auf dieser Höhe ausschließlich nach der Induktion mit IPTG (finale Konzentration 0,5 mM) vorhanden ist und mit

voranschreitender Zeit stärker wird. Da eine relative Zunahme der GST-THAP1-Bande bis zu dem Zeitpunkt 3h zu beobachten war, wurde für alle folgenden Experimente eine dreistündige Expressionsphase verwendet.

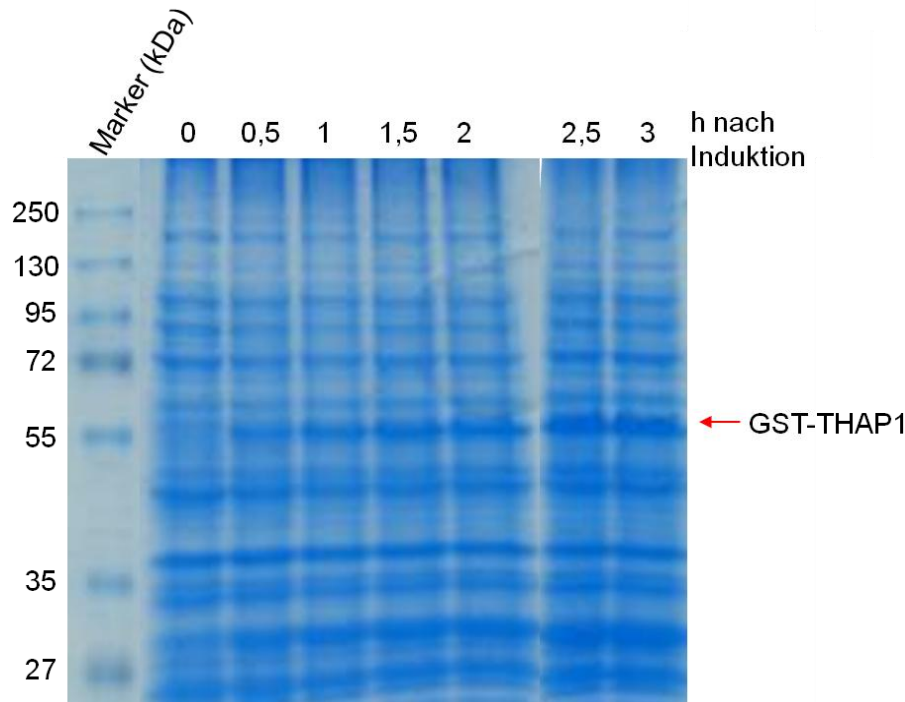


Abbildung 4.13 Überexpression von GST-gekoppeltem THAP1-Protein in *E.coli* BL21.

Zur Ermittlung der optimalen Induktionsdauer wurde vor und alle 30 Minuten nach Induktion ein Aliquot der Bakteriensuspension abgenommen und auf einem 10 % SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt. Das GST-THAP1-Protein migriert auf einer Höhe von 55 kDa (THAP1 25 kDa + GST 25 kDa). Die spezifische Bande wird nach der Induktion mit IPTG (finale Konzentration 0,5 mM) deutlich stärker.

Nach der erfolgreichen Überexpression von GST-THAP1 in *E.coli* BL21 erfolgte die Aufreinigung mittels Affinitätschromatographie über Glutathion-Sepharose (Abschnitt 3.2.6.1). Für Kontrollexperimente wurde auch das GST-Protein unter identischen experimentellen Bedingungen überexprimiert und aufgereinigt. Aliquots der Ausgangsproteinlösungen und die einzelnen Fraktionen der Aufreinigungen wurden standardmäßig auf einem 10 %igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und die Proteine mit kolloidalem Coomassie angefärbt. In Abbildung 4.14 sind exemplarisch zwei SDS-Polyacrylamidgele von einer GST-THAP1- / GST-Aufreinigung dargestellt. Beide Proteine befinden sich nach der Lyse, Sonifizierung und Zentrifugation der Bakterienpellets im Überstand (Input). Die Elutionsfraktionen des GST-THAP1-Proteins weisen zusätzliche niedrigere Banden (unter 55 kDa) auf. Hierbei handelt es sich um kürzere GST-THAP1-Proteinfragmente, die beispielsweise aufgrund vorzeitiger Translations-Stopps oder durch proteolytische Prozesse entstehen.

Die Bandenintensitäten des GST-THAP1-Proteins in den Elutionsfraktionen sind deutlich schwächer als die GST-Proteinbanden. Dies spiegelte sich auch in der Konzentration der

Proteinlösungen wieder. Es ist zudem gut zu erkennen, dass nicht das gesamte Protein unter diesen Elutionsbedingungen von der Glutathion-Sepharose eluiert werden kann. Da die Proteinkonformation wichtig für Protein-Protein-Interaktionen ist wurde von stringenteren Elutionsbedingungen abgesehen, weil diese zu einer Veränderung der Proteinfaltung führen könnte.

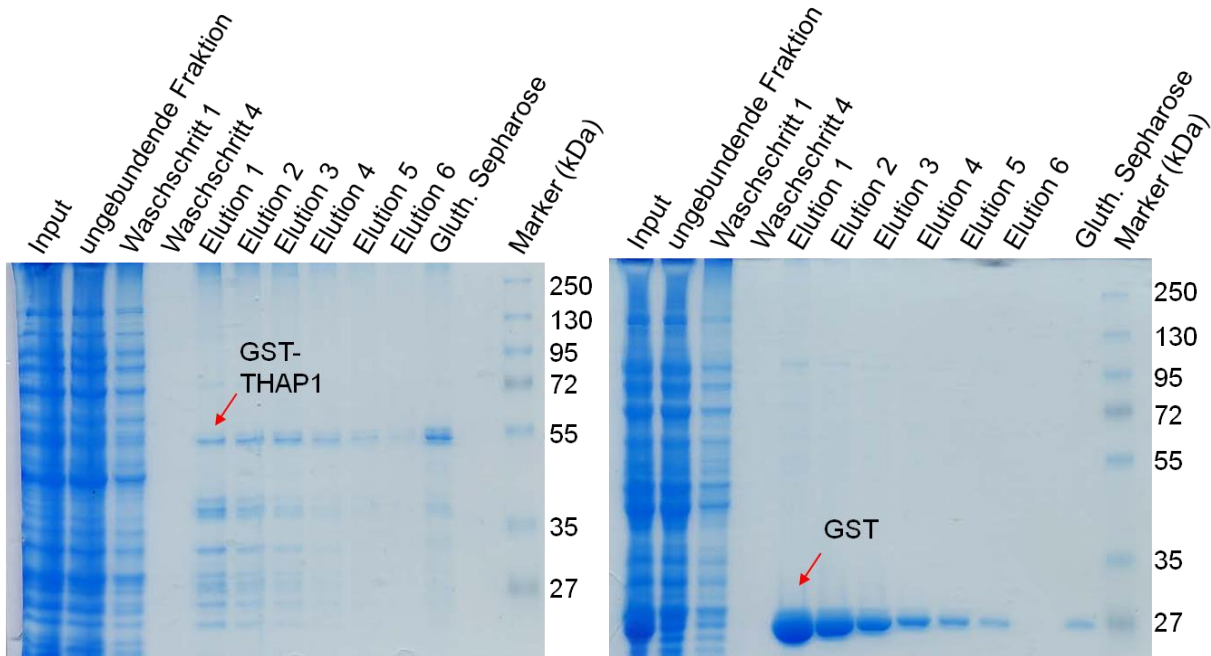


Abbildung 4.14: Aufreinigung von GST-THAP1 und GST-Protein mittels Glutathion Sepharose. Nach Überexpression des GST-gekoppelten THAP1-Proteins (GST-THAP1, links) bzw. des GST-Proteins (rechts) folgte eine Aufreinigung der Proteine über Glutathion-Sepharose. Der Input beschreibt den Überstand nach Sonifizierung und Zentrifugation des Bakterienpellets.

4.2.1.2 Die *Coiled-Coil*-Domäne vermittelt die THAP1-THAP1-Interaktionen

Zum Zeitpunkt dieser Analysen wurde von verschiedenen Arbeitsgruppen die Hypothese einer THAP1-Homodimerisierung aufgestellt. Dabei wurde angenommen, dass diese THAP1-THAP1-Interaktion über die C-terminale *Coiled-Coil*-Domäne vermittelt wird (40,91,100). Für die Charakterisierung der THAP1-*Coiled-Coil*-Domäne und Eingrenzung der minimalen Region, die verantwortlich für die vermutete THAP1-Homodimerisierung ist, wurde GST-THAP1 und als Negativkontrolle GST-Protein an eine definierte Menge an Glutathion-Sepharose immobilisiert und mit *in vitro* translatiertem, [³⁵S]-markiertem THAP1-Protein inkubiert (Abschnitte 3.2.4.3 und 3.2.6.1). Dabei wurde die Interaktionsfähigkeit des Wildtyp-THAP1-Proteins, sowie 13 kürzeren Protein-Fragmenten mit dem GST-THAP1-Protein untersucht (Abbildung 4.15).

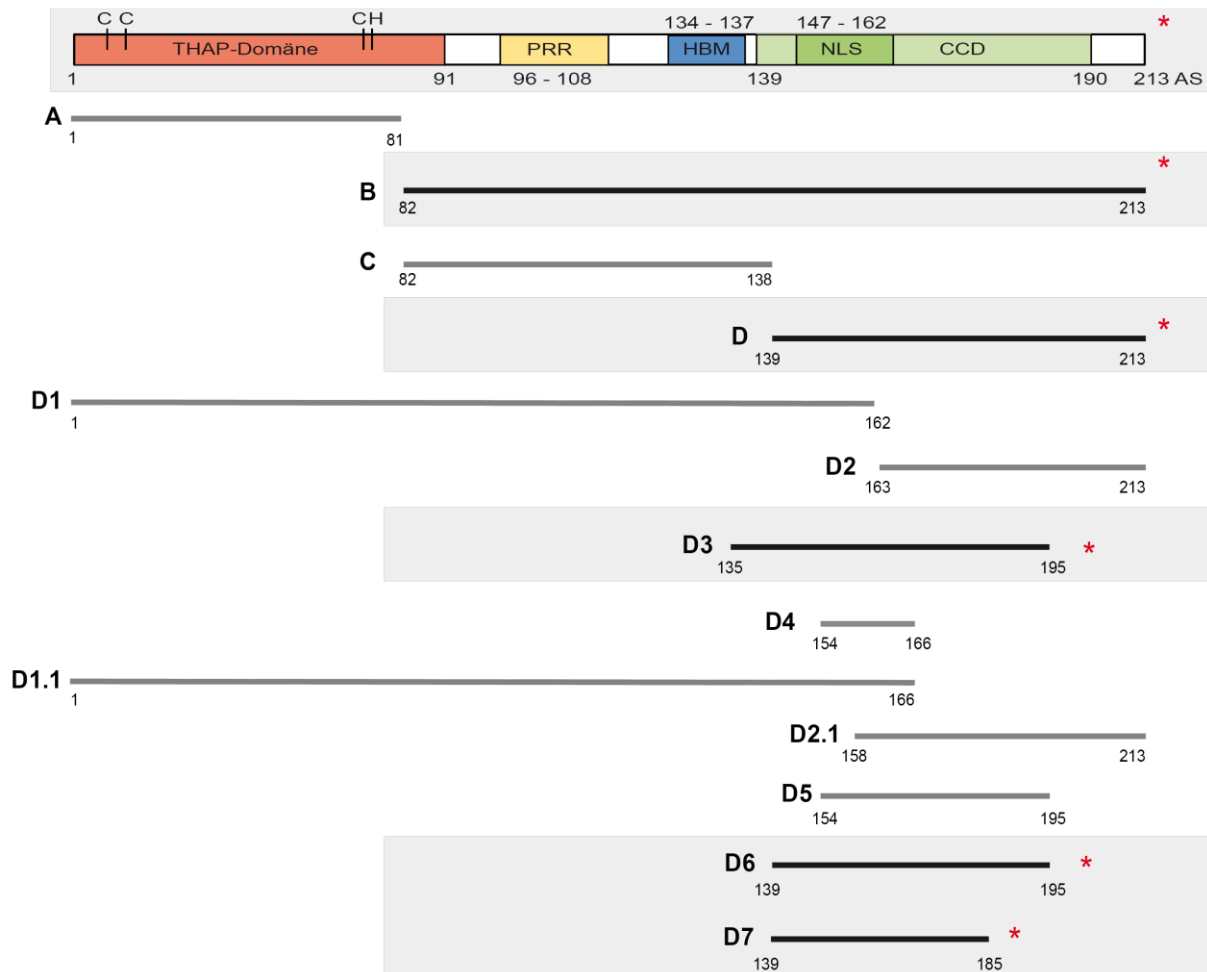


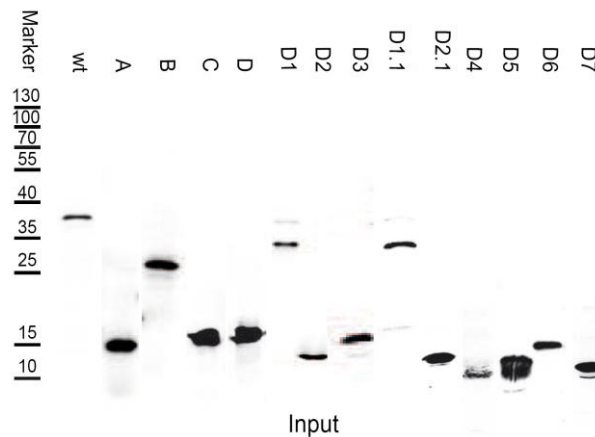
Abbildung 4.15: Schematische Darstellung des THAP1-Proteins und der untersuchten THAP1-Fragmente.

Untersucht wurde die Bindung von Wildtyp-THAP1-Protein und 13 kürzeren THAP1-Fragmenten an das GST-THAP1-Protein. Die Fragmente mit einer positiven THAP1-THAP1-Interaktion sind grau unterlegt und mit einem roten Stern markiert. PRR: Prolin-reiche Region, HBM: HCF-1 Bindemotiv, NLS: *nuclear localization signal*, CCD: *Coiled-coil*-Domäne, AS: Aminosäure

Für die Herstellung der *in vitro* translatierten, radioaktiv-markierten Proteine wurden alle verwendeten THAP1-Fragmente in das pGBKT7-Plasmid inseriert. Eine erfolgreiche *in vitro* Translation und Markierung mit [³⁵S] der analysierten THAP1-Proteine (Input) wurde standardmäßig vor dem Durchführen von GST-*Pulldown*-Analysen überprüft (Abbildung 4.16A). Nach einem stringenten Waschprozess wurden die Proteine von der Glutathion-Sepharose mit SDS-Probenpuffer eluiert und auf einem SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt. Zum Nachweis des vorhandenen GST-THAP1- und GST-Proteins erfolgte zunächst standardmäßig eine Coomassie-Färbung des SDS-Polyacrylamidgels (Daten nicht gezeigt). Anschließend wurde das Gel nach Protokoll getrocknet und gegen eine *Imaging*-Platte exponiert. In Abbildung 4.16B ist eine Zusammenfassung der GST-*Pulldown*-Analysen zur Charakterisierung der THAP1-*Coiled-Coil*-Domäne gezeigt. Die Ergebnisse zeigen eine eindeutige Homodimerisierung des Wildtyp-THAP1-Proteins (roter Stern). Während fünf der 13 THAP1-Proteinfragmente (Fragmente B, D, D3, D6 und D7) ebenfalls eine Interaktion

zum GST-THAP1 aufweisen, ist bei acht THAP1-Protein-Fragmenten (A, C, D1, D1.1, D2, D4, D2.1 und D5) keine Bindung zu erkennen. Die vorhandenen Interaktionen sind zudem spezifisch für das THAP1-Protein, da keine Banden im Ansatz mit dem GST-Protein vorhanden sind. Dadurch konnte die minimale für die THAP1-THAP-Interaktion kritische Region auf das Fragment 7 (Aminosäure 139 – 185) eingegrenzt werden. Kürzere Fragmente führten zu einem Verlust der Homodimerisierung.

A



B

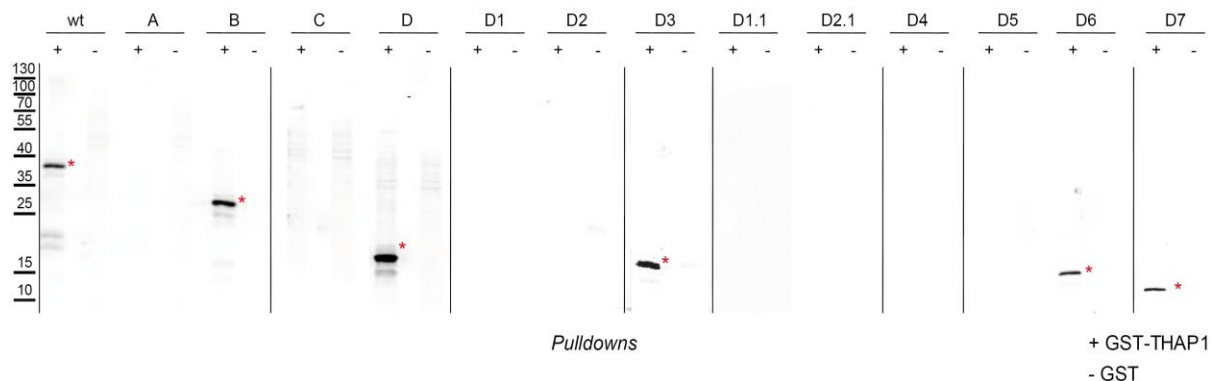


Abbildung 4.16: Charakterisierung der THAP1-Coiled-Coil-Domäne mittels GST-Pulldown Analysen.

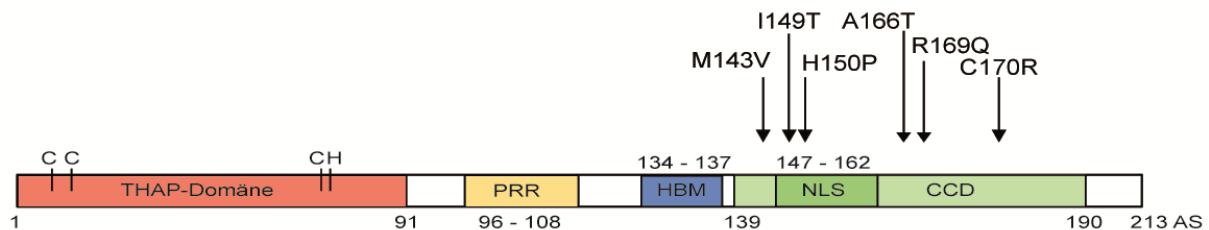
(A) Qualitätskontrolle der *in vitro* Translation und [^{35}S]-Markierung der zu untersuchenden THAP1-Proteine (Input). (B) Bei einer vorhandenen Protein-Protein-Interaktion zwischen GST-THAP1-Protein und den *in vitro* translatierten, radioaktiv-markierten THAP1-Proteinen ist eine spezifische Bande des jeweiligen Fragments zu erkennen (rot markiert). Die Markierung entspricht der Markierung in A. Als Negativkontrolle wurde das GST-Protein unter identischen Bedingungen mitgeführt (wt: Wildtyp).

4.2.1.3 Untersuchung des Einflusses C-terminal lokalisierter Mutationen auf die THAP1-Homodimerisierung

In weiteren Analysen wurde der Einfluss mutationsbedingter Aminosäuresubstitutionen innerhalb des C-Terminus auf die THAP1-THAP1-Interaktion untersucht. Die in diesen Analysen eingesetzten Missense Mutationen p.M143V (101), p.I149T (98), p.H150P (102),

p.A166T (98), p.R169Q (88) und p.C170R (91) wurden in DYT6-Patienten durch Sequenzierung identifiziert und führen zur Substitution einzelner Aminosäuren, die direkt in der THAP1-Coiled-Coil-Domäne lokalisiert sind (Abbildung 4.17A). Interessanterweise unterliegen die betroffenen Aminosäuren einer hohen Konservierung in verschiedenen Spezies vom Menschen (*Homo sapiens sapiens*) bis zum amerikanischen Chamäleon (*Anolis carolinensis*) wie in Abbildung 4.17B zu erkennen ist.

A



B



Abbildung 4.17: Übersicht der in GST-Pulldowns untersuchten DYT6-Mutationen.

(A) Schematische Darstellung des THAP1-Proteins mit den DYT6-verursachenden Missense-Mutationen, deren Einfluss auf die THAP1-THAP1-Interaktion untersucht wurde. PRR: Prolin-reiche Region, HBM: HCF-1 Bindemotiv, NLS: nuclear localization signal, CCD: Coiled-coil-Domäne, AS: Aminosäure (B) Der Vergleich dieses genomischen Bereichs in verschiedenen Spezies zeigt eine hohe Konservierung der substituierten Aminosäuren (schwarzer Rahmen).

Für die Untersuchungen des Einflusses dieser DYT6-verursachenden Missense Mutationen wurden erneut GST-Pulldown-Analysen durchgeführt. Die zu untersuchenden Missense-Mutationen wurden mittels Mutagenese-PCR generiert und die so erstellten THAP1-Konstrukte erneut in einem Retikulozyten-Lysat exprimiert (Abbildung 4.18A). In Abbildung 4.18B ist zu erkennen, dass keine der untersuchten Missense Mutationen zu einer eindeutig erkennbaren Veränderung der THAP1-Homodimerisierung geführt hat.

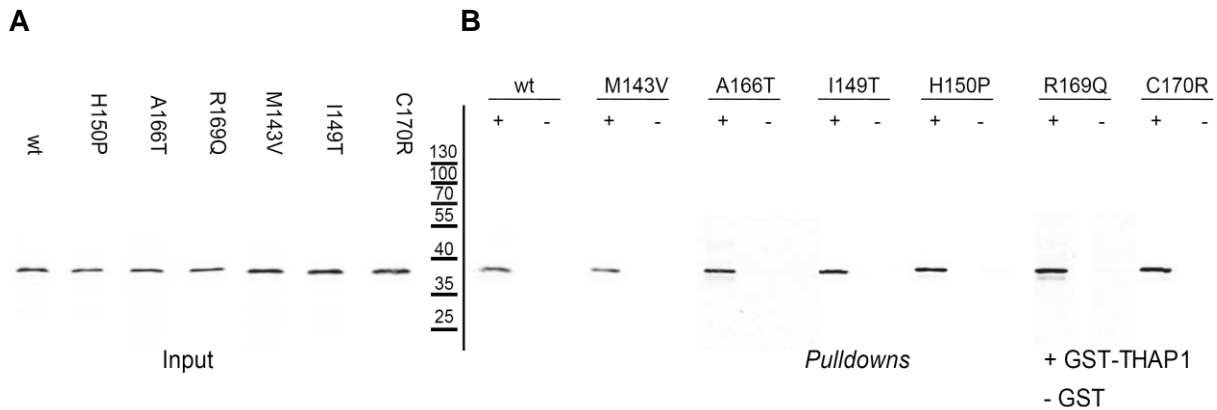


Abbildung 4.18: DYT6-verursachende Veränderungen innerhalb der minimalen Interaktionsregion haben keinen signifikanten Einfluss auf die THAP1-Homodimerisierung. (A) Nachweis *in vitro* translaterter, [³⁵S]-markierter THAP1-Proteine (Input). (B) Die sechs analysierten Missense-Mutationen zeigen keinen nachweisbaren Einfluss auf die THAP1-Homodimerisierung.

Zur unabhängigen Überprüfung der hier mittels GST-Pulldown ermittelten Ergebnisse wurden zusätzlich THAP1-THAP1-Interaktionsstudien im Hefe-Zwei-Hybrid-System durchgeführt (Abbildung 4.19). Auch in diesem System konnte die Homodimerisierung des THAP1-Proteins nachgewiesen und die *Coiled-Coil*-Domäne als essentielle Interaktions-Region verifiziert werden (Erogullari *et al.*, in Vorbereitung).

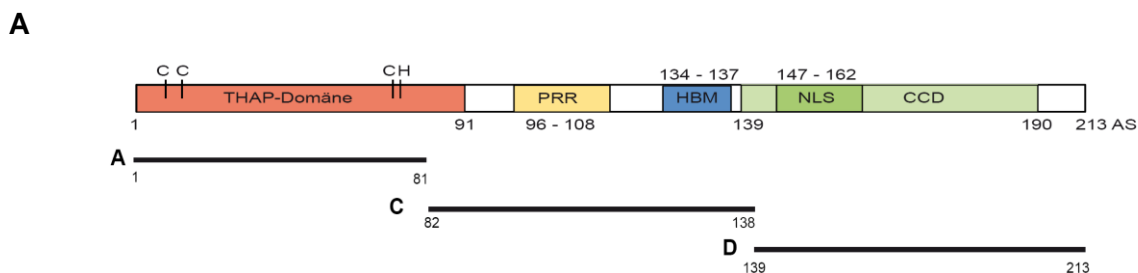
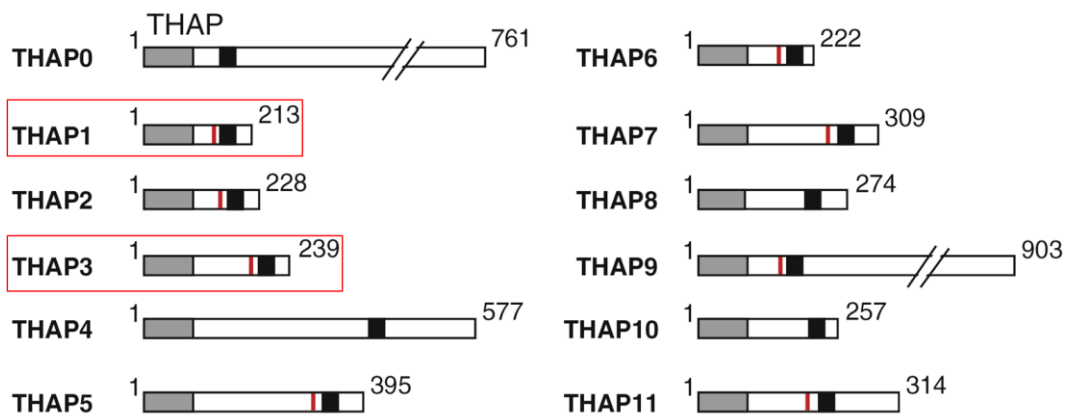


Abbildung 4.19: Charakterisierung der THAP1-Homodimerisierung mittels Hefe-Zwei-Hybrid-Analysen. (A) Schematische Darstellung des THAP1-Proteins mit den im Hefe-Zwei-Hybrid untersuchten Fragmenten A, C und D. HBM: HCF-1 Bindemotiv, NLS: *nuclear localization signal*, CCD: *Coiled-coil*-Domäne, AS: Aminosäure. (B) Der Hefestamm *AH109* wurde jeweils mit einer Kombination aus pGADT7 und pGBKT7 kotransformiert. Das Wachstum auf -4 SD bzw. als Transformationskontrolle -2 SD-Platten ist rechts aufgeführt. Ein Hefe-Wachstum auf -4 SD-Platten ist ausschließlich bei den Kombinationen Wildtyp-THAP1 und Wildtyp-THAP1 sowie Wildtyp-THAP1 und Fragment D zu erkennen. (-) steht für den jeweiligen Leervektor.

4.2.2 Identifizierung weiterer Interaktionspartner aus der Familie der THAP-Proteine

Nachdem eine THAP1-Homodimerisierung über die *Coiled-Coil*-Domäne bestätigt werden konnte stellte sich die Frage, ob das THAP1-Protein mit anderen Mitgliedern der THAP-Proteinfamilie, die ebenfalls eine *Coiled-Coil*-Domäne aufweisen (Abbildung 4.20A), interagiert. Aufgrund einer großen Sequenz-Ähnlichkeit des THAP1-Proteins mit dem THAP3-Protein (Abbildung 4.20B), sowie einer Übereinstimmung der *in-vivo* Expressionsprofile und überlappender Protein-Interaktionspartner (41) wurde eine mögliche THAP1-THAP3-Interaktion untersucht.

A



B

THAP1	MVQSCSAYGCKNRYD-KDKPVSFHKFPLTRPSLCKEWEEAARRRKNFKPTKYSSI
THAP3	MPKSCAARQCCNRYSSRRKQLTFHRFPFSRPELLKEWVLNIGRGNFKPKQHTVI
THAP1	CSEHFTPDCKRECNKLLKENAVPTIFLCTEPHDKKEDLLEPQE-----
THAP3	CSEHFRPECFSAFGNRKLNKHNAVPTVFAFQDPTQQVRENTDPASERGNASSSQ
THAP1	----LPPP--PLPPPVSQVDAAIIGLLMPPLQTPVNLVSVFCDHNYTVEDTMHQ---
THAP3	KEKVLPEAGAGEDSPGRNMDTALEELQLPPNAEGHVQVSPRRPQATEAVGRPTG
THAP1	----RKRIHQLEQQVEKLRKKLKTAAQRCRRQERQLEKLKEVVHFQKEKDD-VSE
THAP3	PAGLRRTPNKQPSDHSYALLDLSLKKKLFLLKENEKLRKRLQAQRLVMRRMSS
THAP1	RGYVILPNDYFEIVEVPA---
THAP3	RLRACKGHQGLQARLGPEQQS

Abbildung 4.20: Vergleich des THAP1-Proteins mit anderen Mitgliedern der THAP-Proteinfamilie.

(A) Die aufgeführten Mitglieder der THAP-Familie weisen alle eine THAP-Domäne (grau) und eine *Coiled-Coil*-Domäne (schwarz) auf. Zudem ist in acht der 12 THAP-Proteine ein HBM-Motiv vorhanden (rot). Rot umrandet sind THAP1 und THAP3. Die Abbildung wurde modifiziert nach Gervais *et al.* (38). Mit freundlicher Genehmigung des Autors und Copyright-Besitzers, Copyright © 2013, Springer (B) Sequenzvergleich der Proteine THAP1 und THAP3 mit der Internet Anwendung ClustalW. Rot: THAP-Domäne, grün: *Coiled-Coil*-Domäne.

4.2.2.1 THAP1 interagiert über seine *Coiled-coil*-Domäne mit THAP3

Eine mögliche Protein-Protein-Interaktion zwischen THAP1 und THAP3 wurde zunächst erneut mittels *GST-Pulldown*-Analysen untersucht. Zusätzlich sollte im Falle einer nachweisbaren Heterodimerisierung der Einfluss der bereits oben genannten Missense-Mutationen auf die THAP1-THAP3-Interaktion untersucht werden. Hierfür wurde zunächst der 720 Basenpaar-umfassende *THAP3*-ORF in das Expressionsplasmid pGEX-4T2 inseriert. Die Überexpression des GST-THAP3-Proteins wurde in Abschnitt 3.2.4.4 ausführlich beschrieben durchgeführt. Die Aufreinigung des GST-gekoppelten THAP3-Proteins erfolgte nach Protokoll (Abschnitt 3.2.4.5). Abbildung 4.21 zeigt die einzelnen Fraktionen der GST-THAP3-Aufreinigung in einem kolloidal Coomassie-gefärbten SDS-Polyacrylamidgel. Das THAP3-Protein hat ein errechnetes Molekulargewicht von 27 kDa. Mit dem GST-Tag (25 kDa) ergibt sich daraus ein theoretisches Molekulargewicht von etwa 52 kDa. In Abbildung 4.21 ist zu erkennen, dass die berechnete Proteingröße in etwa mit der tatsächlichen Laufhöhe des GST-THAP3-Proteins übereinstimmt. Auch in diesen Experimenten wurden neben der spezifischen GST-THAP3-Bande zusätzliche Proteinbanden in den Elutionsfraktionen mit geringeren Molekulargewichten nachgewiesen.

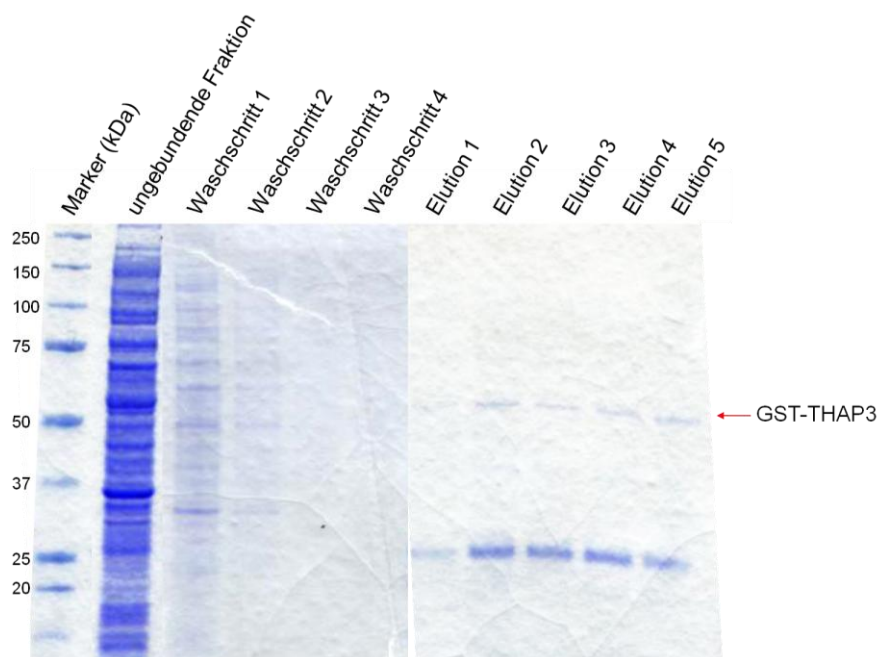


Abbildung 4.21: Aufreinigung des GST-gekoppelten THAP3-Proteins über Glutathion-Sepharose.

Die Überexpression des GST-THAP3-Proteins erfolgte in *E.coli BL21*. Nach Sonifizierung und der Trennung des Überstand vom Zelldebris wurde das GST-THAP3-Protein affinitätschromatographisch aufgereinigt. Die einzelnen Fraktionen der Aufreinigung wurden anschließend auf einem 10 %igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und mit kolloidalem Coomassie gefärbt.

Im Anschluss an die Aufreinigung des THAP3-Proteins wurden GST-*Pulldown*-Analysen mit immobilisiertem GST-THAP3- und GST-Protein als Negativkontrolle durchgeführt. Zunächst sollte untersucht werden, ob eine mögliche Interaktion zwischen THAP1 und THAP3 tatsächlich über die *Coiled-Coil*-Domäne des THAP1-Proteins vermittelt wird. Hierfür wurde Wildtyp-THAP1 und die minimale Homodimerisierungsdomäne Fragment D7 (Abbildung 4.16) als radioaktiv-markiertes Protein *in vitro* hergestellt und mit GST-THAP3 bzw. GST inkubiert. Eine Interaktion des GST-THAP3-Proteins mit dem Wildtyp-THAP1-Protein konnte nachgewiesen werden (Abbildung 4.22). Diese Interaktion erfolgt ebenfalls über die *Coiled-Coil*-Domäne des THAP1-Proteins, wie durch die Bindung des *Coiled-Coil*-Fragmentes (D7) gezeigt werden konnte. Es ist anzumerken, dass trotz sehr stringenter Waschbedingungen für beide Ansätze auch in den Negativkontrollen (- GST) eine schwache Bande zu beobachten ist. Diese ist allerdings trotz einer deutlich stärkeren Beladung der Sepharose-Matrix mit GST-Protein im Vergleich zu den wt- und D7-Ansätzen wesentlich schwächer ausgeprägt und wurde als „unspezifisch“ eingestuft.

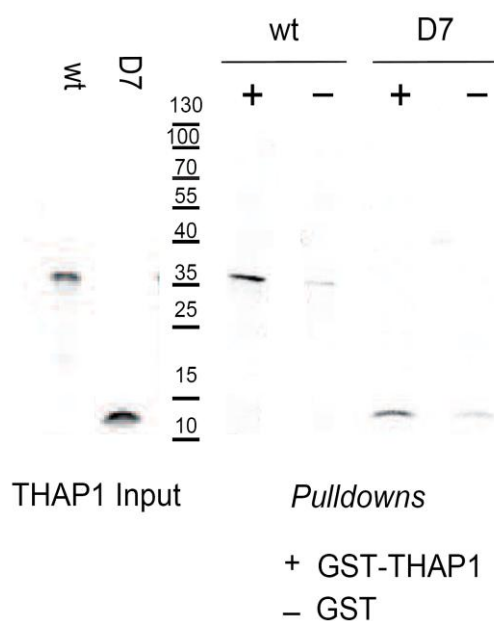


Abbildung 4.22: THAP1 interagiert mit THAP3 *in vitro*.

In GST-*Pulldown*-Analysen wurde GST-THAP3 mit radioaktiv-markiertem Wildtyp-THAP1 (wt) bzw. der minimalen Homodimerisierungsdomäne D7 inkubiert. Es findet eine Interaktion zwischen THAP1 und GST-THAP3 statt, die über die *Coiled-Coil*-Region des THAP1-Proteins vermittelt wird.

In den folgenden GST-*Pulldown*-Analysen wurde untersucht, ob DYT6-verursachende Mutationen in der *Coiled-coil*-Domäne des THAP1-Proteins einen Einfluss auf die THAP1-THAP3-Heterodimerisierung haben. Dazu wurde das GST-THAP3-Protein bzw. GST-Protein als Negativkontrolle mit radioaktiv-markierten THAP1-Proteinen (Wildtyp oder mit entsprechenden Mutationen) inkubiert. Auch in diesen Analysen konnte für keine der untersuchten Mutationen eine eindeutige Veränderung der THAP1-THAP3-Interaktion nachgewiesen werden (Abbildung 4.23B).

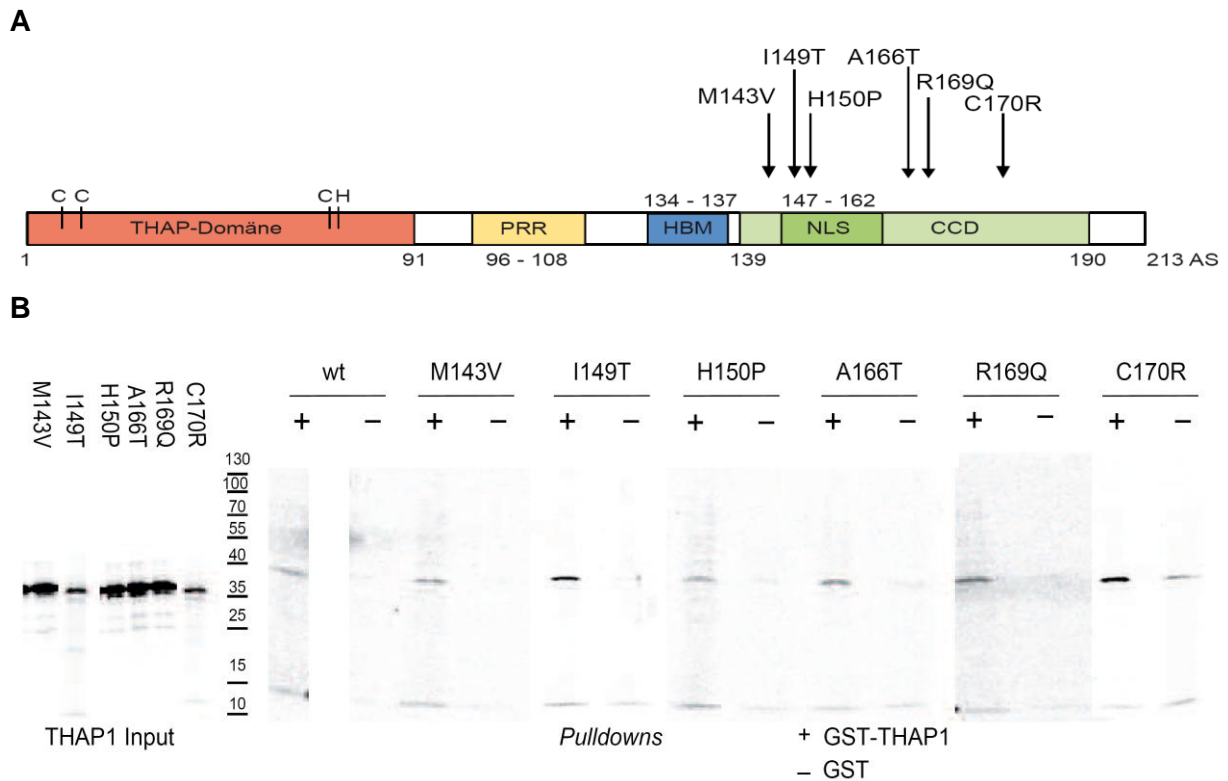


Abbildung 4.23 DYT6-verursachende Mutationen in der THAP1-Coiled-coil-Domäne haben keinen nachweisbaren Einfluss auf die THAP1-THAP3-Interaktion.

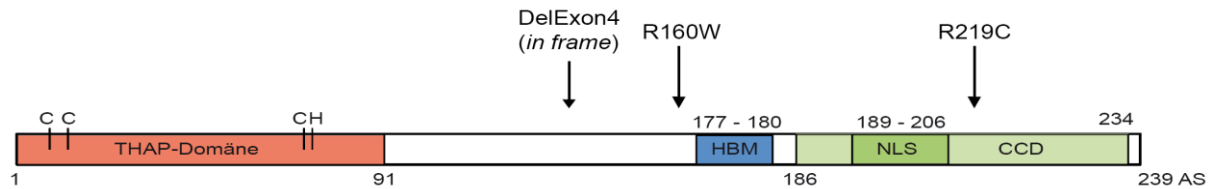
(A) Die Missense Mutationen, deren Effekt auf die THAP1-THAP3-Interaktion mittels GST-Pull-downs untersucht wurde, befinden sich in der Coiled-Coil-Domäne des THAP1-Proteins. PRR: Prolin-reiche Region, HBM: HCF-1 Bindemotiv, NLS: nuclear localization signal, CCD: Coiled-coil-Domäne, AS: Aminosäure. (B) Keine der untersuchten Missense-Mutationen führt zu einer Aufhebung der Bindung zwischen THAP1 und THAP3.

In einem parallel laufenden Projekt in Zusammenarbeit mit dem Institut für Neurogenetik konnten verschiedene Mutationen im *THAP3*-Gen in Patienten mit einer Dystonie identifiziert werden. Eine dieser Mutationen bewirkt den Austausch einer Aminosäure direkt innerhalb der Coiled-Coil-Domäne des THAP3-Proteins und zwei weitere Mutationen verändern die angrenzende zentrale Region des Proteins. Bei der Mutation DelExon4 handelt es sich um eine *in frame* Deletion des Exons 4, wobei die Coiled-coil-Region im C-Terminus erhalten bleibt. (Abbildung 4.24A, unpublizierte Daten, persönliche Mitteilung von Dr. Ana Westenberger). In den folgenden Analysen sollte untersucht werden, ob diese *THAP3*-Mutationen die THAP1-THAP3-Heterodimerisierung beeinflussen.

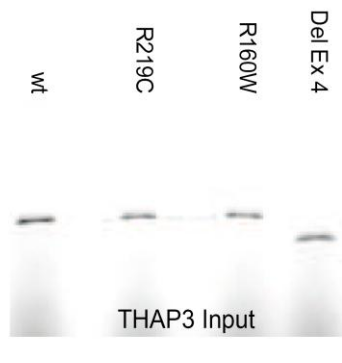
Hierfür wurde das aufgereinigte GST-THAP1-Protein mit an die Glutathion-Sepharose immobilisiert und mit *in vitro* translatierten, [³⁵S]-markierten THAP3-Proteinen inkubiert. Alle THAP3-Konstrukte lagen für die *in-vitro* Translation im pGBKT7-Plasmid vor. Die untersuchten Mutationen sind zur Übersicht in Abbildung 4.24A schematisch dargestellt. Die Überprüfung der *in vitro*-translatierten, radioaktiv-markierten THAP3-Proteine erfolgte mittels SDS-PAGE (Abbildung 4.24B).

In diesen *GST-Pulldown*-Analysen wurde ebenfalls kein signifikanter Einfluss der untersuchten *THAP3*-Mutationen p.R160W, p.R219C und DelExon4 auf die THAP1-THAP3-Heterodimerisierung beobachtet (Abbildung 4.24C).

A



B



C

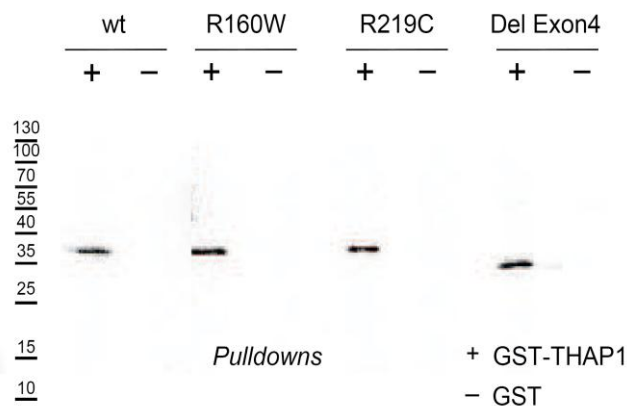


Abbildung 4.24: Mutationen im THAP3-Protein verändern nicht die THAP1-THAP3-Interaktion.

(A) Schematische Darstellung des Wildtyp-THAP3-Proteins. Es wurde ebenfalls der Einfluss der dargestellten Mutationen (zwei Missense-Mutationen und eine Deletion) in den *GST-Pulldown*-Analysen untersucht. HBM: HCF-1 Bindemotiv, NLS: *nuclear localization signal*, CCD: *Coiled-coil*-Domäne, AS: Aminosäure. (B) Die Qualität der *in vitro* translatierten, [³⁵S]-markierten THAP3-Proteine (Input) wurde vor jedem *GST-Pulldown* überprüft. (C) Wildtyp-THAP3 bindet spezifisch an das GST-gekoppelte THAP1-Protein. Die THAP1-THAP3-Interaktion bleibt trotz mutierter THAP3-Proteine unverändert.

Zur Verifizierung der Interaktion zwischen dem THAP1- und THAP3-Protein wurden zusätzlich Interaktionsstudien in Hefen durchgeführt (Tabelle 4.1). Die Ergebnisse der THAP1-THAP3-Interaktion sowie der Mutationsanalysen aus den *GST-Pulldowns* konnten in diesen Analysen verifiziert werden. Zur Eingrenzung der THAP3-Interaktionsdomäne wurde zusätzlich die Interaktion zwischen Wildtyp-THAP1 und zwei THAP3-Fragmenten, welche die Zinkfinger-Region (Aminosäuren 1 – 89) und die *Coiled-Coil*-Domäne (Aminosäure 181 – 236) kodieren, untersucht. Hierbei konnte eine Interaktion des THAP1-Proteins zu beiden THAP3-Fragmenten aufgezeigt werden. Des Weiteren konnte durch die hier aufgeführte Untersuchung einer möglichen THAP3-Homodimerisierung keine THAP3-THAP3-Interaktion nachgewiesen werden (Erogullari *et al.*, in Vorbereitung).

pGADT7	pGBKT7	Wachstum auf	
		-4 SD	-2 SD
THAP1-wt	THAP3-wt	+	+
THAP1-M143V	THAP3-wt	+	+
THAP1-I149T	THAP3-wt	+	+
THAP1-H150P	THAP3-wt	+	+
THAP1-A166T	THAP3-wt	+	+
THAP1-R169Q	THAP3-wt	+	+
THAP1-C170R	THAP3-wt	+	+
THAP1-wt	THAP3-DelEx4	+	+
THAP1-wt	THAP3-R160W	+	+
THAP1-wt	THAP3-R219C	+	+
THAP1-wt	THAP3-Zf	+	+
THAP1-wt	THAP3-CCD	+	+
THAP3-wt	THAP3-Zf	-	+
THAP3-wt	THAP3-CCD	-	+

Tabelle 4.1: Zusammenfassung der Hefe-Zwei-Hybrid-Analysen.

Der Hefestamm *AH109* wurde jeweils mit einer Kombination aus pGADT7 und pGBKT7 kotransformiert. Das Wachstum auf -4 SD bzw. als Transformationskontrolle -2 SD-Platten ist rechts aufgeführt. Ein Hefe-Wachstum auf -4 SD-Platten ist ausschließlich bei den Kombinationen allen THAP1-THAP3 zu erkennen. Ein eindeutiger Einfluss der untersuchten *THAP1*- und *THAP3*-Mutationen wurde nicht beobachtet. Die Kontrollansätze mit den entsprechenden Leervektoren wurden der Übersicht halber nicht aufgeführt. Zf: Zinkfinger; CCD: *Coiled-Coil*-Domäne; (-) steht für kein Wachstum und (+) für Wachstum auf den jeweiligen SD-Platten.

4.2.3 Untersuchung einer möglichen THAP1-HDAC1 bzw. HDAC3-Interaktion

Die in der hier vorliegenden Arbeit aufgeführten Ergebnisse unterstreichen die physiologisch relevante Funktion des THAP1-Proteins als Transkriptionsrepressor. Studien anderer Arbeitsgruppen zeigten, dass neben THAP1 weitere Proteine aus der THAP-Familie, wie z.B. das THAP7-Protein, die Repression der Transkription verschiedener Gene induzieren (109). So zeigten Macfarlan *et al.* (2005), dass die Interaktion zwischen dem THAP7-Protein und der Histon Deacetylase 3 (HDAC3) essentiell für eine effiziente Bindung des THAP7-Proteins an das Chromatin und die dadurch vermittelte Repression ist (103). Zudem zeigten Dejosez *et al.* (2008) ebenfalls eine Interaktion des murinen THAP-Protein Ronin mit Hdac3 (104). Aufgrund dieser Publikationen bzw. der bereits aufgeführten Funktion von THAP1 bei der Transkription, sollte die Interaktion zwischen THAP1 und HDAC3, sowie dem strukturell ähnlichen HDAC1 untersucht werden.

4.2.3.1 THAP1 interagiert mit der Histon-Deacetylase HDAC3

Hierfür wurden zunächst die proteinkodierenden DNA-Bereiche von HDAC1 und HDAC3 an cDNA aus humanem, fetalen Gehirn amplifiziert und nach der Sequenzierung in das pcDNA-

Myc/His 3.1A-Expressionsplasmid inseriert. Dieses Plasmid enthält ebenfalls einen T7-Promotor, sodass diese Plasmidkonstrukte für die Herstellung *in vitro* translaterter, radioaktiv-markierter Proteine eingesetzt werden konnten. Die erfolgreiche Synthese der HDAC-Proteine wurde überprüft (Abbildung 4.25) und anschließend beide Proteine in GST-*Pulldown*-Analysen mit GST-gekoppeltem THAP1-Protein inkubiert. Nach mehrmaligen und stringenten Waschschrinen erfolgte eine Analyse der Bindung an das GST-THAP1-Protein. Als Negativkontrolle wurde das GST-Protein verwendet.

Während die hier durchgeführten Analysen eine Interaktion zwischen dem THAP1-Protein und HDAC3 zeigten, konnte keine eindeutige Interaktion von THAP1 mit HDAC1 nachgewiesen werden, da eine HDAC1-Bande ebenfalls in der Negativkontrolle (GST-Protein) zu erkennen ist (Abbildung 4.25B).

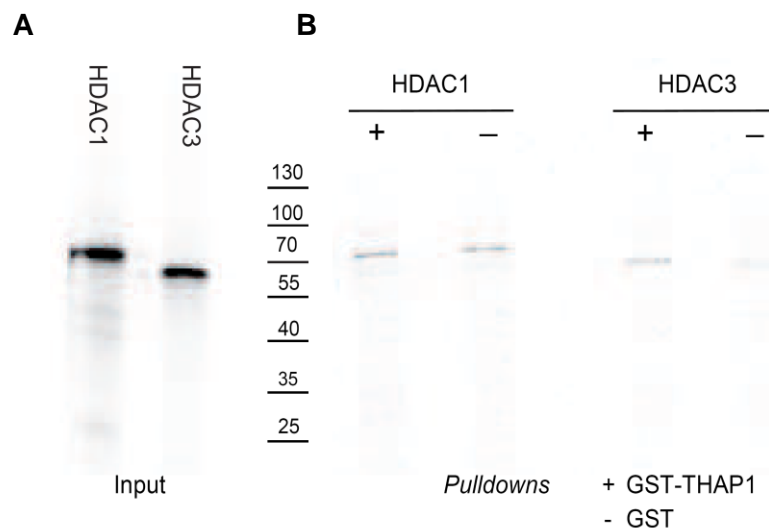


Abbildung 4.25: Nachweis einer THAP1-HDAC3-Interaktion in GST-*Pulldown* Analysen.

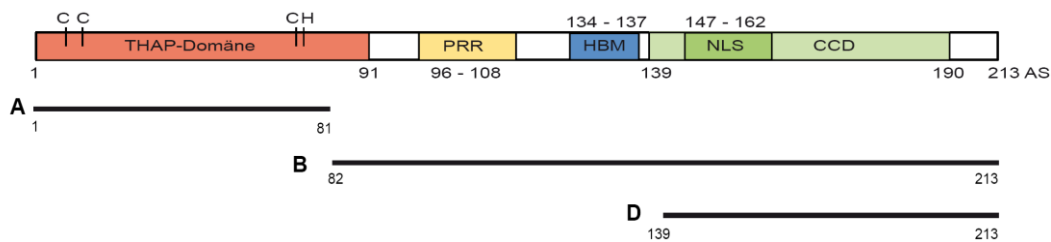
(A) Zur Qualitätskontrolle wurden die radioaktiv-markierten HDAC-Proteine separat auf einem 10 % SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt. (B) Während eine eindeutige Interaktion zwischen GST-THAP1 und HDAC3 nachgewiesen werden konnte, zeigte sich keine spezifische Bindung von HDAC1 an das GST-THAP1-Protein. Als Kontrolle wurde das GST-Protein (- GST) eingesetzt.

Als alternative Methode zur Untersuchung einer möglichen THAP1-HDAC-Interaktion wurden parallel Bindungsstudien in Hefen durchgeführt. Hierfür lag das Wildtyp-THAP1-Konstrukt in dem pGADT7-Expressionsplasmid und HDAC1 und HDAC3 im pGBKT7-Expressionsplasmid vor. Dabei konnte ausschließlich bei mit THAP1-pGADT7 und HDAC3-pGBKT7 kotransformierten Hefen ein eindeutiges Wachstum auf -4 SD-Platten und damit eine Interaktion zwischen THAP1 und HDAC3 festgestellt und die bereits in den GST-*Pulldown*-Analysen ermittelten Ergebnisse bestätigt werden. Eine Interaktion zwischen THAP1 und HDAC1 wurde nicht beobachtet (Daten nicht gezeigt).

4.2.3.2 Die THAP1-HDAC3-Interaktion wird über die THAP-Domäne vermittelt

Für die Eingrenzung und Charakterisierung der HDAC3-Interaktionsdomäne im THAP1-Protein wurden drei unterschiedliche THAP1-Fragmente verwendet. Es handelt sich hierbei um die Konstrukte A, B und D, die bereits erfolgreich zur Charakterisierung der THAP1-Homodimerisierungsdomäne verwendet wurden (Abbildung 4.26A). Einer Überprüfung der erfolgreichen Kotransformation der Hefen mit den entsprechenden Plasmiden (Wachstum auf -2 SD-Platten) folgte ein Überimpfen ausgewählter Hefeklonen auf -4 SD-Platten. Hierbei konnte lediglich ein Wachstum von Hefe-Klonen auf -4 SD-Platten nachgewiesen werden, die mit einem vollständigen THAP1-Konstrukt oder dem Fragment A transformiert wurden. Die Fragmente B und D wiesen keine Interaktion zu HDAC3 auf. Somit konnte die HDAC3-Interaktionsdomäne im THAP1-Protein auf die THAP-Domäne eingegrenzt werden (Erogullari *et al.*, in Vorbereitung).

A



B

pGADT7	pGBKT7	Wachstum auf	
		-4 SD	-2 SD
THAP1-wt	HDAC3		
THAP1-A	HDAC3		
THAP1-B	HDAC3		
THAP1-D	HDAC3		
THAP1-wt	-		
THAP1-A	-		
THAP1-B	-		
THAP1-D	-		
-	HDAC3		

Abbildung 4.26: Eingrenzung der THAP1-HDAC3-Interaktionsdomäne im THAP1-Protein.

(A) Schematische Darstellung des THAP1-Proteins mit den im Hefe-Zwei-Hybrid untersuchten Fragmenten A, B und D. HBM: HCF-1 Bindemotiv, NLS: *nuclear localization signal*, CCD: *Coiled-coil*-Domäne, AS: Aminosäure. (B) Der Hefestamm *AH109* wurde jeweils mit einer Kombination aus pGADT7 und pGBKT7 kotransformiert. Das Wachstum auf -4 SD bzw. als Transformationskontrolle -2 SD-Platten ist rechts aufgeführt. Ein Hefe-Wachstum auf -4 SD-Platten ist ausschließlich bei den Kombinationen THAP1 - wt-HDAC3 und Fragment A-HDAC3 zu erkennen. D.h., die THAP1-HDAC3-Interaktion wird über die THAP-Domäne vermittelt. (-) steht für den jeweiligen Leervektor.

4.2.4 Identifizierung weiterer THAP1-Interaktionspartner

Wie im bisherigen Verlauf der Arbeit aufgeführt, konnten unsere Analysen erste Protein-Protein-Interaktionen des THAP1-Transkriptionsfaktors nachweisen. Grundlage dieser Analysen waren bereits bekannte und funktionell relevante Protein-Protein-Interaktionen anderer Mitglieder der THAP-Proteinfamilie oder erschlossen sich aus den dabei erzielten (Zwischen)-Ergebnissen. Im folgenden Teil der Arbeit sollten in einem Hypothesen-freien Ansatz weitere THAP1-Bindeproteine identifiziert werden. Hierfür wurden unbekannte Proteine an GFP-gekoppeltem THAP1-Protein mittels *GFP-Traps*[®] kopräzipitiert und anschließend auf einem 2D-Polyacrylamidgel nach ihrem isoelektrischen Punkt und Molekulargewicht aufgetrennt und visualisiert (angefärbt). Die so erhaltenen Protein-Spots wurden ausgestanzt und mittels Massenspektrometrie analysiert.

4.2.4.1 Optimierung der *GFP-Traps*[®] mit GFP-gekoppeltem THAP1-Protein

Zur Ermittlung der optimalen experimentellen Bedingungen wurden in Vorversuchen verschiedene Waschbedingungen getestet. Hierfür wurde der Zellextrakt THAP1-GFP-transfizierter SH-SY5Y-Zellen, deren erfolgreiche Transfektion zuvor mittels Fluoreszenzmikroskopie bestätigt wurde, verwendet. Als Negativkontrolle wurde der Zellextrakt von GFP-transfizierten SH-SY5Y-Zellen mitgeführt. Durch die Inkubation der Zellextrakte mit der *GFP-Trap*-Matrix (Chromotek) erfolgte eine Anreicherung sowohl der GFP-Proteine (GFP bzw. THAP-GFP) als auch der damit assoziierten Proteinkomplexe / Bindepartner. Die so angereicherten GFP-Protein-Komplexe wurden unterschiedlich gewaschen und anschließend mittels SDS-PAGE und kolloidaler Coomassie-Färbung untersucht. Dabei waren unter wenig stringenten Bedingungen (*GFP-Trap*-Waschpuffer mit 150 mM NaCl) sehr viele Banden im kolloidal-Coomassie-gefärbtem SDS-Polyacrylamidgel detektierbar (Abbildung 4.27). Durch eine Erhöhung der Stringenz bzw. höherer NaCl- und Tween-20-Konzentration wurde die Anzahl der detektierbaren Banden reduziert. Im weiteren Verlauf dieser Arbeit wurde mit dem *GFP-Trap*-Waschpuffer mit 500 mM NaCl und 0,5 % Tween-20 gearbeitet. Unter diesen Bedingungen wurde eine effiziente Anreicherung einer überschaubaren und damit realistischen Anzahl potentieller THAP1-Bindepartner erzielt.

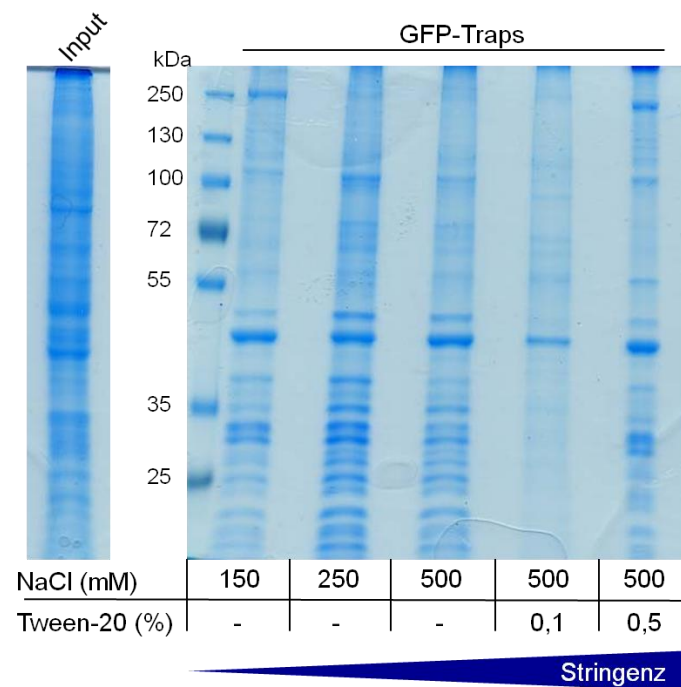


Abbildung 4.27: Optimierung der Waschbedingungen der *GFP-Traps*®.

Mit zunehmender NaCl-Konzentration und Zugabe von dem Detergenz nimmt die Anzahl der detektierbaren Proteinsignale ab.

4.2.4.2 Identifizierung neuer THAP1-Interaktionspartner

Die in diesem Kapitel beschriebenen Experimente erfolgten in Kooperation mit dem chirurgischen Forschungslabor in der Klinik für Chirurgie (Ansprechpartner Prof. Dr. Dr. Jens Habermann und Dr. Timo Gemoll). Die mit Hilfe der *GFP-Traps*® angereicherten Proteine bzw. Proteinkomplexe wurden zunächst aufgereinigt, einer Konzentrationsbestimmung unterzogen und dann mittels 2D-Gelelektrophorese auf einem 12,5 %igen Acrylamidgel aufgetrennt. Die Proteine konnte abschließend mit einer Silberfärbung des 2D-Gels visualisiert werden. Eine ausführliche Beschreibung dieses Vorgehens ist in Abschnitt 3.2.4.9 aufgeführt. Die Auswahl der zu untersuchenden *Spots* wurde manuell mit Hilfe des Bildanalyseprogramms Progenesis Same Spots (Nonlinear dynamics) durchgeführt. Dabei wurden nur solche *Spots* ausgewählt, die sich im Vergleich THAP1-GFP- zu GFP-Präzipitationen klar voneinander abgrenzten, um unspezifisch gebundene Proteine auszuschließen. Diese *Spots* wurden mit dem Etton Spot Picker (GE Healthcare) ausgestanzt und zur massenspektrometrischen Analyse in das Deutsche Diabeteszentrum in Düsseldorf (Ansprechpartner: Dr. Stefan Lehr) geschickt.

In Abbildung 4.28 sind die 2D-Gele des THAP1-GFP-Ansatzes (oben) und der Negativkontrolle GFP (unten) zum Vergleich dargestellt. Das unterschiedliche Protein-*Spot*-Profil dieser beiden Gele ist gut zu erkennen. Aus dem THAP1-GFP-2D-Gel wurden insgesamt 31 *Spots* ausgestanzt.

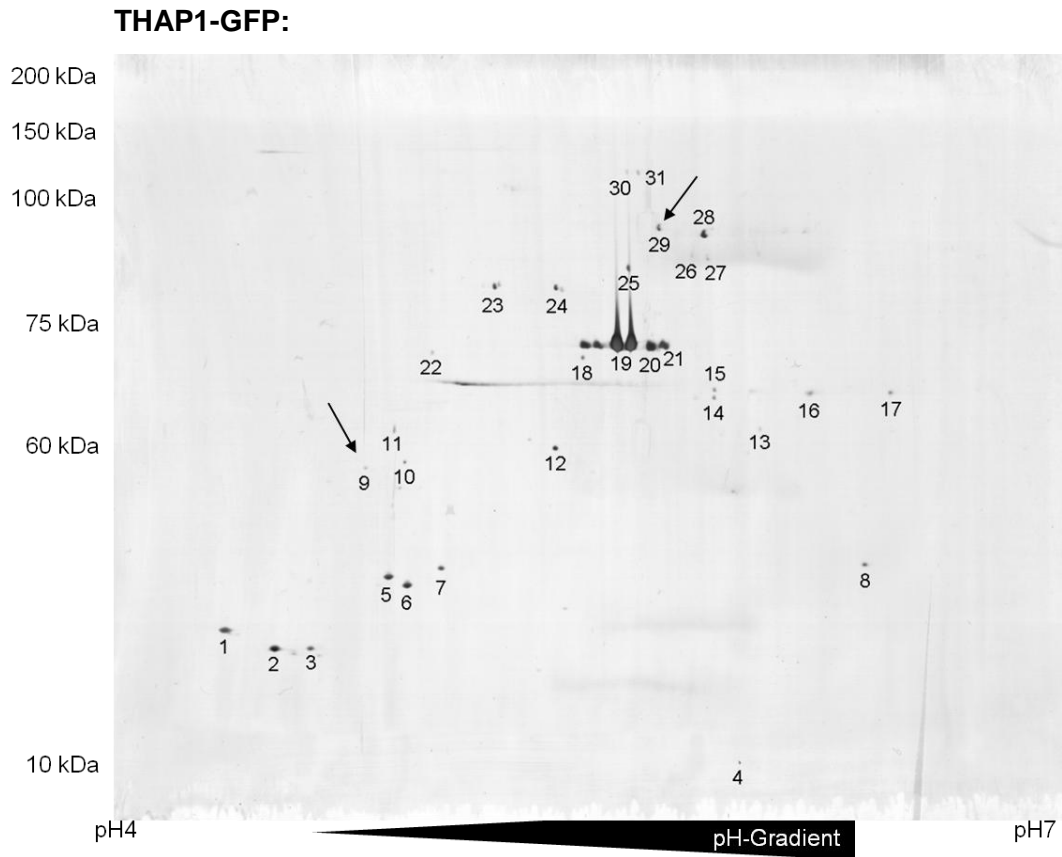


Abbildung 4.28: Auftrennung der Proteine mittels 2D-Gelelektrophorese.

Die angereicherten Proteine aus den *GFP-Traps*® für THAP1-GFP (oben) und GFP (unten) wurden auf 2D-Gelen aufgetrennt und diese silbergefärbt. Die ausgewählten Spots zur massenspektrometrischen Protein-Identifizierung aus dem THAP1-GFP 2D-Gel sind durchnummeriert. Die beiden interessanten Proteine 14-3-3 ϵ (Spot Nummer 9) und *Heat shock cognate 71 kDa protein* (Spot Nummer 29) sind mit Pfeilen markiert.

Tabelle 4.2: Ergebnisse der massenspektrometrischen Auswertung.

Grau-unterlegt sind die mit signifikanter Sicherheit (basierend auf dem Mascot-Wert) identifizierten Proteine. pl: isoelektrischer Punkt, MW: Molekulargewicht.

Spot #	Name	Accession	Protein MW (Da)	pI-Wert	Status
1	<i>Golgin subfamily A member 7</i>	GOGA7_HUMAN	16042.00	7.50	Undefined
2	<i>Myosin light polypeptide 6</i>	MYL6_HUMAN	17090.00	4.40	Identified
3	<i>Putative uncharacterized protein</i>	YK006_HUMAN	29591.00	10.50	Undefined
4	<i>Elongation factor 1-alpha 2</i>	EF1A2_HUMAN	50780.00	9.70	Undefined
5	<i>Myosin regulatory light chain 12A</i>	ML12A_HUMAN	19839.00	4.50	Uncertain
6	<i>Myosin regulatory light chain 12A</i>	ML12A_HUMAN	19839.00	4.50	Uncertain
7	<i>Fibroblast growth factor 4</i>	FGF4_HUMAN	22148.00	10.20	Undefined
8	<i>Putative uncharacterized protein</i>	NC301_HUMAN	11119.00	9.80	Undefined
9	<i>14-3-3 protein epsilon</i>	1433E_HUMAN	29326.00	4.50	Identified
10	<i>Tropomyosin alpha-3 chain</i>	TPM3_HUMAN	32856.00	4.50	Uncertain
11	<i>Tropomyosin alpha-1 chain</i>	TPM1_HUMAN	32746.00	4.50	Identified
12	<i>Heparanase-2</i>	HPSE2_HUMAN	66954.00	10.50	Undefined
13	<i>Ras-related protein Rab-28</i>	RAB28_HUMAN	25054.00	5.60	Undefined
14	<i>Actin-related protein M1</i>	ARPM1_HUMAN	41665.00	5.50	Undefined
15	<i>Guanine nucleotide-binding protein subunit beta-4</i>	GBB4_HUMAN	38284.00	5.50	Undefined
16	<i>60S acidic ribosomal protein P0</i>	RLA0_HUMAN	34423.00	5.60	Undefined
17	<i>60S acidic ribosomal protein P0-like</i>	RLA0L_HUMAN	34514.00	5.30	Identified
18	<i>Tropomodulin-3</i>	TMOD3_HUMAN	39741.00	4.90	Identified
19			0.00	0.00	Error
20	<i>Transmembrane protein 98</i>	TMM98_HUMAN	24880.00	4.70	Undefined
21	<i>Actin, cytoplasmic 2</i>	ACTG_HUMAN	42108.00	5.20	Identified
22	<i>Protein FAM170A</i>	F170A_HUMAN	37705.00	4.90	Undefined
23	<i>Tubulin beta chain</i>	TBB5_HUMAN	50095.00	4.60	Identified
24	<i>Tubulin alpha-1B chain</i>	TBA1B_HUMAN	50804.00	4.80	Identified
25	<i>Hemoglobin subunit epsilon</i>	HBE_HUMAN	16249.00	9.40	Undefined
26	<i>NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 2</i>	NDUA2_HUMAN	11029.00	10.40	Undefined
27	<i>Speckle-type POZ protein-like</i>	SPOPL_HUMAN	45302.00	7.80	Uncertain
28	<i>NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 3</i>	NDUA3_HUMAN	9273.00	9.10	Undefined
29	<i>Heat shock cognate 71 kDa protein</i>	HSP7C_HUMAN	71082.00	5.20	Identified
30	<i>Alpha-actinin-4</i>	ACTN4_HUMAN	105245.00	5.20	Undefined
31	<i>Alpha-actinin-4</i>	ACTN4_HUMAN	105245.00	5.20	Identified

Tabelle 4.2 fasst die Ergebnisse der massenspektrometrischen Analysen der ausgestanzten Spots aus Abbildung 4.28 zusammen. Dabei konnten nur zehn der 31 ausgestanzten Spots eindeutig humanen Proteinen zugeordnet werden. Die Spots Nummer 9, welches als 14-3-3 ϵ -Protein identifiziert wurde, und Nummer 29, welches dem *Heat shock cognate 71 kDa protein* (Hsc71-Protein) zugeordnet wurde, wurden als Kandidaten für zukünftige funktionelle Analysen ausgesucht.

Hier ist anzumerken, dass auch *in-silico* Analysen der Sekundärstruktur des THAP1-Proteins (ELM-*The Eukaryotic Linear Motif resource for Functional Sites in Proteins*, (67)) eine Konsensussequenz für die Bindung des 14-3-3 ϵ -Proteins im C-terminalen Bereich des THAP1-Proteins vorhersagen konnten (Abbildung 4.29).

Elm Name	Positions	View in Jmol	Elm Description	Cell Compartment	Pattern
LIG_14-3-3_3	162-167 [A]	-	Consensus derived from reported natural interactors which do not match the Mode 1 and Mode 2 ligands.	nucleus, cytosol, internal side of plasma membrane	[RHK][STALV].((ST)). [PESRDIFTQ]

Abbildung 4.29: In-silico Analyse der funktionellen Domänen im THAP1-Protein mit der Internetanwendung ELM.

ELM sucht in Proteindatenbanken nach validierten, linearen Motiven in einer eingegebenen Aminosäuresequenz. In der THAP1-*Coiled-Coil*-Domäne wurde eine Konsensussequenz für die Bindung eines 14-3-3-Proteins vorhergesagt.

Nach der Identifizierung der Proteine Hsc71 und 14-3-3 ϵ als weitere potentielle THAP1-Interaktionspartner soll eine funktionelle Charakterisierung dieser Protein-Protein-Interaktionen von THAP1 folgen.

5 Diskussion

5.1 Der Transkriptionsfaktor THAP1

Das THAP1-Protein ist als Transkriptionsfaktor an verschiedenen regulativen Prozessen in der Zelle beteiligt. Diese basieren hauptsächlich auf der Transkriptionsregulation einer vermutlich hohen Anzahl an Genen, von denen nur wenige bekannt sind. Bei der Suche nach neuen Zielgenen des THAP1-Proteins wurde das DYT1-verursachende *TOR1A*-Gen hypothesenbasiert in die Analysen mit einbezogen. Dies erfolgte aufgrund der klinischen Gemeinsamkeiten zwischen der Dystonie 1 und der Dystonie 6, welche durch Mutationen im *THAP1*-Gen verursacht wird.

5.1.1 THAP1 reguliert spezifisch die Expression des *TOR1A*-Gens (DYT1)

Der erste Teil dieser Arbeit widmete sich der Untersuchung einer THAP1-vermittelten Regulation des *TOR1A*-Gens, welches mit der Dystonie 1 assoziiert ist.

Bei der Dystonie 1 handelt es sich um eine schwere Form der vererbaren, generalisierten Dystonie (105), die durch ein frühes Erkrankungsalter der betroffenen Patienten charakterisiert ist. Gemeinsam mit der Dystonie 6 gehört die Dystonie 1 zu den primären Torsionsdystonien mit einem autosomal-dominanten Erbgang und reduzierter Penetranz (14,19). Im Jahr 1997 konnten Mutationen im *TOR1A*-Gen als Ursache der Dystonie 1 identifiziert werden (106). Das *TOR1A*-Gen ist auf dem langen Arm des Chromosoms 9 lokalisiert (Genlokalisierung: 9q34.1) und kodiert für das TorsinA-Protein, welches zur Familie der AAA+ ATPasen (*ATPases Associated with diverse cellular Activities*) gehört. Das TorsinA-Protein ist hauptsächlich in der Membran des Zellkerns und im Lumen des endoplasmatischen Retikulums lokalisiert und führt eine Vielzahl von Funktionen in der Zelle aus. Hierzu zählen die Unterstützung bei der Proteinfaltung (Chaperon-Funktion) (106,107), die Aufrechterhaltung der Membranarchitektur des Zellkerns (108,109), Zellextension und -adhäsion (110,111), der Transport und die Prozessierung von Proteinen im sekretorischen Weg (15,112,113) und der Schutz vor oxidativem Stress und zellulären Stress durch abnormale Proteine (114-116). Die Mehrzahl der Patienten mit einer Dystonie 1 weist eine GAG-Deletion innerhalb des kodierenden Bereichs des *TOR1A*-Gens auf. Diese Mutation führt zum Verlust eines von zwei Glutamaten innerhalb der konservierten, C-terminalen Region des TorsinA-Proteins (106). Nur wenige andere Mutationen im *TOR1A*-Gen sind als Ursache für die Dystonie 1 bekannt (117-119).

Der erste Schritt dieser Untersuchungen war die Identifizierung und Charakterisierung der *TOR1A*-Promotorregion. Mit Hilfe von *in-silico* Analysen wurde der *TOR1A*-Promotor einem

DNA-Bereich von 977 Basenpaaren (-830 / +147 relativ zum Translationsstartpunkt) zugeordnet. Der *TOR1A*-Kernpromotor wurde anschließend in Luciferase-Reportergen-Analysen durch den Vergleich der relativen Luciferase-Aktivität kürzerer, überlappender Fragmente mit der Aktivität des Vollelänge-Promotors eingegrenzt (Fragment E) (siehe Doktorarbeit Dr. cand. med. Alma Osmanovic und (1)).

Eine spezifische Bindung des THAP1-Proteins an den *TOR1A*-Kernpromotor, welcher zwei Konsensusmotive für eine THAP1-Bindung (THABS) aufweist (37,39), wurde mittels ChIP-Analysen nachgewiesen (siehe Doktorarbeit Dr. cand. med. Alma Osmanovic und (1)). Diese wurden mit dem Chromatin von THAP1-FLAG-transfizierten humanen Neuroblastom-Zellen (SH-SY5Y) und Anti-FLAG-M2-Agarosebeads durchgeführt. Bis zum heutigen Zeitpunkt ist ein kommerziell erhältlicher Antikörper, der die Ansprüche einer ChIP in Bezug auf seine Affinität und Spezifität bei der Erkennung eines an das Chromatin gebundenen Proteins erfüllt, nicht verfügbar. Die Westernblots aller kommerziell erhältlichen Antikörper sowie die Analysen von Gavarini *et al.* (120) zeigten eine für das THAP1-Protein vermeintlich spezifische Bande auf einer Höhe von 25 kDa. Das theoretische Molekulargewicht von THAP1 beträgt zwar 25 kDa, jedoch konnten in verschiedensten von uns durchgeführten Analysen mit Myc-gekoppeltem und GST-gekoppeltem THAP1 beobachtet werden, dass das THAP1-Protein in einem Molekulargewichtsbereich von circa 37 kDa migriert. Unser Kooperationspartner Professor Dr. Laurie J. Ozelius konnte diese Beobachtung bestätigen (persönliche Mitteilung Professor Dr. Laurie J. Ozelius, *Department of Genetics and Genomic Sciences, Mount Sinai School of Medicine, New York, USA*). Diese Zunahme des Molekulargewichts basiert mit großer Wahrscheinlichkeit auf posttranslationalen Modifikationen des THAP1-Proteins (121). Um verlässliche Resultate zu erlangen, haben wir uns daher entschieden, mit FLAG-gekoppeltem THAP1 zu arbeiten. Die Verwendung von überexprimiertem Protein könnte mit Hinblick auf die stöchiometrischen Verhältnisse in der Zelle zu unspezifischen Anreicherungen von Chromatin-Bereichen führen, die im ChIP-Profil von endogen exprimiertem Protein nicht vorhanden wären (122). Zudem ist bei dem Einsatz des FLAG-Tags zu beachten, dass das zur Verlinkung der Proteine mit dem Chromatin verwendete Formaldehyd mit den Aminosäuren Arginin, Cystein, Histidin und vor allem Lysin reagiert (123). Im FLAG-Tag sind zwei Lysine (K) vorhanden (Aminosäuresequenz: DYKDDDDK), so dass es bei der Formaldehyd-Behandlung zu Veränderungen des FLAG-Tags kommen kann, was wiederum die Erkennung des FLAG-Tags durch den anti-FLAG-Antikörper stören könnte (122). Daher ist es wichtig entsprechende Kontrollen mitzuführen. Hierfür wurde zum Einen Chromatin aus mit leerem FLAG-Plasmid transfizierten Zellen mitgeführt und zum Anderen spezifische Primer für nicht-relevante Promotoren in den abschließenden PCRs verwendet.

In Luciferase-Reportergen-Analysen wurde eine spezifische, THAP1-vermittelte Repression des *TOR1A*-Kernpromotors beobachtet. Diese wurde durch fünf Missense-Mutationen in der DNA-bindenden THAP-Domäne partiell bzw. komplett aufgehoben (Abbildung 4.1, (1,2)). Bessière *et al.* haben im Jahr 2008 anhand kristallographischer Untersuchungen gezeigt, dass die Aminosäure an der Position 24 des THAP1-Proteins an der positiv geladenen Oberfläche der THAP-Domäne exponiert wird und essentiell für die DNA-Bindung ist (40). Dies geht einher mit unserer Beobachtung, dass die beiden Missense Mutationen p.H23P und p.P26L zu einem nahezu vollständigen Verlust der THAP1-Aktivität führten. Vermutlich führt der Austausch der Aminosäure Histidin zu einem Prolin an Position 23 bzw. Prolin zu einem Leucin an Position 26 zu einer strukturellen Veränderung des Proteins (124). Die Konsequenz davon ist eine fehlerhafte räumliche Ausrichtung der Aminosäure an Position 24, sodass eine Interaktion mit der DNA stark beeinträchtigt oder sogar verhindert wird. Diese Hypothese wird durch Untersuchungen unterstützt, in denen Bessière und Mitarbeiter zeigen konnten, dass sowohl eine Substitution der ebenfalls unmittelbar angrenzenden Aminosäuren Leucin an Position 27 als auch des Lysins an Position 11 zu einer starken Verminderung der DNA-Bindfähigkeit des THAP1-Proteins führen (40). Zudem wurde gezeigt, dass Mutationen an den Positionen 6, 29 und 32 ebenfalls einen störenden Effekt auf die DNA-Bindfähigkeit induzieren, diese aber nicht vollständig aufheben (40). In aktuellen kalorimetrischen und NMR-Analysen wurde für die beiden Mutationen p.S6F und p.R29Q eine signifikante Abnahme der DNA-Bindeaffinität verglichen zum Wildtyp-Protein nachgewiesen (125). Interessanterweise wurde für die Mutation p.S6F eine destabilisierende Wirkung auf die Proteinfaltung gezeigt. Die Autoren konnten jedoch zeigen, dass eine Destabilisierung der Proteinfaltung und die Abnahme der DNA-Bindeaffinität nicht einhergehen müssen. Somit kann eine mutationsbedingte Veränderung der THAP1-vermittelten Repression des *TOR1A*-Promotors vermutlich auf unterschiedliche funktionelle Auswirkungen der jeweiligen Mutationen zurückgeführt werden. Eine ebenfalls als DYT6-verursachend identifizierte Mutation innerhalb der C-terminalen Region von THAP1 (p.C170R), zeigte keinen Einfluss auf die THAP1-vermittelte Repression des *TOR1A*-Promotors. Diese Beobachtung deutet darauf hin, dass die Missense-Mutation p.C170R keinen Einfluss auf die reprimierende Aktivität des THAP1-Proteins hat. Dies schließt jedoch nicht aus, dass diese Mutation einen Effekt auf eine THAP1-vermittelte Aktivierung eines Zielgens haben könnte. Dies müsste in weiteren Analysen untersucht werden. Des Weiteren könnte diese Missense-Mutation tatsächlich keinen Effekt auf die transkriptionelle THAP1-Aktivität ausüben, sondern andere THAP1-Funktionen, wie z.B. die Bindung an Protein-Bindepartner, beeinflussen. Darüber hinaus könnte diese Analyseemethode nicht geeignet sein, um einen möglicherweise sehr leichten Effekt der Mutation p.C170R auf die THAP1-vermittelte Regulation eindeutig darzustellen.

Da die bisher durchgeführten *in vitro* Analysen artifizielle Systeme repräsentieren, sollte die (patho-)physiologische Auswirkung von THAP1 auf die *TOR1A*-Expression *in vivo* untersucht werden. Hierzu wurden Expressionsanalysen in primären Fibroblasten von Patienten mit jeweils einer Mutation im *THAP1*-Gen (p.L159fs180X oder p.V131fs133X) durchgeführt. Entgegen den in den mittels Luciferase-Reporter-Gen-Analysen beobachteten Ergebnissen, konnte in den primären Fibroblasten mit der jeweiligen DYT6-Mutation keine Veränderung der *TOR1A*-Expression beobachtet werden (siehe Doktorarbeit Dr. cand. med. Nils Uflacker und (1)). Diese unveränderten *TOR1A*-Expressionslevels in den primären Fibroblasten mit DYT6-Mutationen könnten auf gewebespezifischen Effekten des THAP1-Proteins basieren. Hinweise für eine gewebespezifische *THAP1*-Expression liefern nicht nur bereits veröffentlichte Daten verschiedener Arbeitsgruppen (33,41), sondern insbesondere auch die Informationen über den Chromatinstatus im *THAP1*-Promotorbereich (Abbildung 4.2, (59)). Hier kann man je nach untersuchtem Gewebe / Zelltyp einen unterschiedlichen Aufbau der Promotorregion erkennen. So deuten die Enhancer-Regionen und Transkriptionsfaktorbindestellen auf eine heterogene *THAP1*-Expression in den neun untersuchten Zelllinien hin.

Als weitere Kontrolle wurden siRNA-Versuche im Institut für Neurogenetik (Direktorin: Frau Prof. Dr. Christine Klein) durchgeführt. Trotz eines *Knockdowns* von *THAP1* auf mRNA-Ebene von 30 – 50 % bei Transfektion von DYT6-mutationsfreien Fibroblasten mit zwei verschiedenen siRNAs gegen *THAP1* wurde keine Veränderung der *TOR1A*-Expression beobachtet. Interessanterweise waren dahingegen die *THAP1*-Expressionslevels in den primären Fibroblasten mit DYT6-Mutationen im Vergleich zu der Expression in Fibroblasten ohne die DYT6-Mutationen erhöht (siehe Doktorarbeit Dr. Cand. Med. Nils Uflacker und (1)). Die unveränderten *TOR1A*-Expressionslevels sowie die Beobachtung eines Trends zu erhöhten *THAP1*-Expressionslevels in den primären Fibroblasten mit DYT6-Mutationen führten schließlich dazu, dass sich der Fokus der Analysen der hier vorliegenden Arbeit auf den *THAP1*-Promotor und dessen Expression richtete.

5.1.2 Die Autoregulation der *THAP1*-Expression

Für die Charakterisierung des *THAP1*-Promotors wurden im Rahmen dieser Arbeit *in-silico* Analysen durchgeführt, deren Vorhersagen mit den vom ENCODE Projekt Konsortium erhobenen Daten bezüglich der Chromatinstruktur und den vorhergesagten aktiven Promotorbereichen übereinstimmten (59). Bei weiteren Analysen wurden in der *in silico* vorhergesagten Region eine DNase I-hypersensitive Region und Transkriptionsfaktorbindestellen identifiziert. Als DNase I-hypersensitive Regionen werden Chromatinbereiche bezeichnet, die eine sehr geringe Nukleosomen-Dichte aufweisen und

bei Behandlung mit der DNase I gespalten werden können (126). Bereits 1980 wurde die Hypothese aufgestellt, dass DNase I-hypersensitive Regionen zugängliche Bereiche im Chromatin markieren, die wichtig für die Bindung von spezifischen Proteinen sind und somit potentielle regulative Elemente innerhalb des Genoms darstellen (127). Heutzutage wird die DNase I-Behandlung von Chromatin vor Sequenzierungsstudien in großem Maßstab (*Next Generation Sequencing*) durchgeführt, um genomweite DNase I-hypersensitive Regionen als putative aktive Chromatinbereiche zu identifizieren (128-130). Zudem befindet sich im Bereich des *THAP1*-Promotors eine Anreicherung des epigenetischen Markers H3K27Ac (Histon H3 Lysin 27 Acetylierung). Diese Histonmarkierung ist ebenfalls ein Hinweis auf einen aktiven Promotor bzw. auf ein *Enhancer*-Element (131,132). Die Eingrenzung des *THAP1*-Kernpromotors auf eine 480 Basenpaar-umfassende Region erfolgte erneut durch Luciferase-Reportergen-Analysen. Anschließende Sequenzanalysen zeigten fünf THABS-Motive in diesem Bereich. Die spezifische Bindung des THAP1-Proteins an seinen eigenen Kernpromotor wurde mittels ChIP- und EMSA-Analysen nachgewiesen. Auch in diesem Fall wurden die ChIP-Analysen aus den in Abschnitt 5.1.1 aufgeführten Gründen mit dem Chromatin aus THAP1-FLAG-transfizierten SH-SY5Y-Zellen durchgeführt. Da die THABS-Motive in der THAP1-Kernpromotorregion weit verstreut sind, wurden die EMSA-Analysen mit einem 480 Basenpaar-langen Oligonukleotid, das die gesamte Kernpromotorregion überspannte, durchgeführt. Es konnte eine spezifische Interaktion von THAP1 mit dem *THAP1*-Kernpromotor aufgezeigt werden. Das detektierte Signal der Protein-DNA-Komplexe ließ sich trotz unterschiedlicher Optimierungsverfahren nicht als distinkte Bande darstellen, sondern wurde als breiter „Schmier“ detektiert. Diese Tatsache liegt möglicherweise darin begründet, dass insgesamt fünf THABS-Motive und somit fünf potentielle THAP1-Bindestellen im verwendeten Oligonukleotid vorliegen. Zusätzlich sind in dem langen Oligonukleotid, da es einen Kernpromotor repräsentiert, mit großer Wahrscheinlichkeit Bindestellen für viele weitere Proteine (andere Transkriptionsfaktoren und Co-Faktoren) aus dem Kaninchen Retikulozyten-Lysat vorhanden. Diese Interaktionen würden zu unzähligen verschieden großen Protein-DNA-Komplexen führen, die im EMSA wie in diesem Fall als „Schmier“ zu erkennen sind. Bei dieser Methode handelt es sich um ein sehr artifizielles System, in dem das THAP1-Protein in großem Überschuss vorhanden ist und die Zielsequenz als sehr langes, leicht zugängliches DNA-Oligonukleotid vorliegt. Daher können diese Versuchsbedingungen zu einer unspezifischen Interaktion des THAP1-Proteins an DNA-Bereiche führen, an die unter physiologischen Bedingungen keine THAP1-Bindung erfolgen würde. Als zusätzliche Kontrolle könnten kürzere Fragmente der THAP1-Kernpromotorregion mit einem bis zwei THABS-Motiven in EMSAs eingesetzt werden. Darüber hinaus könnte in weiteren Analysen der Einfluss von Mutationen im THABS-Motiv auf die THAP1-Bindung untersucht werden. Hierfür müssten die von Clouaire *et al.* (37) und

Sabogal *et al.* (39) als essentiell identifizierten Basen in der THABS mittels Mutagenese PCRs ausgetauscht werden.

In Luciferase-Reporter-Gen-Analysen konnte die Bindung des THAP1-Proteins an den THAP1-Kernpromotor bestätigt und damit die funktionelle / physiologische Relevanz dieser Interaktion aufgezeigt werden. Die reprimierende Fähigkeit des THAP1-Proteins wurde von den vier Missense-Mutationen p.S6F, p.R13H, p.H23P und p.P26L vollständig aufgehoben (Abbildung 4.8; Erogullari, Seibler *et al.*, in Revision). Im Gegensatz zum vergleichsweise moderaten Effekt der Missense-Mutation p.S6F auf die THAP1-Aktivität bezogen auf den *TOR1A*-Promotor (Abbildung 4.1) induziert diese Missense-Mutation eine komplette Aufhebung der THAP1-vermittelten Repression des *THAP1*-Promotors. Dies lässt darauf schließen, dass die Regulation des *THAP1*-Promotors sensibler gegenüber DYT6-verursachende Mutationen in der DNA-bindenden THAP-Domäne sein könnte als der *TOR1A*-Promotor oder das weitere / unterschiedliche Mechanismen bei der Regulation des *THAP1*-Promotors greifen.

Aufgrund der geringen *THAP1*-Expression in lymphoblastoiden Zellen (33) wurden für die Analysen der *THAP1*-Expression (*in vivo*) iPS-Zellen aus Fibroblasten mit DYT6-verursachenden Mutationen (p.R13H und p.L159fs180X) generiert (Dr. Philip Seibler, Institut für Neurogenetik). Bei der Mutation p.R13H handelt es sich um eine Missense-Mutation in der DNA-bindenden THAP-Domäne, für die in Luciferase-Reporter-Gen-Analysen eine Verminderung der THAP1-vermittelten Repression des *TOR1A*-Promotors (1) und des *THAP1*-Promotors (Abschnitt 4.1.2.3) gezeigt wurde. Die Mutation p.L159fs180X ist eine trunkierende Mutation, die zu einem partiellen Verlust des Kernlokalisierungssignals (NLS, *nuclear localization signal*) im C-terminalen Bereich des THAP1-Proteins führt. Dies hat zur Folge, dass das mutierte THAP1-Protein nicht in den Kern transportiert wird (Abschnitt 4.1.3). Obwohl die direkte Auswirkung dieser beiden Mutationen auf das THAP1-Protein unterschiedlich ist, führen beide Mutationen zu einer verringerten Menge an funktionell aktivem THAP1 im Kern. Die iPS-Zellen wurden anschließend in Neuronen differenziert und stellten so ein optimales System für Expressions- und damit Mutationsanalysen *in vivo* dar. Der Hauptvorteil hierbei ist, dass die Analysen in den von der Dystonie hauptsächlich betroffenen Zellen unter endogenen Expressionsbedingungen durchgeführt werden können. Wie bereits in Fibroblasten mit DYT6-Mutationen, wurde auch in den von iPS-Zellen stammenden Neuronen mit DYT6-Mutationen, eine signifikant erhöhte *THAP1*-Expression verglichen zu den Wildtyp-Neuronen beobachtet. Die *TOR1A*-Expressionslevels waren in den aus iPS-Zellen generierten Neuronen unverändert (Erogullari, Seibler *et al.*, in Revision). Damit konnten die Ergebnisse der THAP1-vermittelten Repression des *THAP1*-Promotors aus den Luciferase-Reporter-Gen-Analysen *in vivo* verifiziert werden. Darüber hinaus lieferten

diese Ergebnisse eine Erklärung zu der unveränderten *TOR1A*-Expression sowohl in den Fibroblasten als auch in den aus iPS-Zellen differenzierten Neuronen mit DYT6-Mutationen. Diese Ergebnisse zeigten erstmalig eine Autoregulation der *THAP1*-Expression durch das THAP1-Protein. Die Autoregulation von Transkriptionsfaktoren stellt einen Mechanismus zur Aufrechterhaltung der basalen, Zell-Zyklus-abhängigen, induzierbaren und Zelltyp-spezifischen Expression dar (133). Dabei handelt es sich um einen Schutzmechanismus zur Kompensation der Fehlregulation von Zielgenen, in diesem Fall der THAP1-Zielgene. Somit könnte bei heterozygoten DYT6-Mutationen die basale Expression des THAP1-Proteins und damit die Expression der spezifischen Zielgene nahezu unverändert aufrechterhalten werden, um so die Fortsetzung wichtiger zellulärer Prozesse zu gewährleisten. In Mäusen wurde eine Autoregulation des Brn3a-Transkriptionsfaktors, welches in peripheren, sensorischen Neuronen exprimiert wird, gezeigt (134). Auch in diesem Fall führt eine geringere Menge an aktivem Brn3a-Protein zu einer Verminderung der Brn3a-vermittelten Repression des *Brn3a*-Gens. Trieu und Mitarbeiter konnten zeigen, dass bei einem *Knock-out* eines der beiden *Brn3a*-Allele in der Maus die transkriptionelle Aktivität des intakten Allels um 80 % erhöht ist und damit die *Brn3a*-Expression ein nahezu basales Level erreicht. Durch die Kompensation dieser Haploinsuffizienz kann die neuronale Entwicklung in der *Knock-out* Maus (*Brn3a*^{+/-}) aufrechterhalten werden. Im Fall der THAP1-Autoregulation handelt es sich ebenfalls um einen Schutzmechanismus, der die Grundlage für ein spätes Erkrankungsalter (Erkrankungsalter der Dystonie 6: von 2 bis 62 Jahren (29)) und eventuell sogar für die reduzierte Penetranz der Dystonie 6 darstellen könnte. Dennoch kann dieser protektive Mechanismus offensichtlich nur für eine bestimmte Zeit aufrechterhalten werden. Vermutlich wird ein biologischer Grenzwert überschritten, der dann zur Manifestierung der Dystonie 6 führt. Dies könnte zum Beispiel auf einer Akkumulierung des mutierten Proteins oder einer verringerten Expression kompensatorischer Co-Faktoren basieren.

5.1.3 Trunkierende Mutationen verhindern den Kerntransport des THAP1-Proteins

Neben verschiedenen Missense-Mutationen, welche zu einer Substitution einzelner Aminosäuren führen, sind auch *THAP1*-Mutationen bekannt, die zu einem vorzeitigen Translationsstopp und damit zu einem verkürzten THAP1-Protein führen. Die Konsequenz dieser trunkierenden Mutationen ist die Veränderung bzw. der Verlust des vorhergesagten Kernlokalisierungssignals (NLS, *nuclear localization sequence*).

Zur Untersuchung des Einfluss' trunkierender *THAP1*-Mutationen auf die zelluläre Lokalisierung wurden GFP-gekoppelte THAP1-Fusionsproteine in humanen OVCAR-3-Zellen überexprimiert und deren Lokalisierung mittels konfokaler *Laser Scanning*

eine nahezu exklusive Kernlokalisierung des THAP1-Proteins. Ein Einfluss des GFP-Fusionstags auf die Lokalisation kann aufgrund der veränderten Eigenschaften des THAP1-GFP-Proteins gegenüber dem endogenen THAP1-Genprodukt nicht vollständig ausgeschlossen werden. Allerdings zeigten die unterschiedlichen THAP1-Proteine eine voneinander abweichende intrazelluläre Verteilung. Zudem ist der GFP-Tag ein etabliertes System für diese Art von Analysen. Daher ist eine durch die GFP-Fusion bedingte unnatürliche Verteilung der Proteine als eher unwahrscheinlich anzunehmen. Der Austausch der aliphatischen Aminosäure Isoleucin an Position 149 zum hydroxylierten Threonin könnte möglicherweise einen konformationsverändernden Einfluss auf diesen Bereich des THAP1-Proteins haben. Diese Konformationsänderung wiederum könnte zu einer veränderten bzw. gestörten Interaktion zwischen dem Kernlokalisierungssignal und dem Importin α führen. Eine Möglichkeit zur weiteren funktionellen Untersuchung wären beispielsweise gezielte Interaktionsstudien des THAP1-Proteins mit dem Importin-Komplex oder auch Analysen zur Auswirkung der Aminosäuren-Substitution auf die Struktur des Kernlokalisierungssignals. Eine weitere Konsequenz dieses Aminosäureaustausches könnte aber auch eine „artifizielle“ posttranslationale Modifikation der Hydroxylgruppe des Threonins sein (Glycosylierung, Phosphorylierung und Acetylierung (141)). Diese könnte eine Maskierung des Kernlokalisierungssignals bewirken und so zu einer sterischen Inhibition für die Interaktion mit dem Importin α -Protein führen.

Da bis zur Fertigstellung dieser Arbeit kein ausreichend spezifischer Antikörper zur Detektion des endogenen THAP1-Genproduktes zur Verfügung stand, konnte nicht eindeutig geklärt werden, ob die hier analysierten trunkierten THAP1-Varianten in der Zelle unter nativen Bedingungen existieren oder bereits auf mRNA-Ebene abgebaut werden. Ein relativ gut charakterisierter posttranskriptioneller Mechanismus, der *Nonsense Mediated Decay* (NMD), schützt die Zelle vor Mutationen, die zu trunkierten, potentiell gefährlichen Proteinen führen könnten, indem ein enzymatischer Abbau der mutationstragenden mRNA eingeleitet wird (142,143). Wenn die Nonsense-Mutation jedoch im letzten Exon des Gens und unter 50 Nukleotiden stromaufwärts zum letzten Intron lokalisiert ist, wird der NMD-Mechanismus umgangen und es kommt zur Expression eines verkürzten Proteins (143-146). Da die untersuchten trunkierenden THAP1-Mutationen p.V131fs133X (c.388_389delTC), p.Q154fs180X (c.460delC) und p.L159fs180X (c.474delA) im letzten Exon des *THAP1*-Gens lokalisiert sind, kann hier von der Expression dieser verkürzten THAP1-Varianten ausgegangen werden. Zudem wurde postuliert, dass Nonsense-Mutationen im 3'-Bereich des zweiten Exons die NMD ebenfalls umgehen können (143,145). Daher ist die Expression der p.F45fs73X-Variante ebenfalls möglich. Da die p.R29X-Mutation (c.85C>T) in der 5'-Region des zweiten Exons lokalisiert ist, könnte diese Variante möglicherweise durch den NMD abgebaut werden. Darüber hinaus wurde die Expression von zwei dieser mutierten

THAP1-Varianten auf mRNA-Ebene im Rahmen der *THAP1*-Expressionsanalysen in den primären Fibroblasten mit der THAP1-Mutationen p.V131fs133X und p.L159fs180X verifiziert (siehe Doktorarbeit Dr. cand. med. Nils Uflacker und (1)).

Zusammengefasst konnte die vorhergesagte Region im THAP1-Protein als funktionelles Kernlokalisierungssignal bestätigt werden. Ferner zeigen die von uns aufgeführten Analysen, dass DYT6-verursachende Mutationen, die zu Veränderungen oder dem Verlust dieses Kernlokalisierungssignals führen, eine Abnahme der Konzentration des THAP1-Transkriptionsfaktors im Zellkern bewirken. Eine Reduktion der THAP1-Menge im Zellkern hätte somit die gleichen physiologischen Konsequenzen wie krankheitsverursachende, Protein-verändernde Mutationen, die zu einer eingeschränkten Transkriptionsfaktor-Aktivität des im Zellkern lokalisierten THAP1-Proteins führen.

5.1.4 Fazit: Erster Teil

Im ersten Teil dieser Arbeit konnte eine Verbindung auf molekularer Ebene zwischen den Dystonien 1 und 6 gezeigt werden. Dabei reprimiert das THAP1-Protein spezifisch die Expression des DYT1-verursachenden *TOR1A*-Gens. Diese molekulare Verbindung, gemeinsam mit einem sehr ähnlichen Phänotyp dieser beiden Dystonietypen unterstützt die Hypothese der Fehlregulation spezifischer Zielgene des THAP1-Proteins als pathophysiologische Ursache der Dystonie 6. Dennoch konnte die in dieser Arbeit nachgewiesene THAP1-vermittelte Repression des DYT1-Gens *TOR1A* unter *in-vivo* Bedingungen nicht verifiziert werden. Daher stellt sich die Frage, ob tatsächlich eine Fehlregulation der *TOR1A*-Expression eine der Ursachen der Dystonie 6 sein kann. In diesem Zusammenhang ist zu erwähnen, dass die häufigste DYT1-Mutation zu einer *Loss-of-function* des Torsin1A-Proteins führt (109,147) und eine verminderte THAP1-Aktivität die Konzentration des TorsinA-Proteins erhöhen würde. Interessanterweise zeigen mehrere Studien, dass auch eine Überexpression des Torsin1A-Proteins zu negativen funktionellen Konsequenzen in der Zelle führen kann (112,148). Dies könnte auf ein hoch sensibles stöchiometrisches Gleichgewicht hindeuten, das bei Veränderungen der Torsin1A-Menge, sei es eine Abnahme oder eine Zunahme, zu einer pathologischen Veränderung in der Zelle führt. Außerdem ist *TOR1A* nur eines von zahlreichen THAP1-Zielgenen, von denen bisher nur wenige bekannt sind. Dies bedeutet, dass eine gestörte THAP1-Funktion die Fehlregulation mehrerer Gene einleiten könnte und daher vermutlich ein kumulativer Effekt zur pathophysiologischen Konsequenz in der Zelle und damit zur Manifestierung der Dystonie 6 führt.

Zusätzlich zu den bereits identifizierten THAP1-Zielgenen konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass der THAP1-Transkriptionsfaktor seinen eigenen Promotor reprimiert. Dabei

verstärken DYT6-verursachende Mutationen im *THAP1*-Gen über einen negativen *Feedback-Loop* die *THAP1*-Expression und stellen damit einen möglichen Schutzmechanismus zur Kompensation der *THAP1*-Konzentration dar. Dieser protektive Mechanismus könnte eine mögliche Erklärung für die meist im späten Lebensalter auftretende Manifestierung und möglicherweise sogar für die reduzierte Penetranz der Dystonie 6 sein.

5.2 THAP1 und seine Protein-Protein-Interaktionen

Die THAP-Domäne des *THAP1*-Proteins repräsentiert die am besten charakterisierte Region dieses Proteins. Sie vermittelt die Fähigkeit zur sequenzspezifischen DNA-Bindung des *THAP1*-Proteins und ist somit Grundlage für dessen Funktion bei der Regulation spezifischer Zielgene. In den letzten Jahren wurde immer wieder die Hypothese aufgestellt, dass Interaktionen mit anderen Proteinen (Transkriptionsfaktoren und Co-Faktoren) und im Besonderen eine *THAP1*-Homodimerisierung eine Voraussetzung oder Unterstützung für die DNA-Bindung über die THAP-Domäne sein könnten (40,91,100,149). Zudem zeigen neueste Analysen, dass neben den zahlreichen Missense-Mutationen innerhalb der THAP-Domäne, die zu einer verringerten *THAP1*-Transkriptionsfaktor-Aktivität führen, ein DYT6-mutationsbedingter Austausch einzelner Aminosäuren innerhalb dieser Domäne nicht zwangsläufig eine verringerte DNA-Bindung induziert (125). Daher widmete sich der zweite Teil dieser Arbeit der Identifizierung und funktionellen Charakterisierung von *THAP1*-Interaktionspartnern. Zum Einen wurde die Bindung des *THAP1*-Proteins an vorhergesagte Bindeproteine untersucht, indem *in-vitro* Untersuchungen mittels *GST-Pulldown*-Analysen oder Hefe-Zwei-Hybrid-Versuchen durchgeführt wurden. Zum Anderen erfolgte ein hypothese freier Ansatz, in dem weitere *THAP1*-Interaktionspartner mittels *GFP-Traps*[®] und anschließenden massenspektrometrischen Analysen identifiziert wurden.

5.2.1 Die Homodimerisierung von THAP1

Zur Charakterisierung der *Coiled-Coil*-Domäne als mögliche Region für die Ausbildung von *THAP1*-Homodimeren und der Eingrenzung der dafür erforderlichen minimalen Interaktionsregion wurden *GST-Pulldown*-Analysen mit *GST*-gekoppeltem *THAP1*-Protein und *in vitro* translatierten, radioaktiv-markierten *THAP1*-Proteinen mit unterschiedlichen Längen durchgeführt (Abbildung 4.16A). Als Kontrolle für die Spezifität der möglichen Interaktionen wurde hierbei immer *GST*-Protein mitgeführt. So konnte eine eindeutige und spezifische *THAP1*-*THAP1*-Interaktion nachgewiesen werden (Erogullari *et al.*, in

Vorbereitung). Die Verwendung sehr stringenter Waschbedingungen (der Waschpuffer enthielt 250 mM NaCl und 0,5 % NP-40) deutete dabei auf eine sehr starke Bindung der THAP1-Proteine hin. Dabei ist jedoch zu erwähnen, dass *Coiled-coil*-Strukturen bekannte Proteinmotive für Protein-Protein-Interaktionen darstellen und eine sehr hohe Affinität zu einander aufweisen (99). In Kombination mit einer hohen Konzentration der zu untersuchenden Proteine könnte es daher zu stärker ausgeprägten Interaktionen als unter physiologischen Bedingungen kommen. Die von uns gezeigten Ergebnisse werden durch Analysen von Sengel *et al.* bestätigt, die ebenfalls starke Hinweise auf eine Dimerisierung des THAP1-Proteins liefern (139).

Durch die Untersuchung der Interaktion zwischen Wildtyp-THAP1 und 13 trunkierten THAP1-Proteinen, konnte die minimale Interaktionsdomäne auf einen Bereich von 47 Aminosäuren (Aminosäuren 139 – 185) eingegrenzt werden (Erogullari *et al.*, in Vorbereitung). Diese Ergebnisse zeigen, dass die von Sengel *et al.* (139) postulierte minimale Interaktionsdomäne (Aminosäuren 154 – 166) für eine THAP1-Homodimerisierung nicht ausreichend ist. Diese von Sengel *et al.* identifizierte Region wird in unseren Analysen durch das D4-Fragment (Abbildung 4.16A) repräsentiert und zeigte als isoliertes Proteinfragment keine Interaktion mit Wildtyp-THAP1. Zudem konnte mit den Fragmenten D1.1 und D2.1 gezeigt werden, dass sowohl N-terminal als auch C-terminal zur von Sengel *et al.* postulierten Interaktionsdomäne gelegene Aminosäuren essentiell für die THAP1-Homodimerisierung sind. Im weiteren Verlauf der Analysen wurde der Einfluss von sechs DYT6-verursachenden Missense-Mutationen (p.M143V, p.I149T, p.H150P, p.A166T, p.R169Q und p.C170R) innerhalb der minimalen Interaktionsdomäne auf die THAP1-THAP1-Interaktion untersucht. Alle Aminosäuren-Seitenketten sind an diesen Positionen evolutionär hoch konserviert (Abbildung 4.17), was auf wichtige funktionelle Bedeutungen hinweist (150). Dennoch zeigte keine dieser Missense-Mutationen einen eindeutigen Effekt auf die THAP1-THAP1-Interaktion (Erogullari *et al.*, in Vorbereitung). Diese Beobachtung könnte dadurch erklärt werden, dass die untersuchten Aminosäuresubstitutionen nur einen geringen Effekt auf die Homodimerisierung von THAP1 haben. Dieser „geringe Effekt“ könnte unter physiologischen Bedingungen trotzdem krankheitsursächlich sein und in Kombination mit weiteren pathologischen Vorgängen oder nach einer gewissen Zeit zur Manifestierung dieser Krankheit führen (spätes Erkrankungsalter). Das hier verwendete *in-vitro* System könnte für solche „geringen Effekte“ nicht sensitiv genug sein und erlaubt nur eindeutige Aussagen bei starken Veränderungen der Interaktionsfähigkeit der analysierten Proteine bzw. Proteinfragmente. Zudem bleibt auch hier zu berücksichtigen, dass *Coiled-Coil*-Motive eine hohe Affinität zueinander aufweisen, die unter den gezeigten Versuchsbedingungen (hohe Proteinkonzentration, Zugänglichkeit der Proteine) einen störenden Einfluss einzelner Aminosäuren auf die THAP1-Interaktionsfähigkeit vollständig tolerieren könnten. Es ist

allerdings auch nicht auszuschließen, dass diese Aminosäuren tatsächlich keinen signifikanten Effekt auf die THAP1-Homodimerisierung ausüben, sondern wichtige Funktionen für die Interaktion zu anderen, noch nicht identifizierten Proteinen übernehmen (151,152).

5.2.2 Die Interaktion von THAP1 mit THAP3

Es ist bekannt, dass die Funktion eines Transkriptionsfaktors häufig abhängig von einer Dimerisierung mit sich selbst bzw. anderen Proteinen aus derselben Proteinfamilie ist (153,154). Interessanterweise weisen alle zwölf Mitglieder der THAP-Proteinfamilie eine C-terminale *Coiled-Coil*-Domäne auf (Abbildung 4.20A). Daher lag die Vermutung nahe, dass es eine mögliche Interaktion zwischen THAP1 und weiteren Mitgliedern dieser Proteinfamilie geben könnte. Da THAP1 und THAP3 ähnliche Expressionsprofile aufweisen, einen gemeinsamen Interaktionspartner (41) und zudem eine große Ähnlichkeit in ihrer Primärstruktur haben (Abbildung 4.20B), wurde in dieser Arbeit eine mögliche Interaktion zwischen diesen beiden THAP-Proteinen untersucht. Hierfür wurden *GST-Pulldown*-Analysen mit GST-gekoppeltem THAP1 bzw. THAP3 durchgeführt. Entsprechend der Fragestellung wurde *in vitro* hergestelltes, radioaktiv-markiertes THAP1- oder THAP3-Protein in die *Pulldowns* eingesetzt (Abschnitt 4.2.2.1). So wurde eine eindeutige Interaktion zwischen dem THAP1- und THAP3-Protein nachgewiesen. Da es sich hierbei ebenfalls hauptsächlich um eine *Coiled-Coil*-Interaktion handelt, konnte wie erwartet gezeigt werden, dass die THAP1-THAP3-Heterodimerisierung von der minimalen Interaktionsdomäne (Fragment 7, Abbildung 4.16) innerhalb der *Coiled-Coil*-Domäne des THAP1-Proteins vermittelt wird (Erogullari *et al.*, in Vorbereitung).

Interessanterweise konnte die THAP3-Interaktionsdomäne in Hefe-Zwei-Hybrid-Analysen im Rahmen dieser Arbeit nicht näher eingegrenzt werden. Bei der Untersuchung einer möglichen Interaktion zwischen Wildtyp-THAP1 und der THAP3-THAP-Zink Finger-Domäne (Aminosäuren 1 – 89) bzw. *Coiled-Coil*-Domäne (Aminosäure 181 – 236), wurde eine Interaktion zu beiden Domänen nachgewiesen. Ob es sich bei diesen Beobachtungen um ein versuchsbedingtes Artefakt oder eine tatsächliche THAP1-Interaktion über zwei unabhängige Domänen innerhalb des THAP3-Proteins handelt, konnte im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit nicht aufgeklärt werden. Hierzu müssten weitere Analysen in unterschiedlichen methodischen Verfahren zur Charakterisierung der THAP3-Interaktionsdomäne durchgeführt werden. Darüber hinaus wurde der Einfluss der Missense-Mutationen p.M143V, p.I149T, p.H150P, p.A166T, p.R169Q und p.C170R im THAP1-Protein und p.R160W, p.R219C und DelExon4 im THAP3-Protein auf die Ausbildung des THAP1-THAP3-Heterodimers analysiert (Abbildung 4.23 und Abbildung 4.24.). Die Mutation

DelExon4 ist eine Deletion des Exons 4 im *THAP3*-Gen und führt zu keiner Veränderung der *Coiled-coil*-Domäne. In den hier durchgeführten Analysen konnte erneut für keine der Mutationen ein eindeutiger Effekt auf die THAP1-THAP3-Interaktion festgestellt werden (Erogullari *et al.*, in Vorbereitung). Wie bereits bei den funktionellen Analysen zum Einfluss DYT6-verursachender Mutationen auf die THAP1-Homodimerisierung können auch diese Ergebnisse auf Limitierungen des verwendeten Verfahrens oder auf zu geringe Effekte der analysierten Mutationen auf die Heterodimerisierung zurückgeführt werden. Ebenso kann auch hier nicht ausgeschlossen werden, dass die untersuchten Missense-Mutationen keinen Effekt auf die THAP1-THAP3-Heterodimerisierung haben, da diese Aminosäuren wichtig für andere Funktionen bzw. andere Protein-Protein-Interaktionen des THAP1-Proteins sein können.

Die Interaktion des THAP1-Proteins mit THAP3 stellt einen möglichen Mechanismus zur Regulation der Transkriptionsfaktor-Aktivität dar. Beispiele in der Literatur zeigen Transkriptionsfaktoren, deren Funktion, wie z.B. die Regulation der Zelldifferenzierung oder -proliferation, durch die Dimerisierung mit speziellen Interaktionspartnern definiert wird (155). Die Dimerisierung von THAP-Proteinen repräsentiert ebenfalls ein mögliches regulatives Element. Dabei könnte die Zusammensetzung der THAP-Protein-Dimere die Erkennung verschiedener Zielsequenzen einleiten, aber auch regulatorische Eigenschaften, wie Repression oder Aktivierung, definieren. Das Modell zur Spezifität dieser THAP-THAP-Dimerisierung wird auch durch die Beobachtung unterstützt, dass wir in unseren Analysen keine Homodimerisierung von THAP3 nachweisen konnten.

Neben der Interaktion von THAP-Proteinen untereinander repräsentiert die Integration in andere Proteinkomplexe ein wichtiges funktionelles Element in der Regulation der Transkriptionsfaktor-Aktivität. So konnte bereits gezeigt werden, dass sowohl THAP1 als auch THAP3 mit dem HCF-1-Protein, einem Zellzyklus-Faktor und potenten Transkriptions-Co-Faktor, interagieren. In funktionellen Analysen wurde gezeigt, dass ein Verlust der HCF-1-Bindestelle (HBM-Motiv) innerhalb des THAP3-Proteins zu einer Aufhebung der Transkriptionsfaktor-Aktivität führt. Erste Ergebnisse derzeit laufender Analysen in unserer Arbeitsgruppe bestätigten die ebenfalls von Mazars *et al.* gezeigte Interaktion von THAP1 mit HCF-1 (41) (Daten nicht gezeigt). Interessanterweise gibt es in dem als THAP1-HCF-1-Interaktionsregion identifizierten HBM-Motiv drei DYT6-verursachende Mutationen. Der Einfluss dieser Missense-Mutationen im HBM-Motiv auf die THAP1-HCF-1-Interaktion ist ebenfalls Gegenstand derzeit laufender Analysen.

5.2.3 Die Interaktion von THAP1 mit HDAC3

Die Aktivität von Transkriptionsfaktoren wird häufig über eine Interaktion mit anderen Faktoren reguliert. So wurde bereits gezeigt, dass die Interaktion mit der Histondeacetylase 3 (HDAC3) essentiell für die von THAP7- und dem murinen THAP-Protein Ronin-vermittelte Repression ist (103,104). Der in dieser Arbeit untersuchte Transkriptionsfaktor THAP1 konnte sowohl mit der Aktivierung, als auch mit der Repression von Ziel promotoren assoziiert werden (1,33). Die in unserer Arbeitsgruppe ermittelten Daten heben die THAP1-vermittelte Repression hervor. Da über den molekularen Mechanismus der THAP1-vermittelten Repression bisher wenig bekannt ist, wurde die mögliche Interaktion von THAP1 mit Histondeacetylase untersucht. Hierzu wurde nicht nur die mögliche Bindung von THAP1 an HDAC3, sondern auch eine Interaktion mit dem funktionell und strukturell sehr ähnlichen HDAC1-Protein analysiert.

In GST-Pulldown-Analysen konnte eine eindeutige THAP1-HDAC3-Interaktion nachgewiesen werden. Dahingegen wurde keine eindeutige Bindung des THAP1-Proteins an HDAC1 beobachtet (Abbildung 4.25, Erogullari *et al.*, in Vorbereitung). Die Bindung von HDAC1 an das GST-Protein oder die Agarosematrix basiert vermutlich auf unspezifischen Wechselwirkungen, die auf einer hohen Proteinkonzentration und artifizierender Versuchsbedingungen in diesem *in-vitro* System basieren. Obwohl HDAC1 und HDAC3 zu derselben HDAC-Klasse gehören und sehr große strukturelle Ähnlichkeiten aufweisen, beträgt die Konservierung der Aminosäuresequenz „nur“ circa 53 %. Trotz einiger gemeinsamer Bindeproteine weisen die beiden HDAC-Proteine auch Unterschiede bezüglich ihrer Interaktionspartner, Expressionen und Funktionen in der Zelle auf. Des Weiteren konnten Immunpräzipitationsanalysen belegen, dass HDAC3 im Gegensatz zu HDAC1 meist in großen Protein-Komplexen integriert vorliegt (156,157).

In den in der hier vorliegenden Arbeit durchgeführten Hefe-Zwei-Hybrid-Versuchen konnte die THAP1-HDAC3-Interaktion verifiziert werden. Darüber hinaus wurde die THAP-Domäne des THAP1-Proteins als essentielle Region für diese Interaktion identifiziert (Abbildung 4.26, Erogullari *et al.*, in Vorbereitung). Interessanterweise wurde die THAP-Domäne im THAP7- und Ronin-Protein ebenfalls als die Interaktion-vermittelnde Domäne für die Bindung an HDAC3 identifiziert (103,104). Da die THAP-Domäne in den 12 Mitgliedern der THAP-Familie evolutionär hoch konserviert ist (38), sollte eine mögliche Interaktion von weiteren THAP-Proteinen mit HDAC3 in anschließenden Analysen untersucht werden.

Die nachgewiesene Interaktion von THAP1 mit HDAC3 liefert erste Einblicke in einen möglichen molekularen Mechanismus der THAP1-vermittelten Transkriptionsrepression. Die DNA-Bindefähigkeit des THAP1-Proteins wird über die THAP-Domäne vermittelt. Aus aktuellen Studien geht jedoch hervor, dass die DYT6-verursachende und in der THAP-Domäne lokalisierten Missense Mutationen p.Y8C (88), p.N12K (96) und p.F81L (31) keinen

Einfluss auf die DNA-Bindeaffinität des THAP1-Proteins haben (125). Diese Missense-Mutationen könnten somit einen störenden Effekt auf die THAP1-HDAC3-Interaktion, die über die THAP-Domäne vermittelt wird, haben und somit wiederum zu einer Reduktion der THAP1-vermittelten Repression führen. Derzeit laufende Analysen in unserer Arbeitsgruppe untersuchen bereits den Einfluss verschiedener Missense-Mutationen in der THAP-Domäne auf die THAP1-HDAC3-Interaktion.

Dieses Modell der THAP1-vermittelten transkriptionellen Repression stimmt mit dem bereits beschriebenen Modell für das THAP7-Protein überein. Neben dem HDAC3-Protein spielt ein weiterer Co-Faktor, das NCoR- (Nuclear hormone receptor corepressor-) Protein, eine wichtige Rolle in der THAP7-vermittelten Repression (103). Somit könnte eine funktionelle Assoziation mit dem NCoR-Protein einen weiteren Mechanismus zur Regulation der THAP1-vermittelten Repression darstellen.

5.2.4 Die Interaktion von THAP1 mit Hsc71 bzw. 14-3-3ε

Der Nachweis der Interaktion von THAP1 mit THAP3 und HDAC3 zeigt die wichtige Funktion verschiedener Protein-Protein-Wechselwirkungen bei der Regulation der THAP1-Aktivität(en). Aus diesem Grund sollten im Rahmen dieser Arbeit weitere THAP1-Interaktionspartner identifiziert und charakterisiert werden. Hierfür wurde eine spezielle Methode der Ko-Immunpräzipitation von GFP-gekoppelten Proteinen, die sogenannten *GFP-Traps*[®] (83), verwendet. *GFP-Traps*[®] sind kommerziell erhältliche (Chromotek), rekombinant hergestellte, GFP-bindende Proteine, die an Agarosebeads immobilisiert sind. Diese rekombinanten Proteine wurden von den Antikörpern des Lamas (Familie der *Camelidae*) abgeleitet und weisen nur die schwere Kette eines Antikörpers auf. Dadurch zerfallen diese GFP-bindenden Proteine nicht wie konventionelle Antikörper unter denaturierenden Bedingungen in ihre schweren und leichten Ketten, die im ungünstigsten Fall auf Höhe des zu untersuchenden Proteins im SDS-Polyacrylamidgel laufen. Zudem weisen sie eine sehr hohe Spezifität gegenüber ihrem Antigen (in diesem Fall GFP) auf (158).

Für eine möglichst optimale Expression des THAP1-GFP-Fusionproteins bzw. GFP-Proteins sollten zunächst stabil-transfizierte Zellen verwendet werden. Hierfür wurden humane Neuroblastom-Zellen (SH-SY5Y) verwendet, die aufgrund ihres Neuronen-ähnlichen Ursprungs ein physiologisch relevantes System zur Untersuchung DYT6-assoziiierter Fragestellungen darstellen. Die stabile Transfektion der SH-SY5Y-Zellen mit THAP1-GFP bzw. GFP war erfolgreich (Daten nicht gezeigt, Durchführung: Dr. Aleksandar Rakovic und M.Sc. Karen Freimann, Institut für Neurogenetik). Jedoch wiesen die THAP1-GFP-SH-SY5Y schon nach wenigen Tagen auffällige Veränderungen in ihrem Wachstumsverhalten und ihrer Morphologie auf. Daher wurden für die *GFP-Traps*[®] transient transfizierte SH-SY5Y-

Zellen verwendet, deren Transfektionseffizienz mittels Fluoreszenzmikroskopie untersucht wurde und mindestens 80 % betrug.

Obwohl *GFP-Traps*® ein sehr etabliertes System zur Präzipitation von GFP-gekoppelten Proteinen darstellen, wäre eine Präzipitation des endogenen THAP1-Proteins bzw. der Protein-Komplexe die optimale Methode für diese Fragestellung. Denn eine endogene Proteinexpression und damit einhergehend eine spezifische Stöchiometrie der Zusammensetzung von Proteinkomplexen ist oft eine Voraussetzung für spezifische Protein-Protein-Interaktionen (159). Eine Überexpression einzelner Komponenten dieser Komplexe kann zu einer artifiziellen Zusammensetzung einzelner Proteinkomplexe führen, die zu einer Identifizierung falsch-positiver Interaktionspartner oder dem Verlust anderer Protein-Protein-Komplexe bzw. Interaktionspartner führen könnte. Da jedoch, wie bereits erwähnt, zum Zeitpunkt der Ausführung dieser Arbeit kein ausreichend spezifischer Antikörper erhältlich war, wurden diese Analysen mit GFP-gekoppeltem THAP1-Protein und den *GFP-Traps*® durchgeführt.

Die *GFP-Traps*® wurden nach Protokoll durchgeführt (Abschnitt 3.2.6.2) und die präzipitierten Proteine nach ihrem isoelektrischen Punkt (erste Dimension) und ihrem Molekulargewicht (zweite Dimension) mittels zweidimensionaler-Gelelektrophorese aufgetrennt (80). Als Negativkontrolle wurde das GFP-Protein mitgeführt. So konnten alle übereinstimmenden *Spots* in den beiden 2D-Gelen nach der zweidimensionalen Auftrennung des THAP1-GFP- und GFP-Ansatzes (Abbildung 4.28) auf unspezifische Protein-Bindungen an das GFP-Protein oder an die Agarosebeads und auf das GFP-Protein selbst zurückgeführt werden. Die nicht überlappenden Protein-*Spots* wurden ausgestanzt und die Proteine mittels Massenspektrometrie analysiert (160). Zehn der 31 ausgestanzten *Spots* konnten eindeutig den folgenden humanen Proteinen zugeordnet werden: Myosin light peptide 6; 14-3-3ε; Tropomyosin alpha-1 chain; 60S acidic ribosomal protein P0-like; Tropomodulin-3; Actin, cytoplasmic 2; Tubulin beta chain; Tubulin alpha-1B chain; Heat shock cognate 71 kDa protein; Alpha-actinin-4 (Erogullari *et al.*, in Vorbereitung).

Sieben dieser eindeutig identifizierten Proteine (Myosin light peptide 6; Tropomyosin alpha-1 chain; Tropomodulin-3; Actin, cytoplasmic 2; Tubulin beta chain; Tubulin alpha-1B chain; Alpha-actinin-4) sind Bestandteile des Zytoskeletons. Mit Hinblick auf die funktionelle Assoziation des TorsinA-Proteins mit dem Zytoskeletton (161) und der Identifizierung von Mutationen im *TUBB4*-Gen, das für das Tubulin-Protein *tubulin beta-4A chain* kodiert, als genetische Ursache für die Dystonie 4 (DYT4) (23,24), könnten diese identifizierten Proteine potentielle Interaktionspartner des THAP1-Proteins darstellen. Dies soll Gegenstand zukünftiger Untersuchungen dieser Arbeitsgruppe werden.

Von den bereits bekannten THAP1-Interaktionspartnern (THAP3, HDAC3, HCF-1) war keines unter den identifizierten Proteinen. Im Fall des über 200 kDa großen HCF-1-Proteins

und des basischen Zinkfinger-Proteins THAP3 (isoelektrischer Punkt: 10,26) liegt es sehr wahrscheinlich daran, dass die beiden Proteine aufgrund ihrer biochemischen Eigenschaften unter den Versuchsbedingungen der 2D-Gelelektrophorese nicht detektiert werden konnten. Denn die Auftrennung der Proteine erfolgte in einem Molekulargewichtsbereich von 10 bis 200 kDa und einem pH-Bereich von pH 4 bis 7 (Abbildung 4.28). Bezüglich des HDAC3-Proteins könnte es sein, dass die Interaktion zu schwach ist, sodass eine Detektion unter diesen „stringenten“ Bedingungen nicht möglich war oder das Protein zu den nicht identifizierbaren *Spots* gehört. Zudem könnte die Überexpression des THAP1-Proteins zu einer unnatürlichen Proteinzusammensetzung in der Zelle geführt haben, die die Ausbildung einiger Proteinkomplexe erschwert bzw. unterbindet. Möglicherweise könnte der C-terminale GFP-Tag des THAP-GFP-Fusionsproteins einen (leichten) Einfluss auf die Proteinkonformation haben, sodass einige Protein-Bindungen nicht stattfinden können.

Zunächst wurden zwei Proteine als interessante Kandidaten für weitere funktionelle Analysen eingestuft: das *Heat shock cognate 71 kDa protein* (Hsc71) und das 14-3-3 ϵ -Protein. Das Hsc71-Protein gehört zur *Heat shock protein-70* (HSP70)-Familie, wird konstitutiv exprimiert und ist als molekulares Chaperon-Protein für eine Reihe von zellulären Prozessen verantwortlich. Unter anderem ist das Hsc71-Protein zuständig für die Faltung von naszierenden Polypeptiden (162), die Translokation des Transkriptionsfaktors Nf κ B in den Nukleus (163), den Schutz von Proteinen bei Zellstress (164) und die negative Regulation der Transkription (165,166). Darüber hinaus wurde das Hsc71-Protein in massenspektrometrischen Analysen als potentieller Interaktionspartner des THAP3-Proteins identifiziert (41). Des Weiteren zeigten funktionelle Studien von Lefebvre *et al.* eine O-verlinkte N-Acetylglukosamin-(O-GlcNAc-) spezifische Lektin-Aktivität des Hsc71-Proteins (167). Die ebenfalls bekannte funktionelle Verbindung zwischen THAP3 und der O-GlcNAc Transferase (OGT) führte somit zu der Hypothese, dass die Proteine HCF-1, OGT und Hsc71 die Kern-Bestandteile eines funktionellen Protein-Komplexes, in dem das THAP3-Protein involviert ist, darstellen (41). Interessanterweise konnte sowohl von unserer Arbeitsgruppe (Daten nicht gezeigt) als auch von Mazars und seinen Mitarbeitern (41) eine Interaktion von THAP1 mit HCF-1 aufgezeigt werden. Diese direkte Bindung von HCF-1 an THAP1 führt zusätzlich zu einer Rekrutierung des OGT-Proteins (168). Daher könnte die hier identifizierte Interaktion zwischen THAP1 und Hsc71 ein Hinweis auf einen größeren funktionellen Proteinkomplex sein. Erste Analysen zur Ausbildung größerer THAP1-assoziiierter Proteinkomplexe sind Gegenstand derzeit laufender und zukünftiger Projekte der Arbeitsgruppe Kaiser / Lohmann.

Der zweite in diesen Analysen identifizierte potentielle Interaktionspartner des THAP1-Proteins ist das 14-3-3 ϵ -Protein. Dieses Protein gehört zur 14-3-3-Proteinfamilie, die sich in

Säugetieren aus sieben Isoformen (β , γ , ϵ , η , ζ , σ , and τ/θ) zusammensetzt. Die 14-3-3-Proteine weisen eine ubiquitäre Expression auf, wobei die höchste 14-3-3-Expression im Gehirn nachgewiesen wurde (169). Diese Expressionsanalysen beziehen sich auf die gesamte 14-3-3-Proteinfamilie, da aktuell keine spezifischen Daten zur 14-3-3- ϵ -Expression vorhanden sind. Derzeit ist bekannt, dass 14-3-3-Proteine an spezifische Phospho-Serin- und Phospho-Threonin-Motive von über 200 verschiedenen Proteinen binden und damit an der Regulation zahlreicher, verschiedener zellulärer Prozesse beteiligt sind (169-171), zu denen die Signaltransduktion (172), der Zell-Zyklus (173), die Transkription (174), die Apoptose (175) und die Neuronale Entwicklung (176) gehören. Interessanterweise wurde für das 14-3-3 ϵ -Protein gezeigt, dass es die beiden Klasse II Histondeacetylasen HDAC4 und HDAC5 spezifisch über drei Phospho-Serin-Motive bindet und deren Retention im Zytoplasma vermittelt. Durch die Bindung des 14-3-3 ϵ -Proteins werden die Kernlokalisierungssignale von HDAC4 und 5 maskiert, sodass ein Rücktransport durch den Importin- α : β -Komplex nicht stattfinden kann. Damit werden HDAC4 und 5 davon abgehalten, im Nukleus mit HDAC3 zu interagieren und eine transkriptionelle Repression einzuleiten. Sobald die Bindung des 14-3-3 ϵ -Proteins von den HDAC-Proteinen aufgehoben wird, werden diese wieder in den Nukleus transportiert und führen dort ihre Funktion als transkriptionelle Repressoren aus (177-179).

In *in-silico* Analysen der funktionellen Domänen im THAP1-Protein mit der Internet Anwendung ELM (The Eukaryotic Linear Motif resource for Functional Sites in Proteins, (67)) wurde eine Aminosäuren-Region identifiziert, die eine Übereinstimmung mit den bekannten 14-3-3-Konsensusmotiven (170,180) aufweist (Abbildung 4.29). Diese vorhergesagte 14-3-3-Konsensussequenz überspannt den Aminosäurenbereich 162 – 167 des THAP1-Proteins und liegt somit unmittelbar angrenzend an das Kernlokalisierungssignal (NLS, Aminosäuren 147 – 162). Eine Bindung des 14-3-3 ϵ -Proteins würde somit eine eventuelle Maskierung des Kernlokalisierungssignals bewirken, wodurch ein gerichteter Transport von THAP1 in den Zellkern gestört bzw. inhibiert werden könnte. Hier ist zu erwähnen, dass verschiedene Arbeitsgruppen das THAP1-Protein in einigen Zellen sowohl im Zellkern, als auch im Zytoplasma nachweisen konnten (139,140). Der Mechanismus der zytoplasmatischen THAP1-Lokalisation ist noch unbekannt. Die 14-3-3- ϵ -Bindung an THAP1 stellt daher ein sehr vielversprechendes Modell zur Klärung dieses Mechanismus dar und soll in Anschlussarbeiten weiter analysiert werden. Hierzu soll der Einfluss des 14-3-3- ϵ -Proteins auf die intrazelluläre Lokalisation von THAP1 mittels Immunfluoreszenzfärbung in humanen Zellen untersucht werden. Darüber hinaus wurde in Mutationsanalysen von DYT6-Patienten die Missense-Mutation p.A166T im vorhergesagten 14-3-3-Konsensusmotiv identifiziert (¹⁶²KLKTAQ¹⁶⁷). Eine Veränderung innerhalb dieser Bindestelle könnte somit die Interaktion

stören und zu einer fehlerhaften Verteilung von THAP1 führen. Diese Fehlverteilung von THAP1 in der Zelle könnte möglicherweise krankheitsursächlich sein.

5.2.5 Fazit: Zweiter Teil

Der zweite Teil dieser Arbeit beschäftigte sich mit den Protein-Protein-Interaktionen des THAP1-Proteins. Die spezifische Interaktion mit verschiedenen Proteinen bzw. die Einbindung in spezielle Proteinkomplexe stellt einen wichtigen Mechanismus zur Regulation der Aktivität von Transkriptionsfaktoren dar. Sie erlaubt bzw. ermöglicht eine entwicklungs- und zelltypspezifische Regulation der Expression spezifischer Gene. Das THAP1-Protein besitzt verschiedene funktionelle Domänen, die putative Protein-Interaktionsmotive darstellen. So konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die C-terminale *Coiled-Coil*-Region des THAP1-Proteins sowohl verantwortlich für die THAP1-Homodimerisierung, als auch für eine Interaktion zu einem weiteren Mitglied der THAP-Proteinfamilie, dem THAP3-Protein, ist. Ob DYT6-verursachende Mutationen die Ausbildung dieser Protein-Protein-Interaktionen verändern, konnte nicht eindeutig aufgeklärt werden und bedarf weiterer Untersuchungen. Bisherige Analysen des N-terminal gelegenen THAP-Zinkfingers des THAP1-Proteins beschränkten sich bisher ausschließlich auf dessen DNA-bindende Eigenschaften. Die in dieser Arbeit dargestellten und diskutierten Ergebnisse zeigen erstmalig die über die THAP-Domäne vermittelte Bindung eines Co-Faktors, dem HDAC3-Protein. Zusätzlich konnten zehn weitere potentielle THAP1-Interaktionspartner identifiziert werden, von denen zunächst Hsc71 und 14-3-3 ϵ in anschließenden funktionellen Analysen untersucht werden sollen. Während *in-silico* Analysen eine vorhergesagte Binderegion für das 14-3-3 ϵ -Protein identifizieren konnten, liegen uns bisher keine Daten zur Eingrenzung der minimalen Interaktionsregion mit dem Hsc71-Protein vor. Sieben der zehn als potentielle THAP1-Interaktionspartner identifizierten Proteine sind Bestandteile des Zytoskeletons und sollen ebenfalls in Anschlussarbeiten untersucht werden. Denn aktuelle Publikationen zeigen eine funktionelle Verbindung von zwei Dystonie-Typen (Dystonie 1 und Dystonie 4) mit dem Zytoskeletton. Darüber hinaus könnte die Charakterisierung dieser potentiellen Protein-Protein-Interaktionen Aufschlüsse über die nachgewiesene zytoplasmatische Lokalisierung des THAP1-Proteins liefern.

Die hier vorliegende Arbeit konnte somit verschiedene Protein-Protein-Interaktionen von THAP1 nachweisen und funktionell charakterisieren bzw. einordnen. Die gezeigten Ergebnisse heben die wichtige Funktion einer dynamischen und variablen Einbindung in verschiedene Protein-Komplexe zur Regulation und Definition der THAP1-Aktivitäten bzw. -Funktionen hervor. DYT6-verursachende Mutationen, welche die Interaktion zu spezifischen Bindeproteinen verändern, ermöglichen somit einen Einblick in wichtige

pathophysiologische Prozesse und bilden die Grundlage zu einem besseren molekularen Verständnis der Dystonie 6.

5.3 Ausblick

Die im Rahmen dieser Arbeit erhobenen Daten zur Charakterisierung des THAP1-Proteins liefern neue Einblicke in die molekulare Grundlage der Dystonie 6. Für ein umfangreicheres Verständnis der pathophysiologischen Ursache der Dystonie 6 ist die Erweiterung der hier gewonnenen Erkenntnisse Gegenstand laufender und zukünftiger Projekte.

Dabei liegt ein Schwerpunkt auf der Identifizierung weiterer Zielgene des THAP1-Transkriptionsfaktors. Hierzu sollen ChIP-Seq-Analysen durchgeführt werden, welche eine hypothesenfreie, genomweite Untersuchung der Bindung von THAP1 ermöglichen und somit Rückschlüsse auf THAP1-regulierte Gene zulassen. Dieses Verfahren konnte bisher aufgrund eines fehlenden geeigneten Antikörpers nicht durchgeführt werden. Mit der Identifizierung weiterer THAP1-Zielgene könnten direkte Zusammenhänge zu definierten zellulären Prozessen aufgedeckt werden, die in DYT6-Patienten fehlerhaft ablaufen.

Der zweite Schwerpunkt liegt auf der Identifizierung und funktionellen Charakterisierung weiterer THAP1-Interaktionspartner. So könnten wichtige Mechanismen zur Regulation der THAP1-Aktivität, wie z.B. der Unterscheidung der THAP1-Funktion als Aktivator oder Repressor, aufgeklärt werden. Zudem könnten bekannte Co-Faktoren Aufschluss über den Mechanismus der THAP1-vermittelten Regulation neu identifizierter Zielgene liefern. Durch Expressionsanalysen zur Charakterisierung der gewebespezifischen Expression von THAP1 und seinen Protein-Bindepartnern könnten überlappende Expressionsprofile aufgedeckt werden. Dies wiederum könnte zu neuen Erkenntnissen bezüglich der intrazellulären THAP1-Lokalisation, die in einigen Zellen auf den Nukleus beschränkt ist und in anderen Zellen sowohl im Nukleus, als auch im Zytoplasma nachgewiesen wurde, führen. Darüber hinaus soll der pathophysiologische Effekt von Mutationen, deren Einfluss auf die THAP1-Funktion(en) noch nicht charakterisiert ist, weiter untersucht und aufgeklärt werden. Zudem liefert die hier gezeigte molekulare Verbindung der Dystonie 1 und 6 erste Hinweise für eine mögliche Vernetzung verschiedener Dystonien auf molekularer Ebene. Die Identifizierung weiterer Dystonie-assoziiierter THAP1-Zielgene und die Charakterisierung der funktionellen Assoziation unterschiedlicher Dystonie-Typen würden somit Rückschlüsse auf gemeinsame molekulare Grundlagen liefern und damit die Basis für zukünftige Therapieansätze darstellen.

6 Literaturverzeichnis

1. Kaiser,F.J., Osmanovic,A., Rakovic,A., Erogullari,A., Uflacker,N., Braunholz,D., Lohnau,T., Orolicki,S., Albrecht,M., Gillessen-Kaesbach,G., *et al.* (2010) The dystonia gene DYT1 is repressed by the transcription factor THAP1 (DYT6). *Ann Neurol.*, **68**, 554-559.
2. Schneider,S.A., Ramirez,A., Shafiee,K., Kaiser,F.J., Erogullari,A., Bruggemann,N., Winkler,S., Bahman,I., Osmanovic,A., Shafa,M.A., *et al.* (2011) Homozygous THAP1 mutations as cause of early-onset generalized dystonia. *Mov. Disord.*, **26**, 858-861.
3. Osmanovic,A., Dendorfer,A., Erogullari,A., Uflacker,N., Braunholz,D., Rakovic,A., Vierke,G., Gil-Rodriguez,C., Munchau,A., Albrecht,M., *et al.* (2011) Truncating mutations in THAP1 define the nuclear localization signal. *Mov. Disord.*, **26**, 1565-1567.
4. Fahn,S. (1988) Concept and classification of dystonia. *Adv Neurol.*
5. Breakefield,X.O., Blood,A.J., Li,Y., Hallett,M., Hanson,P.I., Standaert,D.G. (2008) The pathophysiological basis of dystonias. *Nat Rev Neurosci*, **9**, 222-234.
6. Quartarone,A., Rizzo,V., Organte,F. (2008) Clinical features of dystonia: a pathophysiological revisitation. *Curr Opin Neurol*, **21**, 484-490.
7. Standaert,D.G. (2011) Update on the pathology of dystonia. *Neurobiology of Disease*, **42**, 148-151.
8. Geyer,H.L., Bressman,S.B. (2006) The diagnosis of dystonia. *The Lancet Neurology*, **5**, 780-790.
9. Epidemiological Study of Dystonia in Europe (ESDE) Collaborative Group (2000) A prevalence study of primary dystonia in eight European countries. *J Neurol*, **247**, 787-792.
10. Atai,N.A., Ryan,S.D., Kothary,R., Breakefield,X.O., Nery,F.C. (2012) Untethering the nuclear envelope and cytoskeleton: biologically distinct dystonias arising from a common cellular dysfunction. *Int J Cell Biol.*
11. de Carvalho Aguiar,P.M., Ozelius,L.J. (2002) Classification and genetics of dystonia. *The Lancet Neurology*, **1**, 316-325.
12. Tanabe,L.M., Kim,C.E., Alagem,N., Dauer,W.T. (2009) Primary dystonia: molecules and mechanisms. *Nat Rev Neurol*, **5**, 598-609.
13. Müller,U. (2009) The monogenic primary dystonias. *Brain*, **132**, 2005-2025.
14. Brüggemann,N., Klein,C. (2010) Genetics of Primary Torsion Dystonia. *Current Neurology and Neuroscience Reports*, **10**, 199-206.
15. Hewett,J.W., Tannous,B., Niland,B.P., Nery,F.C., Zeng,J., Li,Y., Breakefield,X.O. (2007) Mutant torsinA interferes with protein processing through the secretory pathway in DYT1 dystonia cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **104**, 7271-7276.

16. Waite,A., De Rosa,M.C., Brancaccio,A., Blake,D.J. (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**, 1246-1258.
17. Wider,C., Melquist,S., Hauf,M., Solida,A., Cobb,S.A., Kachergus,J.M., Gass,J., Coon,K.D., Baker,M., Cannon,A., *et al.* (2008) Study of a Swiss dopa-responsive dystonia family with a deletion in GCH1: redefining DYT14 as DYT5. *Neurology*, **70**, 1377-1383.
18. Weber,Y.G., Kamm,C., Suls,A., Kempfle,J., Kotschet,K., Schule,R., Wuttke,T.V., Maljevic,S., Liebrich,J., Gasser,T., *et al.* (2011) Paroxysmal choreoathetosis/spasticity (DYT9) is caused by a GLUT1 defect. *Neurology*, **77**, 959-964.
19. Bragg,D.C., Armata,I.A., Nery,F.C., Breakefield,X.O., Sharma,N. (2011) Molecular pathways in dystonia. *Neurobiology of Disease*, **42**, 136-147.
20. Fuchs,T., Saunders-Pullman,R., Masuho,I., Luciano,M.S., Raymond,D., Factor,S., Lang,A.E., Liang,T.W., Trosch,R.M., White,S., *et al.* (2012) Mutations in GNAL cause primary torsion dystonia. *Nat Genet*, **advance online publication**.
21. Xiao,J., Uitti,R.J., Zhao,Y., Vemula,S.R., Perlmutter,J.S., Wszolek,Z.K., Maraganore,D.M., Auburger,G., Leube,B., Lehnhoff,K., LeDoux,M.S. (2012) Mutations in CIZ1 cause adult onset primary cervical dystonia. *Ann Neurol.*, **71**, 458-469.
22. Charlesworth,G., Plagnol,V., Holmström,K.M., Bras,J., Sheerin,U.M., Preza,E., Rubio-Agusti,I., Ryten,M., Schneider,S.A., Stamelou,M., *et al.* (2012) Mutations in ANO3 Cause Dominant Craniocervical Dystonia: Ion Channel Implicated in Pathogenesis. *The American Journal of Human Genetics*, **91**, 1041-1050.
23. Hersheson,J., Mencacci,N.E., Davis,M., MacDoanld,H.N., Trabzuni,D., Ryten,M., Pittman,A., Paudel,R., Kara,E., Fawcett,K., *et al.* (2013) Mutations in the autoregulatory domain of beta-tubulin 4a cause hereditary dystonia. *Ann Neurol.*, n/a.
24. Lohmann,K., Wilcox,R.A., Winkler,S., Ramirez,A., Rakovic,A., Park,J.S., Arns,B., Lohnau,T., Groen,J., Kasten,M., *et al.* (2013) Whispering dysphonia (DYT4 dystonia) is caused by a mutation in the TUBB4 gene. *Ann Neurol.*, n/a.
25. Hallett,M. (2004) Dystonia: abnormal movements result from loss of inhibition. *Adv Neurol*, **94**, 1-9.
26. Tarsy,D., Simon,D.K. (2006) Dystonia. *N Engl J Med*, **355**, 818-829.
27. Tagliati,M., Shils,J., Sun,C., Alterman,R. (2004) Deep brain stimulation for dystonia. *Expert Rev Med Dev*, **1**, 33-41.
28. Vidailhet,M., Vercueil,L., Houeto,J.L., Krystkowiak,P., Lagrange,C., Yelnik,J.m., Bardinnet,E., Benabid,A.L., Navarro,S., Dormont,D., *et al.* (2007) Bilateral, pallidal, deep-brain stimulation in primary generalised dystonia: a prospective 3 year follow-up study. *The Lancet Neurology*, **6**, 223-229.
29. Blanchard,A., Ea,V., Roubertie,A., Martin,M., Coquart,C., Claustres,M., Beroud,C., Collod-Beroud,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**, 1213-1224.
30. Almasy,L., Bressman,S.B., Raymond,D., Kramer,P.L., Greene,P.E., Heiman,G.A., Ford,B., Yount,J., de Leon,D., Chouinard,S., *et al.* (1997) Idiopathic torsion dystonia linked to chromosome 8 in two Mennonite families. *Ann Neurol.*, **42**, 670-673.
 31. Fuchs,T., Gavarini,S., Saunders-Pullman,R., Raymond,D., Ehrlich,M.E., Bressman,S.B., Ozelius,L.J. (2009) Mutations in the THAP1 gene are responsible for DYT6 primary torsion dystonia. *Nat Genet*, **41**, 286-288.
 32. Girard,J.P., Amalric,F., Roussigne,M., Clouaire,T. (2010) United States.
 33. 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**, 584-594.
 34. 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**, 2432-2442.
 35. 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 in Biochemical Sciences*, **28**, 66-69.
 36. Lee,C.C., Mul,Y.M., Rio,D.C. (1996) The Drosophila P-element KP repressor protein dimerizes and interacts with multiple sites on P-element DNA. *Molecular and Cellular Biology*, **16**, 5616-5622.
 37. 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. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **102**, 6907-6912.
 38. Gervais,V., Campagne,S., Durand,J., Muller,I., Milon,A. (2013) NMR studies of a new family of DNA binding proteins: the THAP proteins. *J Biomol NMR*, 1-13.
 39. Sabogal,A., Lyubimov,A.Y., Corn,J.E., Berger,J.M., Rio,D.C. (2010) THAP proteins target specific DNA sites through bipartite recognition of adjacent major and minor grooves. *Nat Struct Mol Biol*, **17**, 117-123.
 40. Bessiere,D., Lacroix,C., Campagne,S., Ecochard,V., Guillet,V., Mourey,L., Lopez,F., Czaplicki,J., Demange,P., Milon,A., *et al.* (2008) Structure-Function Analysis of the THAP Zinc Finger of THAP1, a Large C2CH DNA-binding Module Linked to Rb/E2F Pathways. *J Biol Chem*, **283**, 4352-4363.
 41. Mazars,R., Gonzalez-de-Peredo,A., Cayrol,C., Lavigne,A.C., Vogel,J.L., Ortega,N., Lacroix,C., Gautier,V., Huet,G., Ray,A., *et al.* (2010) The THAP-Zinc Finger Protein THAP1 Associates with Coactivator HCF-1 and O-GlcNAc Transferase. *Journal of Biological Chemistry*, **285**, 13364-13371.
 42. Sells,S.F., Han,S.S., Muthukkumar,S., Maddiwar,N., Johnstone,R., Boghaert,E., Gillis,D., Liu,G., Nair,P., Monnig,S., *et al.* (1997) Expression and function of the leucine zipper protein Par-4 in apoptosis. *Molecular and Cellular Biology*, **17**, 3823-3832.

43. Park,S.K., Nguyen,M.D., Fischer,A., Luke,M.P.-S., Affar,E.B., Dieffenbach,P.B., Tseng,H.C., Shi,Y., Tsai,L.H. (2005) Par-4 Links Dopamine Signaling and Depression. *Cell*, **122**, 275-287.
44. Guertin,M.J., Lis,J.T. (2012) *Current Opinion in Genetics & Development* in press.
45. Lorch,Y., LaPointe,J.W., Kornberg,R.D. (1987) Nucleosomes inhibit the initiation of transcription but allow chain elongation with the displacement of histones. *Cell*, **49**, 203-210.
46. Han,M., Grunstein,M. (1988) Nucleosome loss activates yeast downstream promoters in vivo. *Cell*, **55**, 1137-1145.
47. Strahl,B.D., Allis,C.D. (2000) The language of covalent histone modifications. *Nature*, **403**, 41-45.
48. Schübeler,D., MacAlpine,D.M., Scalzo,D., Wirbelauer,C., Kooperberg,C., van Leeuwen,F., Gottschling,D.E., O'Neill,L.P., Turner,B.M., Delrow,J., *et al.* (2004) The histone modification pattern of active genes revealed through genome-wide chromatin analysis of a higher eukaryote. *Genes & Development*, **18**, 1263-1271.
49. Kim,T.H., Barrera,L.O., Qu,C., Van Calcar,S., Trinklein,N.D., Cooper,S.J., Luna,R.M., Glass,C.K., Rosenfeld,M.G., Myers,R.M., Ren,B. (2005) Direct isolation and identification of promoters in the human genome. *Genome Research*, **15**, 830-839.
50. Trinklein,N.D., Aldred,S.J.F., Saldanha,A.J., Myers,R.M. (2003) Identification and Functional Analysis of Human Transcriptional Promoters. *Genome Research*, **13**, 308-312.
51. Tsai,F.T.F., Sigler,P.B. (2000) Structural basis of preinitiation complex assembly on human Pol II promoters. *EMBO J*, **19**, 25-36.
52. Ranish,J.A., Hahn,S. (1996) Transcription: basal factors and activation. *Current Opinion in Genetics & Development*, **6**, 151-158.
53. Müller,R. (1995) Transcriptional regulation during the mammalian cell cycle. *Trends in Genetics*, **11**, 173-178.
54. Krivega,I., Dean,A. (2012) Enhancer and promoter interactions: long distance calls. *Current Opinion in Genetics & Development*, **22**, 79-85.
55. Marsman,J., Horsfield,J.A. (2012) Long distance relationships: Enhancer-GC-promoter communication and dynamic gene transcription. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms*, **1819**, 1217-1227.
56. Maston,G.A., Evans,S.K., Green,M.R. (2006) Transcriptional regulatory elements in the human genome. *Annu Re Genomics Hum Genet*, **7**, 29-59.
57. Murayama,A., Kim,M.S., Yanagisawa,J., Takeyama,K., Kato,S. (2004) Transrepression by a liganded nuclear receptor via a bHLH activator through co-regulator switching. *EMBO J*, **23**, 1508-1608.
58. Kolovos,P., Knoch,T., Grosveld,F., Cook,P., Papantonis,A. (2012) Enhancers and silencers: an integrated and simple model for their function. *Epigenetics & Chromatin*, **5**, 1.

59. ENCODE Project Consortium (2012) An integrated encyclopedia of DNA elements in the human genome. *Nature*, **489**, 57-74.
60. Neph,S., Stergachis,A., Reynolds,A., Sandstrom,R., Borenstein,E., Stamatoyannopoulos,J. (2012) Circuitry and Dynamics of Human Transcription Factor Regulatory Networks. *Cell*, **150**, 1274-1286.
61. Tupler,R., Perini,G., Green,M.R. (2001) Expressing the human genome. *Nature*, **409**, 832-833.
62. Wolfe,S.A., Neklodova,L., Pabo,C.O. (2000) DNA recognition by Cys2His2 zinc finger proteins. *Annu Rev Biophys Biomol Struct*, **29**, 183-212.
63. Ganss,B., Jheon,A. (2004) Zinc Finger Transcription Factors in Skeletal Development. *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine*, **15**, 282-297.
64. Laemmli,U. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-685.
65. Bottenstein,J.E. (1985) *Cell Culture in the Neurosciences*. Plenum Press: New York and London.
66. Johe,K.K., Hazel,T.G., Muller,T., Dugich-Djordjevic,M.M., McKay,R.D. (1996) Single factors direct the differentiation of stem cells from the fetal and adult central nervous system. *Genes Dev*, **10**, 3129-3140.
67. Dinkel,H., Michael,S., Weatheritt,R.J., Davey,N.E., Van Roey,K., Altenberg,B., Toedt,G., Uyar,B., Seiler,M., Budd,A., *et al.* (2012) ELM - the database of eukaryotic linear motifs. *Nucleic Acids Research*, **40**, D242-D251.
68. Altschul,S.F., Madden,T.L., Schäffer,A.A., Zhang,J., Zhang,Z., Miller,W., Lipman,D.J. (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research*, **25**, 3389-3402.
69. Graham,F.L., van der Eb,A.J. (1973) A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA. *Virology*, **52**, 456-467.
70. Tang,X., Nakata,Y., Li,H.O., Zhang,M., Gao,H., Fujita,A., Sakatsume,O., Ohta,T., Yokoyama,K. (1994) The optimization of preparations of competent cells for transformation of E.coli. *Nucleic Acids Research*, **22**, 2857-2858.
71. Ito,H., Fukuda,Y., Murata,K., Kimura,A. (1983) Transformation of intact yeast cells treated with alkali cations. *Journal of Bacteriology*, **153**, 163-168.
72. Schiestl,R.H., Gietz,R.D. (1989) High efficiency transformation of intact yeast cells using single stranded nucleic acids as a carrier. *Current Genetics*, **15**, 339-346.
73. Hill,J., Donald,K.A.I., Griffiths,D.E. (1991) DMSO-enhanced whole cell yeast transformation. *Nucleic Acids Research*, **19**, 5791.
74. Gietz,D., Jean,A.S., Woods,R.A., Schiestl,R.H. (1992) Improved method for high efficiency transformation of intact yeast cells. *Nucleic Acids Research*, **20**, 1425.
75. Sanger,F., Nicklen,S., Coulson,A.R. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, **573**, 13-40.

76. Chomczynski,P., Sacchi,N. (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical Biochemistry*, **162**, 156-159.
77. Schneider,S., Buchert,M., Hovens,C.M. (1996) An in vitro assay of beta-galactosidase from yeast. *Biotechniques*, **20**, 960-962.
78. Smith,D.B., Johnson,K.S. (1988) Single-step purification of polypeptides expressed in Escherichia coli as fusions with glutathione S-transferase. *Gene*, **67**, 31-40.
79. Bradford,M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, **72**, 248-254.
80. Klose,J. (1975) Protein mapping by combined isoelectric focusing and electrophoresis of mouse tissues. A novel approach to testing for induced point mutations in mammals. *Humangenetik*, **26**, 231-243.
81. Orlando,V. (2000) Mapping chromosomal proteins in vivo by formaldehyde-crosslinked-chromatin immunoprecipitation. *Trends in Biochemical Sciences*, **25**, 99-104.
82. Feinberg,A.P., Vogelstein,B. (1983) A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Analytical Biochemistry*, **132**, 6-13.
83. Rothbauer,U., Zolghadr,K., Muyldermans,S., Schepers,A., Cardoso,M.C., Leonhardt,H. (2008) A Versatile Nanotrap for Biochemical and Functional Studies with Fluorescent Fusion Proteins. *Molecular & Cellular Proteomics*, **7**, 282-289.
84. Brymora,A., Valova,V.A., Robinson,P.J. (2001) *Current Protocols in Cell Biology*. John Wiley & Sons, Inc..
85. Fields,S., Song,O.k. (1989) A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature*, **340**, 245-246.
86. Chien,C.T., Bartel,P.L., 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. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **88**, 9578-9582.
87. Miller,J.H. (1972) Experiments in Molecular Genetics: Assay of β -Galactosidase. *Cold Spring Harbor*.
88. Houlden,H., Schneider,S.A., Paudel,R., Melchers,A., Schwingenschuh,P., Edwards,M., Hardy,J., Bhatia,K.P. (2010) THAP1 mutations (DYT6) are an additional cause of early-onset dystonia. *Neurology*, **74**, 846-850.
89. Lohmann,K., Uflacker,N., Erogullari,A., Lohnau,T., Winkler,S., Dendorfer,A., Schneider,S.A., Osmanovic,A., Svetel,M., Ferbert,A., et al. (2012) Identification and functional analysis of novel THAP1 mutations. *Eur J Hum Genet*, **20**, 171-175.
90. Paisan-Ruiz,C., Ruiz-Martinez,J., Ruibal,M., Mok,K.Y., Indakoetxea,B., Gorostidi,A., Masso,J.F.M. (2009) Identification of a novel THAP1 mutation at R29 amino-acid residue in sporadic patients with early-onset dystonia. *Mov. Disord.*, **24**, 2428-2429.
91. Bonetti,M., Barzaghi,C., Brancati,F., Ferraris,A., Bellacchio,E., Giovanetti,A., Ialongo,T., Zorzi,G., Piano,C., Petracca,M., et al. (2009) Mutation screening of the DYT6/THAP1 gene in Italy. *Mov. Disord.*, **24**, 2424-2427.

92. Heintzman,N.D., Hon,G.C., Hawkins,R.D., Kheradpour,P., Stark,A., Harp,L.F., Ye,Z., Lee,L.K., Stuart,R.K., Ching,C.W., *et al.* (2009) Histone modifications at human enhancers reflect global cell-type-specific gene expression. *Nature*, **459**, 108-112.
93. Ernst,J., Kheradpour,P., Mikkelsen,T.S., Shores,N., Ward,L.D., Epstein,C.B., Zhang,X., Wang,L., Issner,R., Coyne,M., *et al.* (2011) Mapping and analysis of chromatin state dynamics in nine human cell types. *Nature*, **473**, 43-49.
94. Ernst,J., Kellis,M. (2012) ChromHMM: automating chromatin-state discovery and characterization. *Nat Meth*, **9**, 215-216.
95. Zittel,S., Moll,C.K.E., Brüggemann,N., Tadic,V., Hamel,W., Kasten,M., Lohmann,K., Lohnau,T., Winkler,S., Gerloff,C., *et al.* (2010) Clinical neuroimaging and electrophysiological assessment of three DYT6 dystonia families. *Mov. Disord.*, **25**, 2405-2412.
96. Bressman,S.B., Raymond,D., Fuchs,T., Heiman,G.A., Ozelius,L.J., Saunders-Pullman,R. (2009) Mutations in THAP1 (DYT6) in early-onset dystonia: a genetic screening study. *The Lancet Neurology*, **8**, 441-446.
97. Djarmati,A., Schneider,S.A., Lohmann,K., Winkler,S., Pawlack,H., Hagenah,J., Brüggemann,N., Zittel,S., Fuchs,T., Rakovic,A., *et al.* (2009) Mutations in THAP1 (DYT6) and generalised dystonia with prominent spasmodic dysphonia: a genetic screening study. *The Lancet Neurology*, **8**, 447-452.
98. Xiao,J., Zhao,Y., Bastian,R.W., Perlmutter,J.S., Racette,B.A., Tabbal,S.D., Karimi,M., Paniello,R.C., Wszolek,Z.K., Uitti,R.J., *et al.* (2010) Novel THAP1 sequence variants in primary dystonia. *Neurology*, **74**, 229-238.
99. Burkhard,P., Stetefeld,J., Strelkov,S.V. (2001) Coiled coils: a highly versatile protein folding motif. *Trends Cell Biol*, **11**, 82-88.
100. Campagne,S., Saurel,O., Gervais,V., Milon,A. (2010) Structural determinants of specific DNA-recognition by the THAP zinc finger. *Nucleic Acids Research*, **38**, 3466-3476.
101. Söhn,A.S., Glöckle,N., Doetzer,A.D., Deuschl,G., Felbor,U., Topka,H.R., 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**, 1982-1986.
102. Cheng,F.B., Wan,X.H., Feng,J.C., Wang,L., Yang,Y.M., Cui,L.Y. (2011) Clinical and genetic evaluation of DYT1 and DYT6 primary dystonia in China. *European Journal of Neurology*, **18**, 497-503.
103. 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. *Journal of Biological Chemistry*, **280**, 7346-7358.
104. Dejosez,M., Krumenacker,J.S., Zitur,L.J., Passeri,M., Chu,L.F., Songyang,Z., Thomson,J.A., Zwaka,T.P. (2008) Ronin Is Essential for Embryogenesis and the Pluripotency of Mouse Embryonic Stem Cells. *Cell*, **133**, 1162-1174.
105. Bressman,S.B., Sabatti,C., Raymond,D., de Leon,D., Klein,C., Kramer,P.L., Brin,M.F., Fahn,S., Breakefield,X., Ozelius,L.J., Risch,N.J. (2000) The DYT1 phenotype and guidelines for diagnostic testing. *Neurology*, **54**, 1746-1752.

106. Ozelius,L.J., Hewett,J.W., Page,C.E., Bressman,S.B., Kramer,P.L., Shalish,C., deLeon,D., Brin,M.F., Raymond,D., Corey,D.P., *et al.* (1997) The early-onset torsion dystonia gene (DYT1) encodes an ATP binding protein. *Nature Genetics*, **17**, 40-48.
107. McLean,P.J., Kawamata,H., Shariff,S., Hewett,J., Sharma,N., Ueda,K., Breakefield,X.O., Hyman,B.T. (2002) TorsinA and heat shock proteins act as molecular chaperones: suppression of alpha-synuclein aggregation. *Journal of Neurochemistry*, **83**, 846-854.
108. Naismith,T.V., Heuser,J.E., Breakefield,X.O., Hanson,P.I. (2004) TorsinA in the nuclear envelope. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **101**, 7612-7617.
109. Goodchild,R.E., Kim,C.E., Dauer,W.T. (2005) Loss of the Dystonia-Associated Protein TorsinA Selectively Disrupts the Neuronal Nuclear Envelope. *Neuron*, **48**, 923-932.
110. Hewett,J.W., Zeng,J., Niland,B.P., Bragg,D.C., Breakefield,X.O. (2006) Dystonia-causing mutant torsinA inhibits cell adhesion and neurite extension through interference with cytoskeletal dynamics. *Neurobiology of Disease*, **22**, 98-111.
111. Ferrari-Toninelli,G., Paccioletti,S., Francisconi,S., Uberti,D., Memo,M. (2004) TorsinA negatively controls neurite outgrowth of SH-SY5Y human neuronal cell line. *Brain Research*, **1012**, 75-81.
112. Torres,G.E., Sweeney,A.L., Beaulieu,J.M., Shashidharan,P., Caron,M.G. (2004) Effect of torsinA on membrane proteins reveals a loss of function and a dominant-negative phenotype of the dystonia-associated DeltaE-torsinA mutant. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **101**, 15650-15655.
113. Misbahuddin,A., Placzek,M.R., Taanman,J.W., Gschmeissner,S., Schiavo,G., Cooper,J.M., Warner,T.T. (2005) Mutant torsinA, which causes early-onset primary torsion dystonia, is redistributed to membranous structures enriched in vesicular monoamine transporter in cultured human SH-SY5Y cells. *Mov. Disord.*, **20**, 432-440.
114. Shashidharan,P., Paris,N., Sandu,D., Karthikeyan,L., McNaught,K.S., Walker,R.H., Olanow,C.W. (2004) Overexpression of torsinA in PC12 cells protects against toxicity. *Journal of Neurochemistry*, **88**, 1019-1025.
115. Kuner,R., Teismann,P., Trutzel,A., Naim,J., Richter,A., Schmidt,N., von Ahsen,O., Bach,A., Ferger,B., Schneider,A. (2003) TorsinA protects against oxidative stress in COS-1 and PC12 cells. *Neuroscience Letters*, **350**, 153-156.
116. Hewett,J., Ziefer,P., Bergeron,D., Naismith,T., Boston,H., Slater,D., Wilbur,J., Schuback,D., Kamm,C., Smith,N., *et al.* (2003) TorsinA in PC12 cells: Localization in the endoplasmic reticulum and response to stress. *J. Neurosci. Res.*, **72**, 158-168.
117. Calakos,N., Patel,V.D., Gottron,M., Wang,G., Tran-Viet,K.N., Brewington,D., Beyer,J.L., Steffens,D.C., Krishnan,R.R., Zuchner,S. (2010) Functional evidence implicating a novel TOR1A mutation in idiopathic, late-onset focal dystonia. *J Med Genet*, **47**, 646-650.
118. Zirn,B., Grundmann,K., Huppke,P., Puthenparampil,J., Wolburg,H., Riess,O., Muller,U. (2008) Novel TOR1A mutation p.Arg288Gln in early-onset dystonia (DYT1). *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, **79**, 1327-1330.

119. Leung,J.C., Klein,C., Friedman ,J., Vieregge,P., Jacobs,H., Doheny,D., Kamm,C., deLeon,D., Pramstaller,P.P., Penney,J.B., *et al.* (2001) Novel mutation in the TOR1A (DYT1) gene in atypical early onset dystonia and polymorphisms in dystonia and early onset parkinsonism. *neurogenetics*, **3**, 133-143.
120. Gavarini,S., Cayrol,C., Fuchs,T., Lyons,N., Ehrlich,M.E., Girard,J.P., Ozelius,L.J. (2010) Direct interaction between causative genes of DYT1 and DYT6 primary dystonia. *Ann Neurol.*, **68**, 549-553.
121. Parker,C.E., Mocanu,V., Mocanu,M., Dicheva,N., Warren,M.R. (2012) In Alzate,O. (ed.), *Neuroproteomics*. CRC Press.
122. Brinkman,A.B., Stunneberg,H.G. (2009) In Ferguson-Smith,A.C., Grealley,J.M., Martienssen,R.A. (eds.), Springer Science+Business Media, New York, pp. 3-16.
123. Metz,B., Kersten,G.F., Hoogerhout,P., Brugghe,H.F., Timmermans,H.A., de Jong,A., Meiring,H., ten Hove,J., Hennink,W.E., Crommelin,D.J., Jiskoot,W. (2004) Identification of formaldehyde-induced modifications in proteins: reactions with model peptides. *J Biol Chem*, **279**, 6235-6243.
124. Choi,E.J., Mayo,S.L. (2006) Generation and analysis of proline mutants in protein G. *Protein Engineering Design and Selection*, **19**, 285-289.
125. Campagne,S., Muller,I., Milon,A., Gervais,V. (2012) Towards the classification of DYT6 dystonia mutants in the DNA-binding domain of THAP1. *Nucleic Acids Research*, **40**, 9927-9940.
126. He,H.H., Meyer,C.A., Chen,M.W., Jordan,V.C., Brown,M., Liu,X.S. (2012) Differential DNase I hypersensitivity reveals factor-dependent chromatin dynamics. *Genome Research*, **22**, 1015-1025.
127. Wu,C. (1980) The 5' ends of Drosophila heat shock genes in chromatin are hypersensitive to DNase I. *Nature*, **286**, 854-860.
128. Ling,G., Sugathan,A., Mazor,T., Fraenkel,E., Waxman,D.J. (2010) Unbiased, Genome-Wide In Vivo Mapping of Transcriptional Regulatory Elements Reveals Sex Differences in Chromatin Structure Associated with Sex-Specific Liver Gene Expression. *Molecular and Cellular Biology*, **30**, 5531-5544.
129. John,S., Sabo,P.J., Thurman,R.E., Sung,M.H., Biddie,S.C., Johnson,T.A., Hager,G.L., Stamatoyannopoulos,J.A. (2011) Chromatin accessibility pre-determines glucocorticoid receptor binding patterns. *Nat Genet*, **43**, 264-268.
130. Siersbaek,R., Nielsen,R., John,S., Sung,M.H., Baek,S., Loft,A., Hager,G.L., Mandrup,S. (2011) Extensive chromatin remodelling and establishment of transcription factor 'hotspots' during early adipogenesis. *EMBO J*, **30**, 1459-1472.
131. Heintzman,N.D., Hon,G.C., Hawkins,R.D., Kheradpour,P., Stark,A., Harp,L.F., Ye,Z., Lee,L.K., Stuart,R.K., Ching,C.W., *et al.* (2009) Histone modifications at human enhancers reflect global cell-type-specific gene expression. *Nature*, **459**, 108-112.
132. Woo,Y.H., Li,W.H. (2012) Evolutionary Conservation of Histone Modifications in Mammals. *Molecular Biology and Evolution*, **29**, 1757-1767.
133. Bateman,E. (1998) Autoregulation of eukaryotic transcription factors. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol*, **60**, 133-168.

134. Trieu,M., Ma,A., Eng,S.R., Fedtsova,N., Turner,E.E. (2003) Direct autoregulation and gene dosage compensation by POU-domain transcription factor Brn3a. *Development*, **130**, 111-121.
135. Robbins,J., Dilworth,S.M., Laskey,R.A., Dingwall,C. (1991) Two interdependent basic domains in nucleoplasmin nuclear targeting sequence: Identification of a class of bipartite nuclear targeting sequence. *Cell*, **64**, 615-623.
136. Matsuura,Y., Stewart,M. (2005) Nup50/Npap60 function in nuclear protein import complex disassembly and importin recycling. *EMBO J*, **24**, 3681-3689.
137. Gorlich,D., Kostka,S., Kraft,R., Dingwall,C., Laskey,R.A., Hartmann,E., Prehn,S. (1995) Two different subunits of importin cooperate to recognize nuclear localization signals and bind them to the nuclear envelope. *Curr Biol*, **5**, 383-392.
138. Ding,Q., Zhao,L., Guo,H., Zheng,A. (2010) The nucleocytoplasmic transport of viral proteins. *Viol. Sin.*, **25**, 79-85.
139. Sengel,C., Gavarini,S., Sharma,N., Ozelius,L.J., Bragg,D.C. (2011) Dimerization of the DYT6 dystonia protein, THAP1, requires residues within the coiled-coil domain. *Journal of Neurochemistry*, **118**, 1087-1100.
140. Zhao,Y., Xiao,J., Gong,S., Clara,J.A., LeDoux,M.S. (2012) Neural expression of the transcription factor THAP1 during development in rat. *Neuroscience*.
141. Mukherjee,S., Hao,Y.H., Orth,K. (2007) A newly discovered post-translational modification -- the acetylation of serine and threonine residues. *Trends in Biochemical Sciences*, **32**, 210-216.
142. Byers,P.H. (2002) Killing the messenger: new insights into nonsense-mediated mRNA decay. *J Clin Invest*, **109**, 3-6.
143. Neu-Yilik,G., Amthor,B., Gehring,N.H., Bahri,S., Paidassi,H., Hentze,M.W., Kulozik,A.E. (2011) Mechanism of escape from nonsense-mediated mRNA decay of human beta-globin transcripts with nonsense mutations in the first exon. *RNA*, **17**, 843-854.
144. Nagy,E., Maquat,L.E. (1998) A rule for termination-codon position within intron-containing genes: when nonsense affects RNA abundance. *Trends in Biochemical Sciences*, **23**, 198-199.
145. Thermann,R., Neu-Yilik,G., Deters,A., Frede,U., Wehr,K., Hagemeyer,C., Hentze,M.W., Kulozik,A.E. (1998) Binary specification of nonsense codons by splicing and cytoplasmic translation. *EMBO J*, **17**, 3484-3494.
146. Carter,M.S., Li,S., Wilkinson,M.F. (1996) A splicing-dependent regulatory mechanism that detects translation signals. *EMBO J*, 5965-5975.
147. Breakefield,X.O., Kamm,C., Hanson,P.I. (2001) TorsinA: Movement at Many Levels. *Neuron*, **31**, 9-12.
148. Grundmann,K., Reischmann,B., Vanhoutte,G., Hübener,J., Teismann,P., Hauser,T.K., Bonin,M., Wilbertz,J., Horn,S., Nguyen,H.P., *et al.* (2007) Overexpression of human wildtype torsinA and human DeltaGAG torsinA in a transgenic mouse model causes phenotypic abnormalities. *Neurobiology of Disease*, **27**, 190-206.

149. Rual,J.F., Venkatesan,K., Hao,T., Hirozane-Kishikawa,T., Dricot,A., Li,N., Berriz,G.F., Gibbons,F.D., Dreze,M., Ayivi-Guedehoussou,N., *et al.* (2005) Towards a proteome-scale map of the human protein-protein interaction network. *Nature*.
150. Dokholyana,N.V., Mirnya,L.A., Shakhnovich,E.I. (2002) Understanding conserved amino acids in proteins. *Physica A*, **314**, 600-606.
151. Wu,K.C., Bryan,J.T., Morasso,M.I., Jang,S.I., Lee,J.H., Yang,J.M., Marekov,L.N., Parry,D.A.D., Steinert,P.M. (2000) Coiled-Coil Trigger Motifs in the 1B and 2B Rod Domain Segments Are Required for the Stability of Keratin Intermediate Filaments. *Molecular Biology of the Cell*, **11**, 3539-3558.
152. Tauchi,T., Miyazawa,K., Ohyashiki,K., Toyama,K. (1996) A coiled-coil tetramerization domain of BCR-ABL is essential for the interactions of SH2-containing signal transduction molecules. *Human Cell*, 333-336.
153. Klemm,J.D., Schreiber,S.L., Crabtree,G.R. (1998) Dimerization as a regulatory mechanism in signal transduction. *Annu. Rev. Immunol.*, **16**, 569-592.
154. Marianayagam,N.J., Sunde,M., Matthews,J.M. (2004) The power of two: protein dimerization in biology. *Trends in Biochemical Sciences*, **29**, 618-625.
155. Amoutzias,G.D., Robertson,D.L., Van de Peer,Y., Oliver,S.G. (2008) Choose your partners: dimerization in eukaryotic transcription factors. *Trends in Biochemical Sciences*, **33**, 220-229.
156. de Ruijter,A.J., van Gennip,A.H., Caron,H.N., Kemp,S., van Kuilenburg,A.B. (2003) Histone deacetylases (HDACs): characterization of the classical HDAC family. *Biochem J*, **370**, 737-749.
157. Yang,W.M., Tsai,S.C., Wen,Y.D., Fejer,G., Seto,E. (2002) Functional Domains of Histone Deacetylase-3. *Journal of Biological Chemistry*, **277**, 9447-9454.
158. Muyldermans,S., Baral,T.N., Retamozzo,V.C., De Baetselier,P., De Genst,E., Kinne,J., Leonhardt,H., Magez,S., Nguyen,V.K., Revets,H., *et al.* (2009) Camelid immunoglobulins and nanobody technology. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, **128**, 178-183.
159. Phillips,D., Reilley,M.J., Aponte,A.M., Wang,G., Boja,E., Gucek,M., Balaban,R.S. (2010) Stoichiometry of STAT3 and mitochondrial proteins: implications for the regulation of oxidative phosphorylation by protein-protein interactions. *Journal of Biological Chemistry*, **285**, 23532-23536.
160. Marouga,R., David,S., Hawkins,E. (2005) The development of the DIGE system: 2D fluorescence difference gel analysis technology. *Anal Bioanal Chem*, **382(3)**, 669-678.
161. Nery,F.C., Zeng,J., Niland,B.P., Hewett,J., Farley,J., Irimia,D., Li,Y., Wiche,G., Sonnenberg,A., Breakefield,X.O. (2008) TorsinA binds the KASH domain of nesprins and participates in linkage between nuclear envelope and cytoskeleton. *Journal of Cell Science*, **121**, 3476-3486.
162. Tavarina,M., Gabriele,T., Anderson,R.L., Mirault,M.E., Baker,E., Sutherland,G., Kola,I. (1995) Localization of the Gene Encoding the Human Heat Shock Cognate Protein, HSP73, to Chromosome 11. *Genomics*, **29**, 266-268.

163. Fujihara,S.M., Nadler,S.G. (1999) Intranuclear targeted delivery of functional NF-[kappa]B by 70 kDa heat shock protein. *EMBO J*, **18**, 411-419.
164. Tsukahara,F., Yoshioka,T., Muraki,T. (2000) Molecular and Functional Characterization of HSC54, a Novel Variant of Human Heat-Shock Cognate Protein 70. *Molecular Pharmacology*, **58**, 1257-1263.
165. Yahata,T., de Caestecker,M.P., Lechleider,R.J., Andriole,S., Roberts,A.B., Isselbacher,K.J., Shioda,T. (2000) The MSG1 Non-DNA-binding Transactivator Binds to the p300/CBP Coactivators, Enhancing Their Functional Link to the Smad Transcription Factors. *Journal of Biological Chemistry*, **275**, 8825-8834.
166. Carter,D.A. (1997) Modulation of cellular AP-1 DNA binding activity by heat shock proteins. *FEBS Letters*, **416**, 81-85.
167. Lefebvre,T., Cieniewski,C., Lemoine,J., Guerardel,Y., Leroy,Y., Zanetta,J.P., Michalski,J.C. (2001) Identification of N-acetyl-d-glucosamine-specific lectins from rat liver cytosolic and nuclear compartments as heat-shock proteins. *Biochem J*, **360**, 179-188.
168. Capotosti,F., Guernier,S., Lammers,F., Waridel,P., Cai,Y., Jin,J., Conaway,J.W., Conaway,R.C., Herr,W. (2011) O-GlcNAc Transferase Catalyzes Site-Specific Proteolysis of HCF-1. *Cell*, **144**, 376-388.
169. Foote,M., Zhou,Y. (2012) 14-3-3 proteins in neurological disorders. *Int J Biochem Mol Biol*, **3**, 152-164.
170. Muslin,A.J., Tanner,J.W., Allen,P.M., Shaw,A.S. (1996) Interaction of 14-3-3 with Signaling Proteins Is Mediated by the Recognition of Phosphoserine. *Cell*, **84**, 889-897.
171. Furukawa,Y., Ikuta,N., Omata,S., Yamauchi,T., Isobe,T., Ichimura,T. (1993) Demonstration of the Phosphorylation-Dependent Interaction of Tryptophan Hydroxylase with the 14-3-3 Protein. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **194**, 144-149.
172. Fu,H., Subramanian,R.R., Masters,S.C. (2000) 14-3-3 Proteins: Structure, Function, and Regulation. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, **40**, 617-647.
173. Peng,C.Y., Graves,P.R., Thoma,R.S., Wu,Z., Shaw,A.S., Piwnica-Worms,H. (1997) Mitotic and G2 checkpoint control: regulation of 14-3-3 protein binding by phosphorylation of Cdc25C on serine-216. *Science*, **277**, 1501-1505.
174. Bronisz,A., Sharma,S.M., Hu,R., Godlewski,J., Tzivion,G., Mansky,K.C., Ostrowski,M.C. (2006) Microphthalmia-associated Transcription Factor Interactions with 14-3-3 Modulate Differentiation of Committed Myeloid Precursors. *Molecular Biology of the Cell*, **17**, 3897-3906.
175. Zha,J., Harada,H., Yang,E., Jockel,J., Korsmeyer,S.J. (1996) Serine Phosphorylation of Death Agonist BAD in Response to Survival Factor Results in Binding to 14-3-3 Not BCL-XL. *Cell*, **87**, 619-628.
176. Skoulakis,E.M., Davis,R.L. (1998) 14-3-3 proteins in neuronal development and function. *Mol Neurobiol*.

177. Miska,E.A., Langley,E., Wolf,D., Karlsson,C., Pines,J., Kouzarides,T. (2001) Differential localization of HDAC4 orchestrates muscle differentiation. *Nucleic Acids Research*, **29**, 3439-3447.
178. Grozinger,C.M., Schreiber,S.L. (2000) Regulation of histone deacetylase 4 and 5 and transcriptional activity by 14-3-3-dependent cellular localization. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **97**, 7835-7840.
179. Nishino,T.G., Miyazaki,M., Hoshino,H., Miwa,Y., Horinouchi,S., Yoshida,M. (2008) 14-3-3 regulates the nuclear import of class IIa histone deacetylases. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **377**, 852-856.
180. Yaffe,M.B., Rittinger,K., Volinia,S., Caron,P.R., Aitken,A., Leffers,H., Gamblin,S.J., Smerdon,S.J., Cantley,L.C. (1997) The Structural Basis for 14-3-3:Phosphopeptide Binding Specificity. *Cell*, **91**, 961-971.

A Anhang

A.1 Material- und Gerätehersteller

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

5 PRIME (Hamburg, Deutschland), Abcam (Cambridge, UK), ABM Greiffenberger Antriebstechnik GmbH (Marktredwitz, Deutschland), Ambion (Austin, TX, USA), Amersham Pharmacia (Freiburg, Deutschland), Amersham Bioscience (Uppsala, 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), DNASTar Lasergene (Madison, WI, USA), Chromotek (Planegg-Martinsried, Deutschland), Dürr Medical (Bietigheim-Bissingen, Deutschland), 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 (Frickhausen, 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), Hoefler (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), 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), **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), **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 Labinstrumente 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).

A.2 Abkürzungsverzeichnis

A260	Absorption bei 260 nm
A280	Absorption bei 280 nm
APS	Ammoniumperoxidsulfat
AD	<i>autosomal dominant</i> , autosomal dominant
AR	<i>autosomal recessive</i> , autosomal rezessiv
BDNF	<i>brain-derived neurotrophic factor</i>
BSA	<i>bovin serum albumin</i> , Rinderserumalbumin
bzw.	Beziehungsweise
ca.	circa
cAMP	<i>cyclic adenosine monophosphate</i>
cDNA	complementary desoxyribonucleic acid, komplementäre Desoxyribonukleinsäure
cm	centimeter
CCD	<i>Coiled-coil domain</i> , <i>Coiled-Coil-Domäne</i>
CPM	<i>counts per minute</i>
DBS	<i>Deep Brain Stimulation</i> , Tiefen Hirnstimulation
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>desoxyribonucleic acid</i> , Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkultur
DTT	Dithiothreitol
DYT	Dystonie
DYT1	Dystonie 1
DYT6	Dystonie 6
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EGTA	Ethylenglycoltetraacetat
ENCODE	<i>The Encyclopedia of DNA Elements</i>
EMSA	<i>electrophoretic mobility shift assay</i>
<i>et al.</i>	und andere
FBS	<i>fetal bovine serum</i> , fötales bovines Serum
FGF8	Fibroblast growth factor 8
GDNF	<i>glial cel line-derived neurotrophic factor</i>
GFP	<i>green fluorescent protein</i> , grün-fluoreszierende Protein
GST	Glutathion-S-Transferase
h	<i>hour</i> , Stunde
HA	Hämagglutinin
HBM	HCF-1 <i>binding motif</i> , HCF-1 Bindemotiv
HCl	Salzsäure
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure
H ₂ O	Wasser
HPLC	high performance liquid chromatography, Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
HRP	horse radish peroxidase, Meerrettich-Peroxidase
Hsp	heat shock protein, Hitzeschock-Protein
Hsc71	<i>Heat shock cognate 71 kDa protein</i>
HUGO/GDB	Human Genome Organization / Genome Database

IgG	Immunglobulin G
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
KCl	Kaliumchlorid
KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilodalton
KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat
l	Liter
LB	Luria Bertani
m	Meter
M	Mol pro Liter
MEM EAA	Minimum Essential Medium-Eagle with Non-Essential Amino Acids
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
min	Minuten
ml	milliliter
mM	Millimol pro Liter
MOI	<i>multiplicity of infection</i> , Multiplizität der Infektion
mRNA	<i>messenger ribonucleic acid</i> , Vorläufer-Ribonukleinsäure
Na ₂ HPO ₄	Natriumdihydrogenphosphat
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
NCoR	<i>Nuclear hormone receptor corepressor</i>
NF κ B	nuclear factor "kappa-light-chain-enhancer" of activated B-cells
Ng	nanogramm
NLS	<i>nuclear localization signal</i> , Kernlokalisations-Signal
nM	Nanomol pro Liter
NMD	<i>Nonsense-mediated decay</i>
NMR	<i>nuclear magnetic resonance</i> , Kernspinresonanz
NP-40	Nonidet-P40
OD	optische Dichte
OGT	O-GlcNAc Transferase
OMIM	<i>Online Mendelian Inheritance in Man</i>
ORF	open reading frame, offener Leserahmen
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	phosphat-buffered saline, Phosphat-gepufferte Salzlösung
Pol	Polymerase
PRR	<i>Proline-rich region</i> , Prolin-reiche Region
PVDF	Polyvinylidenfluorid
qPCR	<i>quantitative polymerase chain reaction</i> , quantitative Polymerase-Kettenreaktion
RL	Renilla Luciferase
RLU	<i>relative light unit</i> , relative Lichteinheit
RNA	ribonucleic acid, Ribonukleinsäure
SDS	sodium dodecyl sulfat, Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	sodium dodecyl sulfat Polyacrylamid-Gelelektrophorese, Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SV40	Simian Virus 40

TBE	Tris-Borat-EDTA
TD	<i>torsion dystonia</i> , Torsionsdystonie
TE	Tris-EDTA
TEMED	Tetramethylethyldiamin
THABS	THAP1- <i>binding sequence</i>
THAP1	Thanatos-associated domain-containing apoptosis-associated protein 1
Tris	Trishydroxymethylaminoethan
UV	Ultraviolett
V	Volt
v/v	volume per volume, Volumen pro Volumen
W	Watt
w/v	weight per volume, Gewicht pro Volumen
XR	<i>X-linked recessive</i> , X-Chromosomal, rezessiver Erbgang
z.B.	zum Beispiel
µl	Mikroliter
µg	mikrogramm
µmol	Mikromol
µM	Mikromol pro Liter

A.3 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 2.1: Patienten mit verschiedenen Dystonie-Typen.	6
Abbildung 2.2: Schematische Darstellung der chromosomalen Lokalisierung des <i>THAP1</i> -Gens und der funktionellen Domänen des THAP1-Proteins.	10
Abbildung 2.3: Die THAP-Domäne besteht aus einem atypischen Zinkfinger-Motiv.	11
Abbildung 3.1: Fragmentiertes Chromatin.	42
Abbildung 4.1: DYT6-verursachende Mutationen in der THAP-Domäne vermindern die THAP1-Aktivität.	56
Abbildung 4.2: <i>In-silico</i> Vorhersage des <i>THAP1</i> -Promotors.	58
Abbildung 4.3: Charakterisierung des <i>THAP1</i> -Promotors.	59
Abbildung 4.4: DNA-Sequenz des THAP1-Kernpromotors mit THABS-Motiven.	59
Abbildung 4.5: ChIP-Analysen zur Untersuchung einer Bindung des THAP1-Proteins an seinen eigenen Kernpromotor.	60
Abbildung 4.6: Untersuchung der Bindung des THAP1-Proteins an seinen eigenen Promotor mittels EMSA.	61
Abbildung 4.7: Der <i>THAP1</i> -Promotor wird konzentrationsabhängig durch THAP1 reprimiert.	62
Abbildung 4.8: DYT6-verursachende Mutationen vermindern die THAP1-vermittelte Repression des <i>THAP1</i> -Kernpromotors.	63
Abbildung 4.9: Untersuchung des Einflusses DYT6-verursachender Mutationen in HeLa- und SH-SY5Y-Zellen.	64
Abbildung 4.10: Untersuchung <i>THAP1</i> -Expression in Wildtyp-Neuronen und Neuronen mit DYT6-Mutationen.	65
Abbildung 4.11: Untersuchung des Effekts trunkierender THAP1-Mutation auf die Kernlokalisierung.	67
Abbildung 4.12: Quantifizierung der GFP-gekoppelten THAP1-Proteine im Zellkern.	68
Abbildung 4.13 Überexpression von GST-gekoppeltem THAP1-Protein in <i>E.coli BL21</i>	70
Abbildung 4.14: Aufreinigung von GST-THAP1 und GST-Protein mittels Glutathion Sepharose.	71
Abbildung 4.15: Schematische Darstellung des THAP1-Proteins und der untersuchten THAP1-Fragmente.	72
Abbildung 4.16: Charakterisierung der THAP1- <i>Coiled-Coil</i> -Domäne mittels GST- <i>Pulldown</i> Analysen.	73
Abbildung 4.17: Übersicht der in GST- <i>Pulldowns</i> untersuchten DYT6-Mutationen.	74
Abbildung 4.18: DYT6-verursachende Veränderungen innerhalb der minimalen Interaktionsregion haben keinen signifikanten Einfluss auf die THAP1-Homodimerisierung.	75

Abbildung 4.19: Charakterisierung der THAP1-Homodimerisierung mittels Hefe-Zwei-Hybrid-Analysen.	75
Abbildung 4.20: Vergleich des THAP1-Proteins mit anderen Mitgliedern der THAP-Proteinfamilie.	76
Abbildung 4.21: Aufreinigung des GST-gekoppelten THAP3-Proteins über Glutathion-Sepharose.	77
Abbildung 4.22: THAP1 interagiert mit THAP3 in vitro.	78
Abbildung 4.23 DYT6-verursachende Mutationen in der THAP1- <i>Coiled-coil</i> -Domäne haben keinen nachweisbaren Einfluss auf die THAP1-THAP3-Interaktion.	79
Abbildung 4.24: Mutationen im THAP3-Protein verändern nicht die THAP1-THAP3-Interaktion.	80
Abbildung 4.25: Nachweis einer THAP1-HDAC3-Interaktion in GST- <i>Pulldown</i> Analysen.	82
Abbildung 4.26: Eingrenzung der THAP1-HDAC3-Interaktionsdomäne im THAP1-Protein. .	83
Abbildung 4.27: Optimierung der Waschbedingungen der <i>GFP-Traps</i> ®.	85
Abbildung 4.28: Auftrennung der Proteine mittels 2D-Gelelektrophorese.	86
Abbildung 4.29: In-silico Analyse der funktionellen Domänen im THAP1-Protein mit der Internetanwendung ELM.	88

A.4 Tabellenverzeichnis

Tabelle 2.1: Zusammenfassung der bisher bekannten, monogenen Dystonie-Typen.	7
Tabelle 4.1: Zusammenfassung der Hefe-Zwei-Hybrid-Analysen.	81
Tabelle 4.2: Ergebnisse der massenspektrometrischen Auswertung.	87

A.5 Primer

Primerbezeichnung	Sequenz (<i>Forward</i> , 5' - 3')	Sequenz (<i>Reverse</i> 5' - 3')
THAP1-Promotor Fragment 1	GGTACCTAACCCACGGGAACAGC C	GCTAGCTTCCGGTCCCTCAGGCA C
THAP1-Promotor Fragment 2	GGTACCGAATGCAGCCCAGCAAG	GCTAGCTTCCGGTCCCTCAGGCA C
THAP1-Promotor Fragment 3	GGTACCCAGACTGACCTGGGCAA CGTG	GCTAGCGCGTCCCACTGTCTCT GATTAG
THAP1-pcDNA TM 3.1/myc-His B	AAGCTTACCATGGTGCAGTCCTG C	GGATCCTGCTGGTACTTCAACT ATTTC
THAP1-pFLAG	AAGCTTACCATGGTGCAGTCCTG C	GGATCCTGCTGGTACTTCAACT ATTTC
THAP1-GST	GAATTC ³ CCCATGGTGCAGTCCTGC TC	CTCGAGTTATGCTGGTACTTC
THAP1-pEGFP-N3	AAGCTTACCATGGTGCAGTCCTG C	GGATCCTGCTGGTACTTCAACT ATTTC
THAP1-pGADT7 / -pGBKT7	GAATTCATGGTGCAGTCCTGCTC CG	GGATCCTGCTGGTACTTCAACT ATTTC
THAP1-S6F	GGTGCAGTCCTGCTTCGCCTACG GCTGCAAG	CTTGCAGCCGTAGGCGAAGCAG GACTGCACC
THAP1-R13H	CCTCCGCCTACGGCTGCAAGAAC CACTACGACAAGGACAAGCC	GGCTTGTCTTTGTCGTAGTGGT TCTTGCAGCCGTAGGCGGAGG
THAP1-H23P	GCCCGTTTTCTTTCCCAAGTTTC CTCTTACTCGACCCAG	CTGGGTCGAGTAAGAGGAAACT TGGGGAAAGAAACGGGC
THAP1-P26L	CCACAAGTTTCTTCTTACTCGAC CCAGTCTTTG	CAAAGACTGGGTCGAGTAAGAA GAAACTTGTGG
THAP1-I149T	CAGCGGAAAAGGACTCATCAGCT AGAACAGCAAG	CTTGCTGTTCTAGCTGATGAGT CCTTTTCCGCTG
THAP1-H150P	CAGCGGAAAAGGATTCTCAGCT AGAACAGCAAGTTG	CAACTTGCTGTTCTAGCTGAGG AATCCTTTTCCGCTG
THAP1-A166T	GAAAGAAGCTCAAGACCACACAG CAGCGATGCAGAAG	CTTCTGCATCGCTGCTGTGTGG TCTTGAGCTTCTTTTC
THAP1-R169Q	CAAGACCGCACAGCAGCAATGCA GAAGGCAAGAAC	GTTCTTGCCTTCTGCATTGCTG CTGTGCGGTCTTG
THAP1-C170R	CCGCACAGCAGCGACGAGAAGG CAAGAACG	CGTTCTTGCCTTCTGCGTCTGCT GCTGTGCGG
THAP1-A-pGADT7 / -pGBKT7	GAATTCATGGTGCAGTCCTGCTC CG	GGATCCAAATATTGTGGGCACA GC
THAP1-B-pGADT7 / -pGBKT7	GAATTCCTTTGTACTGAGCCACA TG	GGATCCTGCTGGTACTTCAACT ATTTC
THAP1-C-pGADT7 / -pGBKT7	GAATTCCTTTGTACTGAGCCACA TG	GGATCCAGTATAGTTGTGGTCA C
THAP1-D-pGADT7 / -pGBKT7	GAATTCGTGGAGGATAACAATGC	GGATCCTGCTGGTACTTCAACT ATTTC
THAP1-D1-pGADT7 / -pGBKT7	GAATTCATGGTGCAGTCCTGCTC CG	GGATCCCTTCTTTCTGAGTTTT TC
THAP1-D1.1-pGADT7/pGBKT7	GAATTCATGGTGCAGTCCTGCTC CG	GGATCCCTTGAGCTTCTTTCTG

THAP1-D2-pGADT7 / -pGBKT7	GAATTCCTCAAGACCGCACAG	GGATCCTGCTGGTACTTCAACT ATTTC
THAP1-D2.1-pGADT7/pGBKT7	GAATTCAAACTCAGAAAGAAGCT CAAG	GGATCCTGCTGGTACTTCAACT ATTTC
THAP1-D3-pGADT7 / -pGBKT7	GAATTCACAACACTATACTGTGGA GG	GGATCCTTCTGATACGTCGTCT T
THAP1-D4-pGADT7 / -pGBKT7	GAATTCAGCAAGTTGAAAAACT CAG	GGATCCTGCGGTCTTGAGCTTC
THAP1-D5-pGADT7 / -pGBKT7	GAATTCAGCAAGTTGAAAAACT CAG	GGATCCTTCTGATACGTCGTCT T
THAP1-D6-pGADT7 / -pGBKT7	GAATTCGTGGAGGATACAATGC	GGATCCTTCTGATACGTCGTCT T
THAP1-D7-pGADT7 / -pGBKT7	GAATTCGTGGAGGATACAATGC	GGATCCGTGAACAACCTCCTTT AA
THAP1-R29X-GFP	AAGCTTACCATGGTGCAGTCCTG C	GGATCCTCGAGTAAGAGGAAAC
THAP1-F45fs73X-GFP	AAGCTTACCATGGTGCAGTCCTG C	GGATCCAAAGTTTTTTCTTCTG ACAG
HDAC1-pcDNA TM 3.1/myc-His A	GGATCCACCATGGCCAAGACCGT GGCC	GAATTC AATCTCCACATCGCTT TCCTT
HDAC3-pcDNA TM 3.1/myc-His A	GGATCCACCATGGCGCAGACGCA GGGC	GAATTCGGCCAACCTTGACCTCC TCC
THAP3-pcDNA3.1/myc-HIS B	AGCTCGGATCCGACCATGCCGAA GTCGTGCGCGGC	ATCTGCAGAATTCCAGCTCTGC TGCTCTGGCCCAAG
THAP3-Zinkfinger- pGADT7/pGBKT7	CGCCGGAATTCATGCCGAAGTCG TGCGCGGCC	GGTACCGGATCCGCTCACTGTG TGGGGTCTGAAAGGC
THAP3-Coiled-Coil- pGADT7/pGBKT7	CGCCGGAATTCATGGATTCCCTG AAGAAAAAC	GGTACCGGATCCGCTCAGCTCT GCTGCTCTGG
Kontrollpromotor 1	GCTAGCCTGCGGCGGTGGCGGAA G	CTCGAGGGCCCGGAACCAATT CT
Kontrolpromotor 2	TTATAAGCAGGTCCCCAAC	ACGCATGTTTGCAAAGTAGA

A.6 Lebenslauf

A.7 Publikationen

Wesentliche Teile dieser Arbeit haben zu den folgenden Publikationen beigetragen:

A. Erogullari*, P. Seibler*, D. Braunholz, A. Grünewald, R. Depping, J. Eckhold, A. Rakovic, T. Lohnau, G. Gillessen-Kaesbach, C. Klein, K. Lohmann, F.J. Kaiser (2013) Increased *THAP1* expression in DYT6 patients: Evidence for autoregulation of *THAP1* expression. In Revision bei *Movement Disorders (Impact factor: 4,505)*

* These two authors have equally contributed to this study.

K. Lohmann, N. Uflacker, **A. Erogullari**, T. Lohnau, S. Winkler, A. Dendorfer, S.A. Schneider, A. Osmanovic, M. Svetel., A. Ferbert, S. Zittel, A.A. Kühn, A. Schmidt, E. Altenmüller, A. Münchau, C. Kamm, M. Wittstock, A. Kupsch, E. Moro, J. Volkmann, V. Kostic, F.J. Kaiser, C. Klein, N. Brüggemann (2012) Identification and functional analysis of novel *THAP1* mutations. *European Journal of Human Genetics*, 20, 171 - 175 (*Impact factor: 4,4*)

A. Osmanovic*, A. Dendorfer*, **A. Erogullari***, N. Uflacker, D. Braunholz, A. Rakovic, G. Vierke, C. Gil-Rodriguez, A. Münchau, M. Albrecht, N. Brüggemann, G. Gillessen-Kaesbach, C. Klein, K. Lohmann, F.J. Kaiser (2011) Truncating mutations in *THAP1* define the nuclear localization signal. *Movement Disorders*, 26, 1565 – 1567 (*Impact factor: 4,505*)

* These three authors have equally contributed to this study.

S.A. Schneider, A. Ramirez, K. Shafiee, F.J. Kaiser, **A. Erogullari**, N. Brüggemann, S. Winkler, I. Bahman, A. Osmanovic, M.A. Shafa, K.P. Bhatia, H. Najmabadi, C. Klein, K. Lohmann (2011) Homozygous *THAP1* mutations as cause of early-onset generalized dystonia. *Movement Disorders*, 26, 858 – 861 (*Impact factor: 4,505*)

F.J. Kaiser, A. Osmanovic, A. Rakovic, **A. Erogullari**, N. Uflacker, D. Braunholz, T. Lohnau, S. Orolicki, M. Albrecht, G. Gillessen-Kaesbach, C. Klein, K. Lohmann (2010) The dystonia gene *DYT1* is repressed by the transcription factor *THAP1* (DYT6). *Annals of Neurology*, 68, 554 -559 (*Impact factor: 11,089*)

Konferenzbeiträge

- 11/2012 Annual Meeting of the American Society of Human Genetics
San Francisco, USA
Vortrag mit dem Titel: "Autoregulation of the DYT6-gene *THAP1*"
- 06/2012 The Movement Disorder Society's 16th International Congress of
Parkinson's Disease and Movement Disorders
Dublin, Irland
Poster mit dem Titel: "THAP1 activates the expression of *SGCE*
(DYT11) and represses its own expression"
- 11/2011 Treffen Norddeutscher Humangenetiker 2011
Kiel, Deutschland
Vortrag mit dem Titel: „Identification of the DYT11-associated gene
SGCE as a new target of THAP1 (DYT6)“
- 05/2011 European Human Genetics Conference (ESHG) 2011
Amsterdam, Niederlande
Poster mit dem Titel: "Functional characterization of mutations in
THAP1 causing dystonia 6"
- 03/2011 22. Jahrestagung der deutschen Gesellschaft für Humangenetik
Regensburg, Deutschland
Vortrag mit dem Titel: „Functional characterization of mutations in
THAP1 causing dystonia 6“
- 11/2010 Treffen Norddeutscher Humangenetiker 2010
Hamburg, Deutschland
Vortrag mit dem Titel: „Funktionelle Charakterisierung des THAP1-
Proteins und DYT6-relevanter Mutationen“
- 06/2010 European Human Genetics Conference (ESHG) 2010
Göteborg, Schweden
Poster mit dem Titel: "A functional link of DYT1 and DYT6 dystonia:
Repression of *TOR1A* (DYT1) gene expression by the transcription
factor activity of THAP1 (DYT6)“

Preise und Stipendien

- 11/2012 **Reisestipendium** von der Deutschen Gesellschaft für Humangenetik (GfH) für die Konferenz „*Annual Meeting of the American Society of Human Genetics*“ in San Francisco, USA
- 06/2012 **Reisestipendium** von der *Movement Disorders Society* für die Konferenz “*The Movement Disorder Society's 16th International Congress of Parkinson's Disease and Movement Disorders*” in Dublin, Irland
- 06/2010 **Posterpreis** “*Best Basic Research Poster*” auf der Konferenz “*European Human Genetics Conference (ESHG) 2010*” in Göteborg, Schweden

An dieser Stelle möchte ich mich ganz herzlich bei all denjenigen bedanken, die es mir ermöglicht haben diese Dissertation anzufertigen und maßgeblich zum Gelingen beigetragen haben.

Ganz besonders danke ich:

- **Frau Priv.-Doz. Dr. Katja Lohmann** und **Herrn Dr. Frank Kaiser** für ein unglaubliches Projekt und die sehr intensive und persönliche Betreuung während der letzten drei Jahre.
- **Frau Prof. Dr. med. Gabriele Gillessen-Kaesbach** für die freundliche Aufnahme in ihrem Institut, ihre Unterstützung und positive Einstellung gegenüber dem Verlauf der Arbeit.
- **Frau Prof. Dr. med. Christine Klein** für die ebenfalls freundliche Aufnahme in ihrem Institut und ihre wissenschaftliche Unterstützung.
- **Herrn Prof. Dr. Enno Hartmann** und **Prof. Dr. Thomas Peters** für die Bereitschaft das Zweitgutachten zu erstellen, bzw. den Vorsitz des Prüfungsausschusses zu übernehmen.
- **Herrn Dr. Philip Seibler, Herrn Dr. Aleksandar Rakovic, Frau Dr. Ana Westenberger, Frau Karen Freimann, Herrn Nils Uflacker, Herrn Dr. Reinhard Depping, Frau Dr. Friederike Pientka, Frau Susann Schindler, Frau Bettina Stier, Herrn Prof. Dr. Dr. Jens Habermann, Herrn Dr. Timo Gemoll, Herrn Prof. Dr. Andreas Dendorfer, Frau Gudrun Vierke** und **Herrn Dr. Ralf Werner** für die tollen Kooperationen, den wissenschaftlichen Austausch und die Möglichkeit, verschiedene Methoden durchführen und spezielle Geräte nutzen zu können.
- **allen Mitarbeitern des Instituts für Humangenetik** und **des Instituts für Neurogenetik** für ihre Hilfsbereitschaft und das sehr angenehme und persönliche Arbeitsklima.
- meinen lieben Kollegen aus der AG-Kaiser: **Diana Braunholz, Juliane Eckhold, Lucas Kötter, Felicitas Kählitz, Melanie Albrecht, Ulf Edener, Conchi María Concepción Gil-Rodríguez** und **Alma Osmanovic** für eine wundervolle Laboratmosphäre, die Gespräche und Diskussionen über Labor- und Lebensfragen und die moralische sowie labortechnische Unterstützung. Dabei geht ein besonderer Dank an **Alma Osmanovic** für die Vorarbeiten in diesem Projekt.
- **meinen Freunden** für das Leben außerhalb des Labors und das Hinterfragen von großen und kleinen Gedanken. Dabei geht ein ganz besonderer Dank an meine lieben Stammtisch-Mädels, **Ulli, Andrea, Anke, Sandra** und **Petra**, für ihre Unterstützung und das Mitfiebern in allen Lebenslagen, sowie an **Justina** dafür, dass sie seit nun fast zehn Jahren immer an meiner Seite gewesen ist.
- **meinen Eltern** und **meinem Bruder** für ihre uneingeschränkte Unterstützung und den liebevollen Rückhalt.
- **Lars** für seine Geduld, seine Ruhe und so vieles mehr.