

Aus dem Institut für Neurogenetik der Universität zu Lübeck

(Direktorin: Prof. Dr. med. Christine Klein)

Molekulargenetische Untersuchungen des *THAP1*-Gens

Kumulative Dissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde

der Universität zu Lübeck

- Aus der Sektion Medizin -

vorgelegt von

Nils Uflacker

aus Oldenburg

Lübeck 2013

1. Berichterstatterin: Frau PD Dr. rer. nat. Katja Lohmann

2. Berichterstatter Herr Prof. Dr. med. Olaf Hiort

3. Berichterstatter Herr Prof. Dr. med. Ulrich Müller

Tag der mündlichen Prüfung: 30.06.2014

Zum Druck genehmigt. Lübeck, den 30.06.2014

Promotionskommission der Sektion Medizin

Liste der vorgelegten Originalarbeiten

-kumulative Dissertation-

- **Uflacker N**, Lohmann K, (*geteilte Erstautorenschaft*) Erogullari A, Lohnau T, Winkler S, Dendorfer A, Schneider SA, Osmanovic A, Svetel M, Ferbert A, Zittel S, Kühn AA, Schmidt A, Altenmüller E, Münchau A, Kamm C, Wittstock M, Kupsch A, Moro E, Volkmann J, Kostic V, Kaiser FJ, Klein C, Brüggemann N. *Identification and functional analysis of novel THAP1 mutations*. Eur J Hum Genet. 2012 Feb;20(2):171-5. doi: 10.1038/ejhg.2011.159. Epub 2011 Aug 17
- Kamm C, **Uflacker N**, Asmus F, Schrader C, Wolters A, Wittstock M, Pahnke J, Gasser T, Volkmann J, Münchau A, Hagenah J, Benecke R, Klein C, Lohmann K. *No evidence for THAP1/DYT6 variants as disease modifiers in DYT1 dystonia*. Mov Disord. 2011 Sep;26(11):2136-7. doi: 10.1002/mds.23777. Epub 2011 Jun 2
- Kaiser FJ, Osmanovic A, Rakovic A, Erogullari A, **Uflacker N**, Braunholz D, Lohnau T, Orolicki S, Albrecht M, Gillessen-Kaesbach G, Klein C, Lohmann K. *The dystonia gene DYT1 is repressed by the transcription factor THAP1 (DYT6)*. Ann Neurol. 2010 Oct;68(4):554-9. doi: 10.1002/ana.22157

Weitere Publikation zur DYT6-Dystonie

- Osmanovic A, Dendorfer A, Erogullari A, **Uflacker N**, Braunholz D, Rakovic A, Vierke G, Gil-Rodríguez C, Münchau A, Albrecht M, Brüggemann N, Gillessen-Kaesbach G, Klein C, Lohmann K, Kaiser FJ. *Truncating mutations in THAP1 define the nuclear localization signal*. Mov Disord. 2011 Jul;26(8):1565-7. doi: 10.1002/mds.23611. Epub 2011 Apr 14

Inhaltsverzeichnis

1. Zusammenfassung.....	1
2. Einleitung.....	3
2.1. Charakteristika und Klassifikation der Dystonien.....	3
2.1.1. Klinik und Genetik der DYT1-Dystonie	5
2.1.2. Klinik und Genetik der DYT6-Dystonie	6
2.2. Das <i>THAP1</i> -Gen	6
2.3. Aufbau und Funktion des THAP1-Protein	7
2.4. Interaktion von THAP1 mit dem <i>TOR1A</i> -Promotor.....	8
2.5. Fragestellung	9
3. Probanden, Material und Methodik.....	10
3.1. Patienten und Kontrollen	10
3.2. PCR und Sequenzierungsreaktion	12
3.3. Zellkultur.....	12
3.4. RNA-Extraktion und <i>Real-Time</i> PCR.....	12
3.5. Transiente Transfektion mit siRNA.....	13
3.6. Westernblotting	13
4. Ergebnisse.....	14
4.1. Identifizierung neuer Sequenzvarianten im <i>THAP1</i> -Gen	14
4.2. Einfluss von <i>THAP1</i> / <i>DYT6</i> -Mutationen auf Penetranz und Ausprägung der DYT1-Dystonie....	19
4.3. Die Rolle von THAP1 als Transkriptionsfaktor auf die Expression des <i>TOR1A</i> -Gen	20
5. Diskussion.....	23
5.1. Pathogenität der Sequenzvarianten im <i>THAP1</i> -Gen	23
5.2. Einfluss von <i>THAP1</i> / <i>DYT6</i> -Mutationen auf Penetranz und Ausprägung der DYT1-Dystonie....	26
5.3. Die Rolle von THAP1 als Transkriptionsfaktor auf die Expression von <i>TOR1A</i>	27
5.4. Schlussfolgerungen.....	28
6. Literaturverzeichnis.....	30
7. Anhang.....	35
7.1. Danksagung	35
7.2. Lebenslauf	36
7.3. Eidesstattliche Erklärung.....	37

1. Zusammenfassung

Bei Dystonien handelt es sich um neurologische Bewegungsstörungen, die zu den extrapyramidalen Hyperkinesien gerechnet werden. Aktuell werden unter den isolierten Dystonien 22 monogenetische Formen (DYT1-DYT25) unterschieden, wobei bei 13 Dystonieformen das für die Krankheit verantwortliche Gen identifiziert worden ist. Die DYT6-Dystonie präsentiert sich klinisch häufig als eine früh beginnende, fokale Dystonie mit zervikalem und brachialem Befallsmuster, die in ein generalisiertes Stadium übergehen kann. Bei vielen Betroffenen ist außerdem das Sprachvermögen im Sinne einer spasmodischen Dysphonie beeinträchtigt. Die DYT6-Dystonie wird durch Mutationen im *THAP1*-Gen verursacht, welches auf dem kurzen Arm des Chromosoms 8 lokalisiert ist und für das *THAP-domain-containing apoptosis-associated protein 1* (THAP1) kodiert. Unsere und eine andere Arbeitsgruppe konnten zeigen, dass THAP1 an die Promotorregion des *TOR1A*-Gens bindet und dort als Repressor der *TorsinA*-Expression fungiert. Mutationen im *TOR1A*-Gen sind bekannt als Auslöser der DYT1-Dystonie.

Um das Mutationsspektrum des *THAP1*-Gens zu erweitern und ggf. phänotypische Merkmale aufzuzeigen, die *THAP1*-Mutationsträger kennzeichnen, wurde bei einem Patientenkollektiv von 567 Probanden mit isolierter Dystonie das *THAP1*-Gen sequenziert. Hierbei konnten zehn bisher unbeschriebene Varianten bei neun Individuen identifiziert werden. Bei sechs von Ihnen handelt es sich um Missensemutationen, die die DNA-bindende THAP-Domäne des THAP1-Proteins betreffen. Ferner wurde eine Deletion im dritten Exon entdeckt, die eine Leserasterverschiebung zur Folge hat und in unmittelbarer Nähe zu der Region liegt, die für das Kernlokalisierungssignal von THAP1 kodiert. Drei weitere Mutationen betreffen die nicht-kodierenden Regionen des Gens und sind in der Nähe der Intron/Exon-Übergänge gelegen. In anschließenden *in-silico* und *in-vitro* Versuchen konnte für sechs der gefunden Mutationen ein pathogener Effekt nachgewiesen werden.¹ Das klinische Bild der von pathogenen Mutationen Betroffenen zeigte einen für die DYT6-Dystonie relativ typischen Befund mit frühem Krankheitsbeginn, Erstmanifestation an Hals oder Arm, sowie Progression der Symptome und Beteiligung der Sprache.

Um die Regulation von *TOR1A* durch THAP1 auch um Zellmodell nachzuweisen, wurden Fibroblasten von *THAP1*-Mutationsträgern auf ihren Gehalt an *THAP1*- und *TOR1A*-mRNA untersucht und mit gesunden Kontrollprobanden verglichen. Bezüglich *TOR1A* konnte kein Unterschied zwischen den einzelnen Gruppen nachgewiesen werden. Auch auf Protein-Ebene

zeigten die Fibroblasten von Mutationsträgern keinen erhöhten TorsinA-Gehalt im Westernblot. Interessanterweise konnte in der Gruppe der Mutationsträger eine erhöhte Expression von *THAP1* in der *Real-Time-PCR* nachgewiesen werden.² Wir führen dieses Ergebnis auf eine autoregulatorische Funktion von *THAP1* zurück, welches als Transkriptionsfaktor auch seine eigene Expression reguliert. Möglicherweise hat dieser Befund einen gewissen kompensatorischen Effekt, der das Auftreten oder die Progredienz von Symptomen bis zu einem gewissen Zeitpunkt verhindern kann.

Um zu untersuchen, ob die variable Penetranz und Ausprägung der *DYT1*-Dystonie von Varianten im *THAP1*-Gen beeinflusst wird, wurde ein Kollektiv von 40 Patienten mit der für die *DYT1*-Dystonie charakteristischen GAG-Deletion im *TOR1A*-Gen auf Mutationen im *THAP1*-Gen untersucht. Hierbei wurden keine Sequenzvarianten gefunden, welche die uneinheitliche Klinik der Mutationsträger erklären könnten.³

Insgesamt konnte somit das bekannte Mutationsspektrum des *THAP1*-Gens erweitert und für verschiedene Sequenzvarianten eine unterschiedliche Pathogenität nachgewiesen werden. Der Einfluss des *THAP1*-Proteins auf die Transkription von *TOR1A* konnte in humanen Hautfibroblasten nicht gezeigt werden, wohl aber eine höhere Expression von *THAP1* in Mutationsträgern. Die Hypothese, dass Penetranz und Krankheitsausprägung der *DYT1*-Dystonie durch *THAP1*-Sequenzvarianten beeinflusst werden, konnte nicht bestätigt werden.

2. Einleitung

2.1. Charakteristika und Klassifikation der Dystonien

Dystonien umfassen eine Gruppe von neurologischen Bewegungsstörungen, welche durch unwillkürliche drehende und schraubende Bewegungen sowie Haltungsanomalien charakterisiert sind und zu den extrapyramidalen Hyperkinesien gerechnet werden.⁴ Sie stellen mit einer Prävalenz von 40/10000 die dritthäufigste Bewegungsstörung dar und präsentieren sich mit einer Vielzahl unterschiedlicher klinischer Syndrome.^{5, 6} Klinisch werden Dystonien nach dem Erkrankungsalter (früh oder spät beginnend) und der Symptomverteilung (z.B. generalisiert oder fokal) klassifiziert. Des Weiteren werden sie nach ihrer Ätiologie in isolierte, kombinierte und komplexe Dystonien unterteilt. Bei der isolierten Form ist die Dystonie das einzige Symptom und die Ursache entweder genetisch oder unbekannt. Bei einer kombinierten Dystonie treten zusätzlich Myoklonien oder Parkinsonismus auf, wohingegen bei den komplexen Dystonien, die Dystonie Teil eines komplexen Syndroms ist.^{7, 8}

Dystonien, die in der Kindheit beginnen sind seltener, oft monogenetischen Ursprungs und neigen zur Generalisierung, während Dystonien des Erwachsenenalters häufiger sind, meist fokal begrenzt bleiben und eher sporadisch vorkommen.⁹

Aktuell werden 22 Typen von isolierten und kombinierten Dystonien unterschieden und mit dem *DYT*-Symbol klassifiziert. Diese Einteilung reicht derzeit von DYT1-DYT25 (Tab. 1), wobei die DYT9- und DYT14-Dystonie aus der Auflistung wieder entfernt wurden, da es sich hierbei um die gleiche Erkrankung wie bei den DYT18- und DYT14-Dystonien handelt. Gleiches gilt für die DYT10- und DYT19-Dystonie. Die DYT22-Dystonie wurde noch nicht publiziert. Das Gen, in dem Mutationen für das Auftreten der Dystonie bei betroffenen Patienten verantwortlich sind, konnte bisher für 13 Formen identifiziert werden (Tab. 1)

Tabelle 1: DYT-Klassifikation der monogenetischen Dystonieformen mit Phänotyp, Genort und Gen

Kürzel	Dystonie-Typ	Genort	Gen
DYT1	Frühbeginnend, generalisierend	9q	TorsinA (TOR1A)
DYT2	Frühbeginnend, generalisierend	Unbekannt	Unbekannt
DYT3	X-chromosomales Dystonie-Parkinson-Syndrom	Xq	TAF1 RNA polymerase II, TATA box binding protein (TBP)-associated factor (TAF1)
DYT4	Flüsterdysphonie	19p	Tubulin, Beta 4A (TUBB4)
DYT5	Dopa-responsive Dystonie; Segawa-Syndrom	14q	GTP cyclohydrolase 1(GCH1)
DYT6	Gemischter Phänotyp	8p	THAP domain containing, apoptosis associated protein 1(THAP1)
DYT7	Spätbeginnend, fokal	18p	Unbekannt
DYT8	Paroxysmale nonkinesigene Dyskinesie 1	2q	Paroxysmal nonkinesigenic dyskinesia (PNKD)
DYT10	Paroxysmale kinesigene Dyskinesie 1	16pq	Proline-rich transmembrane protein 2 (PRRT2)
DYT11	Myoklonus-Dystonie	7q	Sarcoglycan, epsilon (SGCE)
DYT12	Schnell beginnender Dystonie-Parkinson-Syndrom	19q	ATPase, Na ⁺ /K ⁺ transporting, alpha 3 polypeptide (ATP1A3)
DYT13	Stätbeginnend, multifocal/segmental	1p	Unbekannt
DYT15	Myoklonus-Dystonie	18p	Unbekannt
DYT16	Frühbeginnend, generalisierend, mit Parkinsonismus	2p	Protein kinase, interferon-inducible double stranded RNA dependent activato (PRKRA)
DYT17	Spätbeginnend	20pq	Unbekannt
DYT18	Paroxysmale exertationsinduzierte Dyskinesia	1p	Solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter), member 1 (SLC2A1)
DYT20	Paroxysmale kinesigene Dyskinesie 2	2q	Unbekannt
DYT21	Spätbeginnend, generalisierend, multifocal	2q	Unbekannt
DYT23	Spätbeginnende craniocervikale Dystonie	11p	Anoctamin 3 (ANO3)
DYT24	Spätbeginnende cervikale Dystonie	9q	CDKN1A interacting zinc finger protein 1(CIZ1)
DYT25	Autosomal dominante fokale Dystonie	18p	Guanine nucleotide binding protein, alpha activating activity polypeptide, olfactory type (GNAL)

In neusten Untersuchungen, die sich der Methode des *Next Generation Sequencing* (NGS) bedienen, konnten ferner vier Gene identifiziert werden die wahrscheinlich eine Dystonie in betroffenen Mutationsträgern hervorrufen. Mutationen im *Cip1-interacting zinc finger protein 1* (CIZ1) verursachen eine spätbeginnende zervikale Dystonie¹⁰, während Mutationen im *anoctamin 3-Gen* (ANO3) für eine spätbeginnende kraniozervikale Dystonie verantwortlich sind.¹¹ Ferner wurden auf diese Weise Mutationen im *guanine nucleotide-binding protein* (G-

protein), *alpha activating activity polypeptide*, *olfactory type*-Gen (GNAL) als Auslöser für eine spätbeginnende kraniale oder zervikale Dystonie, sowie Mutationen im beta tubulin 4-Gen (*TUBB4*) bei Patienten mit Flüsterdysphonie entdeckt.^{12, 13}

Der Großteil der monogenetischen Dystonien folgt einem autosomal-dominantem Erbgang und zeigt teilweise eine deutlich reduzierte Penetranz. Ausnahmen hierbei sind die Dystonien DYT2, 16 und 17, welche rezessiv vererbt werden.

In der vorliegenden Arbeit wird im Wesentlichen auf die beiden isolierten, monogenetischen Dystonien DYT1 und DYT6 eingegangen.

2.1.1. Klinik und Genetik der DYT1-Dystonie

Bei der DYT1-Dystonie handelt es sich um eine früh beginnende Torsionsdystonie, welche meist an den unteren Extremitäten beginnt und in 65 % der Fälle in ein generalisiertes Stadium übergeht.¹⁴ Die Krankheitsausprägung der DYT1-Dystonie ist stark variabel, sogar innerhalb von betroffenen Familien. Sie reicht von leichter fokaler Dystonie bis hin zur stark ausgeprägten, generalisierten Form der Erkrankung.¹⁵ Die DYT1-Dystonie zeigt insgesamt eine deutlich reduzierte Penetranz, welche in der Literatur mit 30-40% angegeben ist.^{16, 17}

Die DYT1-Dystonie wird durch eine Mutation, genauer einer 3- Basenpaar (GAG) Deletion, im *TOR1A*-Gen hervorgerufen.¹⁸ Das Gen befindet sich auf dem langen Arm des Chromosoms 9 (9q34), und kodiert für ein molekulares Chaperon aus der AAA+-Superfamilie, TorsinA. Die für die DYT1-Dystonie typische GAG-Deletion bewirkt eine Deletion einer Glutaminsäure am C-Terminus des Proteins. Die genaue Pathogenese der DYT1-Dystonie ist noch nicht bekannt, wobei aber eine Beteiligung des endoplasmatischen Retikulums, der Kernhülle und des Zytoskeletts diskutiert wird.¹⁹

Innerhalb des *TOR1A*-Gens konnte ein Polymorphismus identifiziert werden, der einen Ansatz zur Erklärung der variablen Krankheitsausprägung und der insgesamt geringen Penetranz bietet. Dieser Polymorphismus befindet sich in Exon 4 des *TOR1A*-Gens und kodiert entweder für Asparaginsäure (D) in 88% europäischer Kontrollen, oder für Histidin (H) bei 12% an Position 216 des TorsinA-Proteins (D216H).²⁰ Der D216H-Polymorphismus wird bedeutend häufiger bei asymptomatischen Mutationsträgern, als bei Mutationsträgern mit manifester Dystonie gefunden. Diese Beobachtung ließ sich sowohl bei einem amerikanischen, als auch bei einem europäischen Patientenkollektiv machen.^{20, 21} Dies

bedeutet, dass Mutationsträger der GAG-Deletion ein verringertes Risiko für das Auftreten einer Dystonie haben, wenn sie Träger des H-Allels des besagten Polymorphismus sind und dass die Penetranz der DYT1-Dystonie durch ihn beeinflusst wird.

2.1.2. Klinik und Genetik der DYT6-Dystonie

In ihrer Erstbeschreibung wurde die DYT6-Dystonie phänotypisch als eine isolierte früh beginnende Torsionsdystonie dargestellt, welche sich meist in der Kindheit als laryngeale Dystonie manifestiert und im Verlauf in einen generalisierten Zustand übergeht.¹⁴ Mittlerweile ist das klinische Spektrum der DYT6-Dystonie deutlich erweitert worden. Am häufigsten manifestiert sich die DYT6-Dystonie als früh beginnende, zunächst fokale Dystonie mit zervikalem und brachialem Befallsmuster²²⁻²⁶ und kann gegebenenfalls in ein generalisiertes Stadium übergehen, wobei häufig zunächst angrenzende Körperregionen betroffen sind.²⁷ Im Frühstadium ist ferner häufig der Larynx im Sinne einer spasmodischen Dysphonie betroffen.

Die DYT6-Dystonie wird durch Mutationen in *THAPI*-Gen ausgelöst und wurde zuerst bei amischen Familien in den Vereinigten Staaten von Amerika entdeckt²⁸. Bei der erstbeschriebenen Mutation handelt es sich um eine Insertion/Deletion in Exon 2, welche eine Leserasterverschiebung zur Folge hat. Wie unter 1.2 genauer ausgeführt, ist das Mutationsspektrum des *THAPI*-Gens mittlerweile durch unsere und die Arbeiten Anderer deutlich erweitert worden, sodass heute eine Vielzahl von Mutationen bekannt sind.

Wie die meisten isolierten Dystonien folgt die DYT6-Dystonie einem autosomal-dominanten Erbgang, wobei die Penetranz der Erkrankung mit ca. 60 % angegeben wird.²⁹ Auch die Ausprägung der Dystonie bei betroffenen Patienten mit *THAPI*-Mutationen ist sehr variabel, ohne dass eine Korrelation zwischen Genotyp und Phänotyp festgestellt werden konnte.

2.2. Das *THAPI*-Gen

Das *THAPI*-Gen ist auf dem kurzen Arm des Chromosom 8, Bande 8p11.21, lokalisiert und umfasst 3 Exons. Es kodiert für das *THAP-domain-containing apoptosis-associated protein 1* (THAP1). Zu Beginn meiner Arbeit waren bereits einige Mutationen im *THAPI*-Gen entdeckt worden. Durch unsere und andere Arbeitsgruppen wurde das bekannte Mutationsspektrum stetig erweitert, sodass bis zum jetzigen Zeitpunkt circa 80 Mutationen des *THAPI*-Gens

beschrieben worden sind.^{1, 22-26, 30-43} Bei etwa einem Drittel der gefundenen Mutationen handelt es sich um Missensemutationen, welche den Austausch einer Aminosäure in der DNA-bindenden THAP-Domäne des Proteins zur Folge haben. Ein weiteres Drittel der bekannten Mutationen verändert diejenige Region des *THAP1*-Gens, welche für das Kernlokalisierungssignal (*Nucleus Localisation Signal* - NLS) kodiert und somit für den Kernimport des Proteins verantwortlich ist. Der Großteil der bisher beschriebenen Mutationen ist also dafür verantwortlich, dass das THAP1-Protein seiner natürlichen Funktion als Transkriptionsfaktor im Zellkern nicht nachkommen kann. Bis auf zwei Ausnahmen^{24, 38} liegen alle gefundenen Mutationen in heterozygoter Form vor.

Die Mutationsfrequenz in Patientenkollektiven mit isolierter oder kombinierter Dystonie werden in der Literatur mit 0,5 % bis 1,8 %^{23-26, 44, 45} angegeben, was die DYT6-Dystonie zu einer eher seltenen Ursache einer isolierten Dystonie macht. In Familien, in denen eine frühbeginnende Dystonie bei Familienmitgliedern festgestellt und eine DYT1-Dystonie ausgeschlossen wurde, konnten jedoch *THAP1*-Mutationen in 25% der Fälle nachgewiesen werden.²²

Für das *THAP1*-Gen sind zwei Polymorphismen in den nicht-kodierenden Regionen bekannt, die möglicherweise mit der DYT6-Dystonie assoziiert sind.^{23, 25} Die Punktmutation IVS1+9C>A zwischen Exon 1 und 2 ist insgesamt sehr selten, wird aber häufiger bei Patienten mit spätbeginnender fokaler Dystonie gefunden.^{25, 45} Bei dem anderen möglicherweise mit der DYT6-Dystonie assoziiertem Polymorphismus handelt es sich um eine Substitution -237,236GA>TT in der 5' untranslatierten Region (5'UTR). Verschiedene Studien zeigen ein häufigeres Auftreten dieses Polymorphismus bei Patienten als bei Kontrollen.^{23, 34, 45, 46}

2.3. Aufbau und Funktion des THAP1-Protein

Das 213 Aminosäuren große THAP1 gehört zu einer Familie DNA-bindender Faktoren, die im Menschen 12 Proteine umfasst; das DAP4/p52rIPK-Protein sowie die Proteine THAP1 bis THAP11. Bei der für die THAP-Proteine charakteristischen THAP-Domäne handelt es sich um ein ca. 90 Aminosäuren großes Proteinmotiv, welches als atypische Zinkfingerdomäne sequenzspezifisch DNA bindet.⁴⁷ Diejenigen DNA-Abschnitte, die von der THAP-Domäne gebunden werden umfassen 11 Basenpaare und enthalten die Sequenz TxxxGGCA⁴⁷ oder TxxGGGx(A/T)⁴⁸. Sie werden als *THAP-Bindingsites* (THABS) bezeichnet.⁴⁷ Abgesehen von

der charakteristischen THAP-Domäne verfügt das THAP1-Protein über eine zentral gelegene prolinreiche Region, sowie das NLS am C-Terminus, welches für den Kernimport des Proteins von Bedeutung ist.⁴⁹

Das THAP1-Protein liegt im Zellkern kolokalisiert mit dem proapoptotischen Faktor Par-4 in den sogenannten *Promyelocytic leukemia nuclear bodies* (PMLNBs) vor und zeigt bei Überexpression im Zellmodell eine höhere Apoptoserate in transfizierten Zellen.⁵⁰ Ferner wurde nachgewiesen, dass THAP1 als Transkriptionsfaktor an eine bestimmte Region im Promotor des *RRM1*-Gens bindet, welches für die Ribonucleotid-Reduktase-M1-Untereinheit kodiert und unentbehrlich für die DNA-Synthese während der S-Phase des Zellzyklus ist.⁵¹

Unsere Arbeitsgruppe konnte ferner eine Interaktion von THAP1 mit der Promotorregion des *TORIA*-Gens nachweisen, worauf im Folgenden genauer eingegangen werden soll.

2.4. Interaktion von THAP1 mit dem *TORIA*-Promotor

Die Arbeitsgruppen unter Leitung von Prof. Kaiser (Institut für Humangenetik) und Dr. Lohmann (Institut für Neurogenetik) der Universität zu Lübeck konnten mit verschiedenen Methoden eine Interaktion des THAP1-Proteins mit dem *TORIA*-Promotor nachweisen und zeigen, dass das Protein als Repressor des *TORIA*-Gen fungiert.²

Zunächst wurde eine 221-Basenpaar große Region in 5'-Richtung des Exon 1 *in silico* und mittels *Luciferase-Assays* als Promotorregion von *TORIA* identifiziert. Ebendiese Region enthält eine typische THABS, sowie einen DNA-Abschnitt, der Homologien zu einer invertierten THABS zeigt (TxxGGxA). Die Funktion von THAP1 an der Promotorregion wurde anschließend mit einem *Luciferase-Reportergen-Assay* bestätigt. Bei Überexpression eines THAP1-Flag oder THAP-c-myc Plasmiden in HeLa oder SH-SY5Y-Zellen zeigte sich eine verminderte Luciferase-Aktivität. Die Verringerung der Luciferase-Aktivität und somit im Rückschluss die Transkription des *TORIA*-Gens war von der Konzentration an eingesetztem THAP1 abhängig. Diese Versuche demonstrieren die Funktion von THAP1 als Repressor des *TORIA*-Gen. Die Interaktion zwischen THAP1 und dem *TORIA*-Promotor wurde ferner durch *Chromatin-Immun-Präzipitation* (ChIP) bestätigt. Hierbei wurden durch THAP1 gebundene DNA-Fragmente präzipitiert und anschließend einer PCR unterzogen. In den ChIP-Produkten konnte die *TORIA*-Promotorregion amplifiziert werden, während die PCR-Amplifikation eines Kontroll-Promotors nicht möglich war.

Zeitgleich zu unserer Veröffentlichung konnte die Arbeitsgruppe um Frau Prof. Laurie Ozelius von der Mount Sinai School of Medicine, New York, USA vergleichbare Ergebnisse publizieren. Ihre Arbeitsgruppe konnte eine Interaktion von THAP1 mit dem *TOR1A*-Promotor durch *electromobility shift assays* (EMSA) und ChIP nachweisen.⁵²

2.5. Fragestellung

Im Rahmen der vorgelegten Arbeit sollten molekulargenetische Fragen zu den neurologischen Bewegungsstörungen der DYT1- und DYT6-Dystonie sowie Zusammenhänge in ihrer Pathogenese beantwortet werden. Den durchgeführten Untersuchungen lagen folgende Fragestellungen zu Grunde:

- *Neue Sequenzvarianten im THAP1-Gen*

Wie häufig und welcher Art sind Mutationen im *THAP1*-Gen? Wie ist die Pathogenität gefundener Varianten einzuschätzen? Gibt es phänotypische Merkmale, die *THAP1*-Mutationsträger kennzeichnen? Liegt eine Assoziation der bekannten Polymorphismen mit DYT6 in unserem Patientenkollektiv, bzw. in einzelnen Subgruppen vor?

- *Einfluss von THAP1/DYT6-Mutationen auf die Penetranz und Ausprägung der DYT1-Dystonie*

Liegen bei Patienten mit einer GAG-Deletion im *TOR1A*-Gen Varianten im *THAP1*-Gen vor, die zur variablen Penetranz und Ausprägung der DYT1-Dystonie beitragen?

- *Die Rolle von THAP1 als Transkriptionsfaktor des TOR1A-Gens*

Kann die *in vitro* entdeckte Regulation des *TOR1A*-Gens durch THAP1 in Zellen von humanen Mutationsträgern bestätigt werden, d.h. zeigen Patienten, welche eine *THAP1*-Mutation tragen eine höhere Expression von TorsinA?

3. Probanden, Material und Methodik

3.1. Patienten und Kontrollen

Um das genetische und phänotypische Spektrum der DYT6-Dystonie beurteilen zu können, wurde das bei der DYT6-Dystonie mutierte *THAPI*-Gen bei 567 Patienten mit isolierter Dystonie sequenziert. Vierhunderteinundsechzig der Patienten wiesen eine fokale Dystonie, wie z. B. eine spasmodische Dysphonie oder einen Schreibkrampf auf, während 68 Patienten an segmentaler und 38 Patienten an generalisierter Dystonie erkrankt waren. Die Patienten wurden aus der Hochschulambulanz für Neurologie der Universität zu Lübeck, dem Klinikum Kassel, den Universitätskrankenhäusern Hamburg-Eppendorf, Berlin (Charité), Rostock und Kiel, dem Institut für Musikphysiologie und Musiker-Medizin der Hochschule für Musik, Theater und Medien Hannover, sowie dem Universitätskrankenhaus Belgrad und dem Toronto Western Hospital rekrutiert. Bei allen Patienten wurde eine isolierte Dystonie von mindestens einem Spezialisten für Bewegungsstörungen diagnostiziert. Darüber hinaus erhielten die Patienten ein bildgebendes Verfahren des Schädels, um sekundäre Auslöser der Dystonie auszuschließen. Vierhundertfünfunddreißig Patienten sind deutschen, 119 serbischen und 12 kanadischen Ursprungs.

Einzelheiten zum klinischen Status der Studienpatienten sind Tabelle 2 zu entnehmen.

Um die Frequenz der beiden Sequenzvarianten -237,236GA>TT und IVS1+9C>A, welche mutmaßlich mit der DYT6-Dystonie assoziiert sind, abschätzen zu können, wurde darüber hinaus das *THAPI*-Gen bei 365 gesunden, deutschen Kontrollprobanden sequenziert.

Die DNA-Proben wurden aus Leukozyten aus eingesandten EDTA-Blutproben isoliert. Ferner wurde bei allen Patienten die GAG-Deletion im *TORIA*-Gens und somit eine DYT1-Dystonie als Auslöser der Bewegungsstörung ausgeschlossen.

Tabelle 2: Klinische Informationen zur Studienpopulation der Veröffentlichung „Identification and functional analysis of novel THAP1 mutations.“³⁶

Dystonieform	Patienten (n)	Geschlecht; männlich (%)	Durchschnittliches Erkrankungs- alter ± SD	Durchschnitts- alter ± SD	Familienanamnese (n)		
					positiv	negativ	unbekannt
Generalisiert	38	61.9	19.1 ± 17.8	40.9 ± 15.1	5	26	7
Segmental	68	48.4	43.5 ± 19.0	59.1 ± 12.8	6	40	22
Fokal	461						
Zervikale Dystonie	155	39.9	42.8 ± 13.1	54.9 ± 13.7	22	62	71
Blepharospasmus	63	30.2	56.9 ± 10.7	68.6 ± 10.3	2	29	32
Schreibkrampf	53	54.7	41.4 ± 10.9	55.4 ± 10.8	1	22	30
Musikerdystonie	168	73.2	34.8 ± 10.5	43.8 ± 12.0	13	135	20
Spasmodische Dysphonie	18	33.3	50.9 ± 11.3	65.4 ± 11.2	0	3	15
Andere	4	50.0	58.2 ± 10.9	61.5 ± 12.2	1	3	0

Zur Untersuchung einer möglichen Beeinflussung der Penetranz und Krankheitsausprägung der DYT1-Dystonie durch Sequenzvarianten im *THAP1*-Gen, wurde das *THAP1*-Gen bei 40 Trägern der GAG-Deletion im *TOR1A*-Gen aus insgesamt 22 Familien sequenziert. Diese Daten bilden die Grundlage der Veröffentlichung „*No evidence for THAP1/DYT6 variants as disease modifiers in DYT1 dystonia*“.³

Die Patienten und deren Verwandte wurden an der Hochschulambulanz für Neurologie der Universität zu Lübeck, sowie aus dem deutschen Netzwerk für erbliche Bewegungsstörungen (GeNeMOVE) akquiriert. Sechszwanzig von diesen wiesen eine manifeste DYT1-Dystonie auf, wobei das Phänotypenspektrum von milder fokaler Dystonie bis hin zur generalisierten Dystonie reichte. Vierzehn Mutationsträgern waren nicht von einer Dystonie betroffen.

Das Durchschnittsalter der nicht betroffenen Mutationsträger lag mit 50,4 Jahren bei einer Spanne von 15-88 Jahren deutlich über dem der Patienten mit manifester Dystonie. In dieser Gruppe lag das Durchschnittsalter bei 23,7 Jahren bei einer Spanne von 2-52 Jahren.

Die DNA-Proben wurden von Mitarbeitern der beteiligten Institute und Kliniken aus peripheren Blutleukozyten gewonnen und die GAG-Deletion im *TOR1A*-Gen durch PCR und anschließende Polyacrylelektrophorese bestätigt.

Um die Expression des *THAP1*- und *TOR1A*-Gens bei Patienten und Kontrollen zu vergleichen, wurde mRNA aus Hautfibroblasten von Probanden untersucht. Wir verwendeten hierzu Fibroblasten aus Hautbiopsaten von gesunden Kontrollprobanden, sowie von vier Patienten mit DYT6-Dystonie. Drei der Patienten trugen eine Deletion von Adenin an Position 474 (c.474delA) in heterozygoter Form. Diese Mutation hat eine Leserasterverschiebung ab Position 159 und ein um 33 Aminosäuren verkürztes Protein zur Folge (p.L159fs180X). Der vierte Patient trägt die zwei Basenpaar Deletion von Thymin und Cytosin an den Positionen 388 und 389 (c.388_389delTC), welche eine Leserasterverschiebung ab Position 131 und einen Abbruch des Proteins ab Position 133 bedingt. Zur Analyse der Proteinkonzentration von THAP1 und TorsinA wurden ebendiese Zellen, sowie die gesunder Kontrollprobanden verwendet. Einzelheiten zu den verwendeten Zellen sind der entsprechenden Publikation zu entnehmen.²

3.2. PCR und Sequenzierungsreaktion

Aus den DNA-Proben der Probanden wurden zunächst die drei Exons des *THAP1*-Gens mittels PCR amplifiziert und anschließend eine Sequenzierung durchgeführt. Die Primer wurden jeweils so gewählt, dass auch die Intron/Exon-Übergänge erfasst und somit untersucht werden konnten. Einzelheiten zu den verwendeten Primern sind der Veröffentlichung zu entnehmen.³⁶ Zur Auswertung der Basenfolge wurden die Sequenzierungsprodukte einer Kapillar-Gelelektrophorese unterzogen und anschließend mit Hilfe der Software *Mutation Surveyor* analysiert. Als Referenzsequenz wurde die Wildtypsequenz des *THAP1*-Gens aus der NCBI Datenbank (NCBI Reference Sequence: NC_000008.10) verwendet.

3.3. Zellkultur

Die verwendeten Hautfibroblasten wurden bei 37 °C und einer 5 %igen CO₂-Konzentration in *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM), welches mit 10 % fetalem Rinderserum (*fetal bovine serum* - FBS) und 1 % Penicillin/Streptomycin-Lösung versetzt wurde, kultiviert.

3.4. RNA-Extraktion und Real-Time PCR

Die Gesamt-RNA aus den Fibroblasten wurde mit dem RNA easy protect kit (Qiagen) nach Protokoll des Herstellers extrahiert. Anschließend wurde die RNA mit dem *Super Script First-Strand Synthesis System* (Invitrogen) durch eine Reverse-Transkriptase Reaktion in cDNA umgeschrieben. Die gewonnene cDNA wurde daraufhin einer *Real-Time* PCR (Light Cycler 2.0 / Roche Diagnostics) unterzogen, um den Gehalt an *THAP1*- und *TOR1A*-mRNA

zu bestimmten. Als Referenzgene dienten *YWHAZ* (14-3-3-zeta), *HPRT* (Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase), *Aktin* und *PBGD* (Porphobilinogen-Deaminase). Die mRNA wurde jeweils zweimal aus den Zellkulturen gewonnen und alle Messungen in der RT-PCR doppelt durchgeführt, um Messungenauigkeiten zu verringern. Einzelheiten bezüglich der verwendeten RT-PCR-Primer sind der Veröffentlichung zu entnehmen.³⁶

3.5. Transiente Transfektion mit siRNA

Fibroblasten einer gesunden Kontrollperson wurden mit zwei verschiedenen siRNAs (Qiagen [THAP1_5; THAP1_6]) gegen *THAP1* mittels Elektroporation (Lonza) transfiziert. Als Kontrolle wurden Fibroblasten der gleichen Zelllinie mit siRNA gegen das artifizielle *Green-Fluorescent-Protein* (GFP) (MWG Biotech) transfiziert. Die endgültige Konzentration der siRNA lag bei 50 nM und die Zellen wurden über 48 Stunden inkubiert.

3.6. Westernblotting

Zur Proteinisolierung wurden die Fibroblasten in RIPA-Puffer lysiert und Zellreste durch Zentrifugation bei 13.000 rpm entfernt. Das Proteinlysate wurde durch eine SDS-PAGE (Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid Gelelektrophorese), aufgetrennt und im eigentlichen Westernblotverfahren auf eine Nitrocellulosemembran (Amersham) übertragen. Die Membran wurde mit 4 %iger Milchlösung in PBS-Puffer inkubiert, um unspezifische Bindung der Primärantikörper zu verhindern. Als Primärantikörper wurden anti-THAP1 (Proteintech) in einer Konzentration von 1:1000, anti-TorsinA (Milipore) in einer Konzentration von 1:500 und anti-Aktin (Sigma) als Ladekontrolle in einer Konzentration von 1:10⁵ verwendet. Nach einer Inkubationszeit von mindestens 12 Stunden wurden die Membranen gereinigt und mit einem anti-Maus Sekundärantikörper (SantaCruz), der mit einer Meerrettichperoxidase konjugiert ist, in einer Konzentration von 1:8000 für 3 Stunden bei Raumtemperatur, inkubiert. Anschließend wurden die Membranen mit einer Chemilumineszenzlösung (Pierce) behandelt, die eine Detektion der Protein-Antikörper-Komplexe auf einem Röntgenfilm möglich macht.

4. Ergebnisse

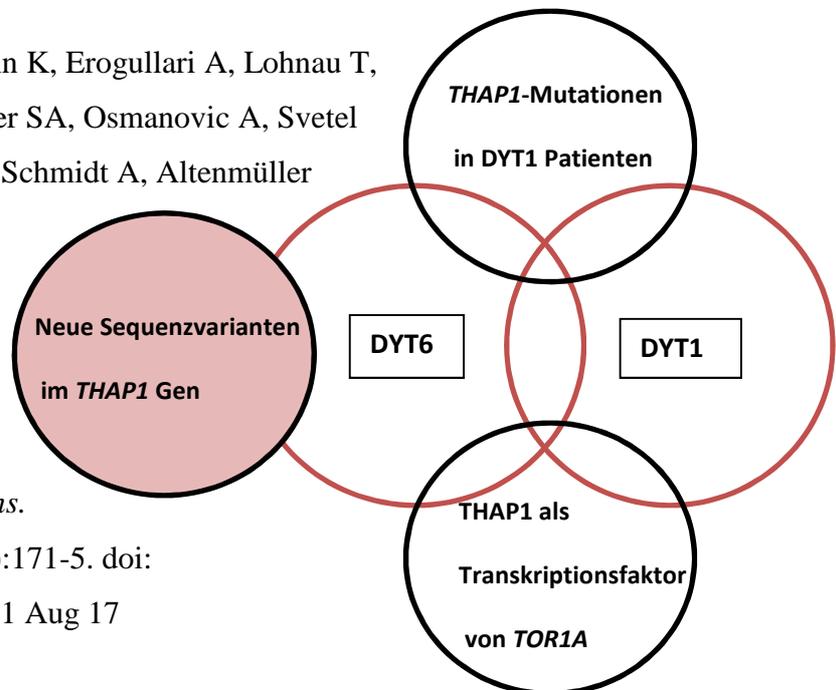
4.1. Identifizierung neuer Sequenzvarianten im *THAP1*-Gen

Publikation: **Uflacker N**, Lohmann K, Erogullari A, Lohnau T, Winkler S, Dendorfer A, Schneider SA, Osmanovic A, Svetel M, Ferbert A, Zittel S, Kühn AA, Schmidt A, Altenmüller E, Münchau A, Kamm C, Wittstock M, Kupsch A, Moro E, Volkmann J, Kostic V, Kaiser FJ, Klein C, Brüggemann N.

Identification and functional analysis of novel THAP1 mutations.

Eur J Hum Genet. 2012 Feb;20(2):171-5. doi:

10.1038/ejhg.2011.159. Epub 2011 Aug 17



Insgesamt konnten in unserer Untersuchung des *THAP1*-Gens an 567 Patienten zehn neue Varianten bei neun Individuen identifiziert werden.

Bei sechs dieser Sequenzvarianten handelt es sich um heterozygote Missensemutationen, welche einen Austausch von Aminosäuren in der DNA-bindenden THAP-Domäne des THAP1-Proteins zu Folge haben. Eine Deletion im dritten Exon des *THAP1*-Gens liegt in unmittelbarer Nachbarschaft zu der Region, die für das *Nucleus localisation signal* (NLS) kodiert. Drei entdeckte Mutationen betreffen die nicht-kodierenden Regionen des *THAP1*-Gens.

In Exon 1 wurden insgesamt vier Punktmutationen in heterozygoter Form gefunden, die den Austausch einer Aminosäure um THAP1-Protein zur Folge haben: c.38G>A - p.Arg13His, c.46A>G - p.Lys16Glu, c.68A>C - p.His23Pro, c.70A>G - p.Lys24Glu. In Exon 2 wurden zwei Mutationen identifiziert, die ebenso in heterozygoter Form vorlagen: c.77C>T - p.Pro27Leu, c.238 A>G - p.Ile80Val. Alle sechs Missensemutationen betreffen die für THAP-Domäne des THAP1-Proteins, welche von Aminosäure 1-91 lokalisiert ist.

Im kodierenden Bereich des Exon 3 des *THAP1*-Gens wurde eine bisher unbekannte Deletion von Adenin an Position 570 (c570delA) gefunden, die eine Verschiebung des Leserasters und somit ein verändertes Translationsprodukt bewirkt. Die Leserasterverschiebung hat zur Folge, dass ab Position p.190 die Aminosäuresequenz des Proteins verändert ist und ab Position p.199 die Translation auf Grund eines Stopcodons gänzlich abbricht. Die Deletion befindet sich ein Basenpaar in 3'-Richtung von der Region, welche das NLS (AS 146-162) kodiert. Folglich ist dieser Bereich des THAP1-Proteins nicht direkt von der Leserasterverschiebung beeinflusst, befindet sich aber in direkter Nachbarschaft zu ihr.

In den nicht-kodierenden Regionen des *THAP1*-Gens konnten drei Sequenzvarianten entdeckt werden: In der 5'-UTR (5' *Untranslated Region*) eines Patienten wurde 32 Basen vor dem Startcodon in Exon 1 eine Substitution von Cytosin zu Thymin identifiziert. (c.-32C>T). Zwei weitere Sequenzvariation betreffen die 3'UTR eines anderen Patienten direkt am Übergang zur kodierenden Region. Eine heterozygote Substitution von Adenin zu Guanin befindet sich ein Basenpaar hinter dem Stopcodon (c.*1A>G), eine weitere Substitution von Adenin zu Thymin liegt 10 Basenpaare (bp) nach dem Stopcodon ebenfalls in heterozygoter Form vor (c.*10A>T).

Einzelheiten zum Phänotyp und biographischen Informationen der betroffenen Patienten sind Tabelle 3 zu entnehmen.

Tabelle 3: klinische Angaben, Mutation, THAP1-Aktivität und Scores der Softwares PolyPhen 2 und SIFT der Mutationsträger

Code	Alter	Geschlecht	Familien-anamnese	Krankheitsbeginn (a)	Betroffene Region	Dystonie bei Untersuchung	Beeinflussung der Sprache	Mutation	PolyPhen-2 Score	SIFT Score	THAP1 Aktivität
L3641	59	W	Pos.	49	Hals	fokal	-	c.570delA p.Lys190fs199X	n.a.	n.a.	n.a.
L3841	32	W	Neg.	8	Hals	generalisiert	Ja (mild)	c.70A>G p.Lys24Glu	Benign (0.100)	Affects function (0.03)	60%
L3969	30	M	Neg.	6	Arm	generalisiert	Ja	c.38G>A p.Arg13His	Probably damaging (0,989)	Affects function (0.02)	80%
L4071	46	W	Neg.	11	Hals	generalisiert	Ja	c.46A>G p.Lys16Glu	Probably damaging (0,914)	Affects function (0.03)	60%
L4155	33	M	Pos.	9	Arm	segmental	Nein	c.68A>C His23Pro	Possibly damaging (0.612)	Affects function (0.00)	20%
L4318	56	M	Pos.	10	Arm	segmental	Ja	c.77C>T p.Pro26Leu	Probably damaging (0.994)	Affects function (0.00)	40%
L4325	35	M	Neg.	33	Musikerdystonie	fokal	Nein	c.-32C>T (5'UTR)	n.a.	n.a.	n.a.
L4455	33	M	Neg.	19	Arm	generalisiert	Ja (Aphonie)	c.*1A>G + c.*10A>T (3'UTR)	n.a.	n.a.	n.a.
L4457	54	M	Neg.	41	Hals	fokal	Nein	c.238A>G p.Ile80Val	Benign (0.010)	Tolerated (0.79)	100%

Für die beiden mutmaßlich mit der DYT6-Dystonie assoziierten Polymorphismen -237,236GA>TT und IVS1+9C>A ergaben sich bei unserem Patienten- und Kontrollkollektiv folgende Ergebnisse: Der -237,236GA>TT-Polymorphismus wurde in vergleichbarer Häufigkeit bei Patienten und Kontrollen gefunden. Er liegt bei einer Frequenz von 4,5 % in deutschen und 5,0 % in serbischen Betroffenen und 5,2 % in der Kontrollgruppe. Innerhalb des Patientenkollektivs tritt der Polymorphismus geringfügig häufiger bei Individuen mit zervikal betonter Dystonie (7,7 %) oder Musikerdystonie (6,5 %) auf. Diese Ergebnisse decken sich mit denen von Djarmati et al.²³ Einzelheiten zur Verteilung des -237,236GA>TT-Polymorphismus in unserer Untersuchung und der von Djarmati et al.²³ sind Tabelle 4 zu entnehmen.

Tabelle 4: Einzelheiten zur Verteilung des -237,236GA>TT- Polymorphismus in der Studienpopulation

	Djarmati et al.	Deutsche Probanden	Serbische Probanden	Alle Patienten	Kontrollen
Gesamt	19/320 (5.9%)	17/378 (4.5%)	6/120 (5.0%)	42/818 (5.1%)	19/365 (5.2%)
Generalisierte	0/35	1/32	0/6	3/73 (4.1%)	
Segmentale	3/60	2/55	0/12	5/127 (3.9%)	
Fokale	16/225	14/291	6/102	36/618 (5.8%)	
-zervikale Dystonie	8/68	6/111	3/43	17/222 (7.7%)	
-Musikerdystonie	8/94	6/122	0	14/216 (6.5%)	
-Scheibkrampf	0/34	0/18	2/16	2/68 (2.9%)	
-Blepharospasmus	0/29	2/32	0/30	2/91 (2.2%)	
-Spasmodische Dysphonie	0	0/5	1/13	1/18 (5.6%)	

Der Polymorphismus IVS1+9C>A wurde bei einem von 567 Patienten und einem von 365 Kontrollen festgestellt.

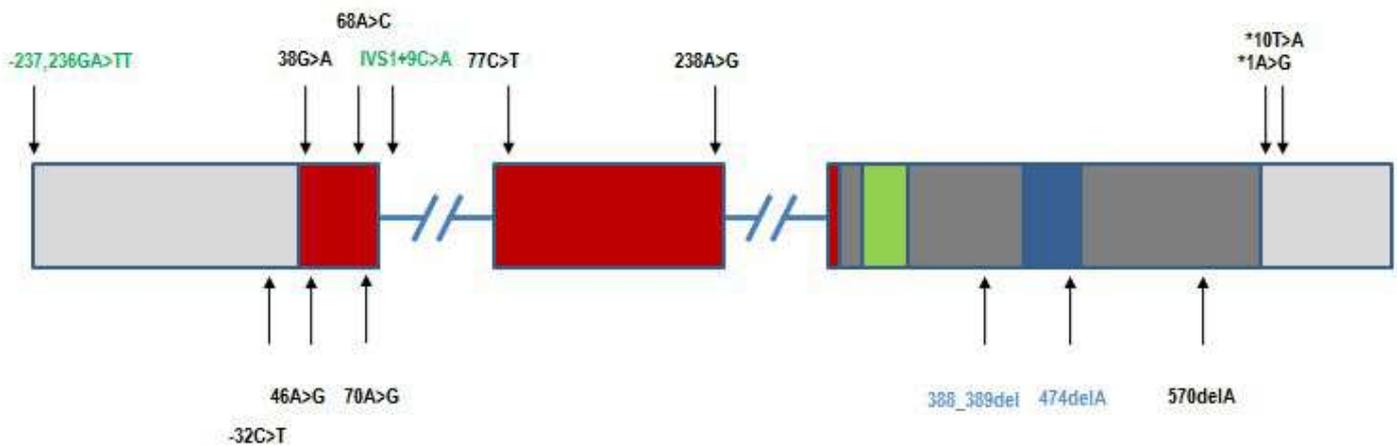


Abbildung 1: Schematische Darstellung des *THAP1*-Gens mit den gefundenen Mutationen. Untranslatierte Regionen sind hellgrau dargestellt, kodierende Regionen farblich: Rot - THAP-Domäne, Grün – Prolinreiche Region, Blau – NLS. Entdeckte Punktmutationen sind schwarz dargestellt, bekannte Polymorphismen grün. Die in den verwendeten Hautfibroblasten untersuchten Mutationen sind blau dargestellt

Nach Identifikation der Sequenzvarianten im *THAP1*-Gen wurde mit verschiedenen Techniken die Pathogenität dieser Mutationen überprüft.

Zunächst wurde der Effekt der Missensemutationen im kodierenden Bereich des *THAP1*-Gens mit den Software-Programmen SIFT und PolyPhen2 geprüft. Diese Programme ermöglichen Vorhersagen bezüglich der Pathogenität von Sequenzvarianten anhand der physikalischen Eigenschaften der ausgetauschten Aminosäuren im Vergleich zu der Wildtypvariante des THAP1-Proteins

PolyPhen2 stufte die Mutationen c.38G>A, c.46A>G und c.77C>T als wahrscheinlich pathogen (*probably damaging*) und die Mutation c.68A>C als möglicherweise pathogen (*possibly damaging*) ein. Die Mutationen c.70A>G und c.238A>G wurden von der Software als benigne Varianten klassifiziert. Bei der Analyse durch die SIFT Software wurde allen Mutationen außer c.238A>G ein Effekt auf die Funktion des THAP1-Proteins zugeschrieben. Die einzelnen Scores sind Tabelle 3 zu entnehmen.

Durch die Tatsache, dass als Funktion des THAP1-Proteins die Regulation der Expression des *TOR1A*-Gens identifiziert wurde^{2, 52}, bot sich hierin eine weitere Möglichkeit die entdeckten Mutationen auf ihre Pathogenität zu überprüfen. Die Arbeitsgruppe der Humangenetik der Universität zu Lübeck nutze hierfür die von ihnen etablierte Methode des Luciferase-

Reportergen-Assays, um die Aktivität der verschiedenen *THAP1*-Mutationen am *TORIA*-Promotor mit der des Wildtyp-*THAP1* zu vergleichen.¹

Hierbei wurde der Mutation c.68A>C (His23Pro) der stärkste Effekt auf die Transkription von *TORIA* nachgewiesen (Reduktion um 80%), während für die Mutation c.238A>G (Ile80Val) keine Beeinflussung der Transkription festgestellt werden konnte.

Die Analyse der Aktivität der sechs Missensemutationen als Transkriptionsfaktor lieferten folgende Ergebnisse: Am drastischen (80 %) war die Aktivität bei der Mutation c.68A>C (His23Pro) verringert. Eine Reduktion auf ca. 50 % zeigte sich für die Mutationen c.70A>G (Lys24Glu), c.46A>G (Lys16Glu) und c.77C>T (Pro26Leu). Für die Mutation c.38G>A (Arg13His) zeigte sich ein Reduktion um ca. 20 %. Bei der Mutation c.238A>G (Ile80Val) konnte keine Beeinflussung der *THAP1*-Aktivität als Transkriptionsfaktor festgestellt werden.

Die Pathogenität der Mutation c.570delA (Lys190fs199X) führten wir auf einem veränderten Import in den Zellkern zurück. Obwohl das NLS nicht direkt von der Deletion und der daraus resultierenden Leserasterverschiebung betroffen ist, stellten wir die Hypothese auf, dass der Transport des veränderten THAP1-Proteins für die Pathogenität der Mutation verantwortlich sei. Zur Überprüfung der Hypothese wurde die subzelluläre Verteilung eines Wildtyp THAP-GFP (*Green Fluorescent Protein*)-Fusionsproteins mit der der p.Lys190fs199X Variante verglichen. Diese Experimente wurden nicht von mir durchgeführt und sollen deshalb nicht im Detail beschrieben werden. Für Einzelheiten sei auf die Veröffentlichung verwiesen.³⁶

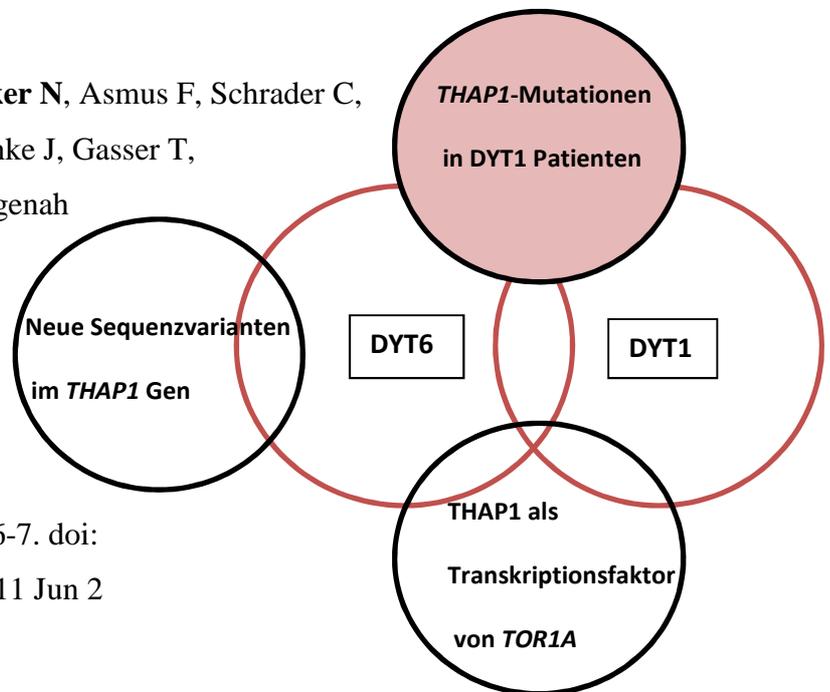
Die Untersuchungen der Mutation c.570delA (Lys190fs199X) zeigten einen verringerten Import des veränderten THAP1-Proteins in den Zellkern. Während das Wildtyp-THAP1-GFP Fusionsprotein ausschließlich im Zellkern gefunden wurde, konnte das verkürzte THAP1 Protein auch im Zytoplasma festgestellt werden. (Siehe Figure 2 der Veröffentlichung³⁶)

Die Pathogenität der entdeckten Sequenzvarianten in den nicht-kodierenden Abschnitten (c.-3C>T und c.*1A>G + c.*10A>T) konnte nicht überprüft werden. Um zu beurteilen, ob z. B. die mRNA-Stabilität auf Grund der veränderten Sequenz in den 5'- und 3'-UTRs herabgesetzt ist oder Splicing-Prozesse beeinflusst werden, konnte nicht evaluiert werden, da kein Patientenmaterial zur Gewinnung von RNA zur Verfügung stand. Es konnte auch nicht festgestellt werden, ob die beiden heterozygoten Substitutionen in der 3'-UTR auf dem gleichen oder jede auf einem anderen Allel vorliegen. Hierzu wäre Material von den Eltern oder engen Verwandten zur Sequenzierung nötig gewesen, was zum Zeitpunkt der Untersuchungen nicht verfügbar war. Mögliche Klonierungsexperimente zur Trennung der

Allele wurden nicht durchgeführt, da sie keinen Informationsgewinn bezüglich der Fragestellung geliefert hätten.

4.2. Einfluss von *THAP1*/*DYT6*-Mutationen auf Penetranz und Ausprägung der *DYT1*-Dystonie

Publikation: Kamm C, Uflacker N, Asmus F, Schrader C, Wolters A, Wittstock M, Pahnke J, Gasser T, Volkmann J, Münchau A, Hagenah J, Benecke R, Klein C, Lohmann K. No evidence for *THAP1*/*DYT6* variants as disease modifiers in *DYT1* dystonia. *Mov Disord.* 2011 Sep;26(11):2136-7. doi: 10.1002/mds.23777. Epub 2011 Jun 2



Bei der Sequenzierung des *THAP1*-Gens der 40 Probanden (26 Patienten, 14 Kontrollen) mit der für die *DYT1*-Dystonie typischen GAG-Deletion im *TOR1A*-Gen konnten keine *THAP1*-Mutationen festgestellt werden.

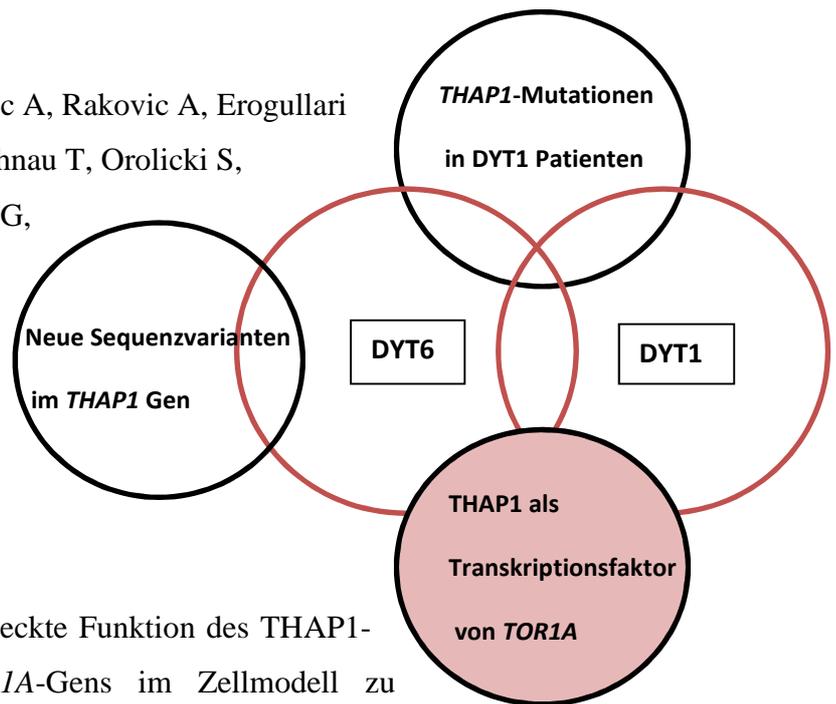
Die Häufigkeit bekannter Polymorphismen ist in Tab. 5 aufgelistet, wobei sich keine signifikanten Unterschiede zeigten.

Tabelle 5: Verteilung von Polymorphismen im untersuchten Patientenkollektiv mit GAG-Deletion im *TOR1A*-Gen

Polymorphismus	Patienten - <i>TOR1A</i> -Mutationsträger mit manifester <i>DYT1</i> -Dystonie (n)	Kontrollen – Träger einer klinisch inapparenten <i>TOR1A</i> -Mutation (n)
236,235GA>TT	2	1
IVS1+126C/T	5	3
IVS3-87 A>G	2	2
IVS1+9C>A	0	3

4.3. Die Rolle von THAP1 als Transkriptionsfaktor auf die Expression des *TORIA*-Gen

Publikation: Kaiser FJ, Osmanoric A, Rakovic A, Erogullari A, Uflacker N, Braunholz D, Lohnau T, Orolicki S, Albrecht M, Gillessen-Kaesbach G, Klein C, Lohmann K. The dystonia gene DYT1 is repressed by the transcription factor THAP1 (DYT6). *Ann Neurol.* 2010 Oct;68(4):554-9. doi: 10.1002/ana.22157



Um die in der *in-vitro*-Analyse entdeckte Funktion des THAP1-Proteins als Repressor des *TORIA*-Gens im Zellmodell zu bestätigen, die Expression beider Gene in Fibroblasten von *THAP1*-Mutationsträgern und Kontrollprobanden ohne Mutation untersucht. Zunächst wurde mittels *Real-Time-PCR* der Gehalt an *THAP1*- bzw. *TORIA*-mRNA, die aus den jeweiligen Zellen gewonnen wurde, bestimmt.

Für die Expression von *TORIA* konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den Zellen von *THAP1*-Mutationsträgern und gesunden Kontrollen festgestellt werden. Lediglich, wenn die Expression von *TORIA* gegen das Referenzgen *YWHAZ* gemessen wurde, zeigte sich in den Patientenzellen eine höhere relative Konzentration von *TORIA*.

Bezüglich der Expression von *THAP1* zeigten sich Unterschiede zwischen der Patienten- und der Kontrollgruppe. In Abhängig vom Referenzgen lag eine Erhöhung der *THAP1*-Expression in Patientenzellen von 25-55 % vor. (Abb.2)

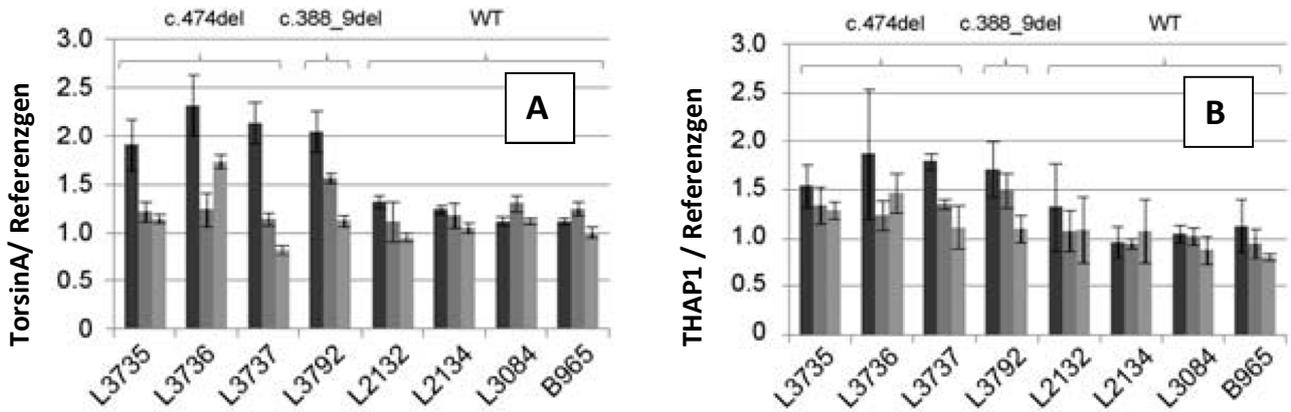


Abbildung 2: Relative *TorsinA*-Expression (A) und *THAP1* (B) bei Patienten und *THAP1*-Mutationsträgern; gemessen gegen drei Referenzgene: *YWHAZ* (Dunkel Grau), *HPRT* (Grau), *PBGD* (Hell Grau)

Um eine deutlich höhere Erniedrigung des *THAP1*-Gehalts und damit mutmaßlich eine Auswirkung auf die *TOR1A*-Expression zu bewirken, wurden Fibroblasten eines gesunden Probanden transient mit verschiedener *THAP1*-siRNA transfiziert. Der Erfolg der Transfektion wurde anhand eines erniedrigten Gehalts an *THAP1*-mRNA in der *Real-Time-PCR* nachgewiesen. Hierbei konnte eine Verringerung der *THAP1*-mRNA um 30-50 % nach 48 stündiger Inkubation erreicht werden. Als Kontrolle wurden Zellen mit siRNA gegen das artifizielle GFP-Protein transfiziert, was den Gehalt von *THAP1*-mRNA nicht veränderte.

Die Expression von *TOR1A* blieb von der Reduktion an *THAP1* unbeeinflusst. Lediglich gegen das Referenzgen *YWHAZ* gemessen, war der Gehalt an *TOR1A*-mRNA erhöht.

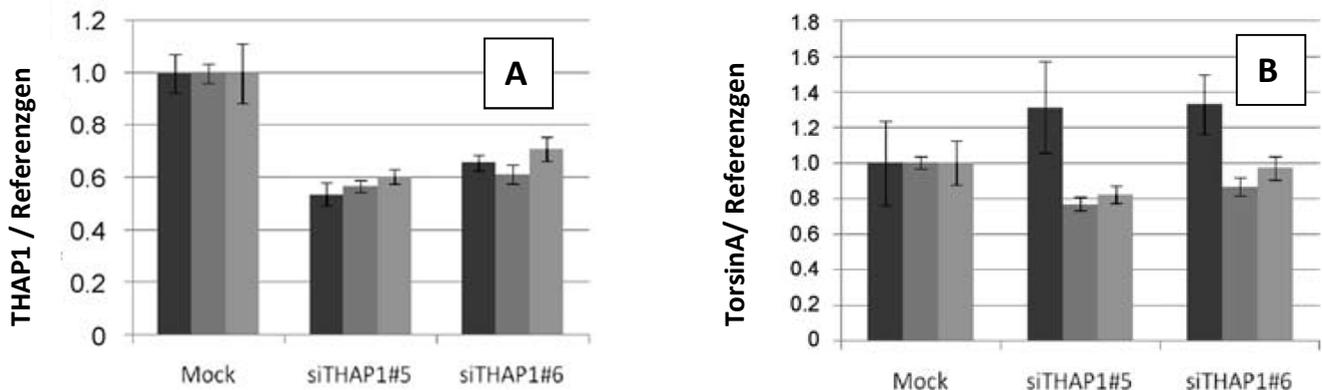


Abbildung 3: Relative *THAP1*- (A) und *TOR1A*-Expression (B) nach Transfektion gemessen in der RT-PCR. Als Referenzgene dienten *YWHAZ* (dunkel Grau), *HPRT* (Grau) und *PBGD* (Hell Grau)

Ob Unterschiede in der Expression von THAP1 bzw. TorsinA zwischen Patienten und Kontrollen vorliegen sollte auch auf Proteinebene nachgewiesen werden. Hierzu wurden Proteinextrakte aus den jeweiligen Zelllinien gewonnen, mit denen ein Westernblot durchgeführt wurde.

Hierbei konnte kein Unterschied im Gehalt an TorsinA oder THAP1 zwischen den einzelnen Gruppen nachgewiesen werden (siehe Abb.4)

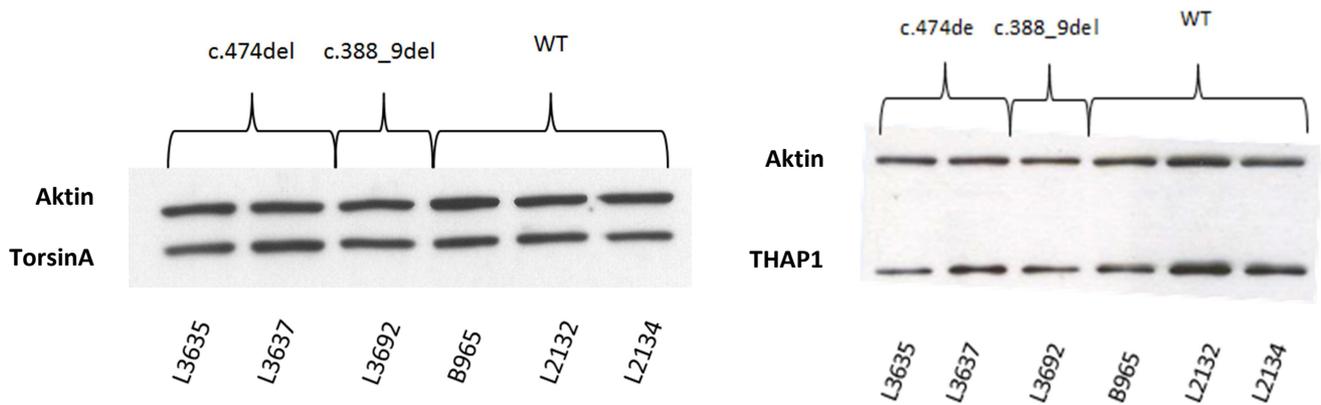


Abbildung 4: Westernblots der Proteinlysate. Links: Aktin und TorsinA. Rechts: Aktin und THAP1. Es konnte kein Unterschied in der Konzentration von TorsinA oder THAP1 zwischen den beiden Gruppen (Mutationsträger gg. WT) festgestellt werden. Aktin diente als Ladekontrolle

5. Diskussion

5.1. Pathogenität der Sequenzvarianten im *THAP1*-Gen

In der von mir untersuchten Kohorte von 567 Dystoniepatienten konnten insgesamt 10 neue Sequenzvarianten identifiziert werden.

Dies entspricht einer Häufigkeit von 1,8 %.

Bei sechs von ihnen handelt es sich um

Missensemutationen (1,1 %), einer

Mutation, die eine

Leserasterverschiebung zur Folge hat

(0,2 %), sowie bei dreien um

Alterationen in den nicht-kodierenden Abschnitten (0,5 %).

Alle gefunden Missensemutationen betreffen die DNA-bindende

THAP-Domäne des Proteins, wobei sich der Effekt auf die

Funktionalität des Proteins unterscheidet. Fünf der Mutationen (c.70A>G, c.38G>A,

c.46A>G, c.68A>C, c.77C>T) scheinen einen pathogenen Effekt aufzuweisen. Bei den

Mutationen c.77C>T, c.68A>C und c.46A>G korrelieren die Vorhersagen der Softwares SIFT

und PolyPhen-2 eng mit den *in-vitro*-Ergebnissen der Luciferase-Reporter-Gen-Assays. Der

Mutation c.38G>A wurde zwar ein Effekt in der *in-silico*-Analyse zugeschrieben, dieser

bestätigte sich aber in den Luciferase-Reporter-Gen-Assays nicht besonders ausgeprägt. Bei der

Mutation c.70A>G zeigte sich eine deutliche Reduktion der *THAP1*-Aktivität *in vitro*, die

PolyPhen-2 Software klassifizierte die Sequenzvariante jedoch als benigne.

Das klinische Bild der Mutationsträger zeigt einen für die DYT6-Dystonie typischen Befund:

Das Erkrankungsalter der fünf Träger einer Mutation mit pathogenem Effekt lag zwischen

dem 6. und dem 11. Lebensjahr und die Dystonie manifestierte sich zuerst an Arm (n=3) oder

Hals (n=2). Ferner zeigte sich bei allen Betroffenen eine Progression zu einer generalisierten

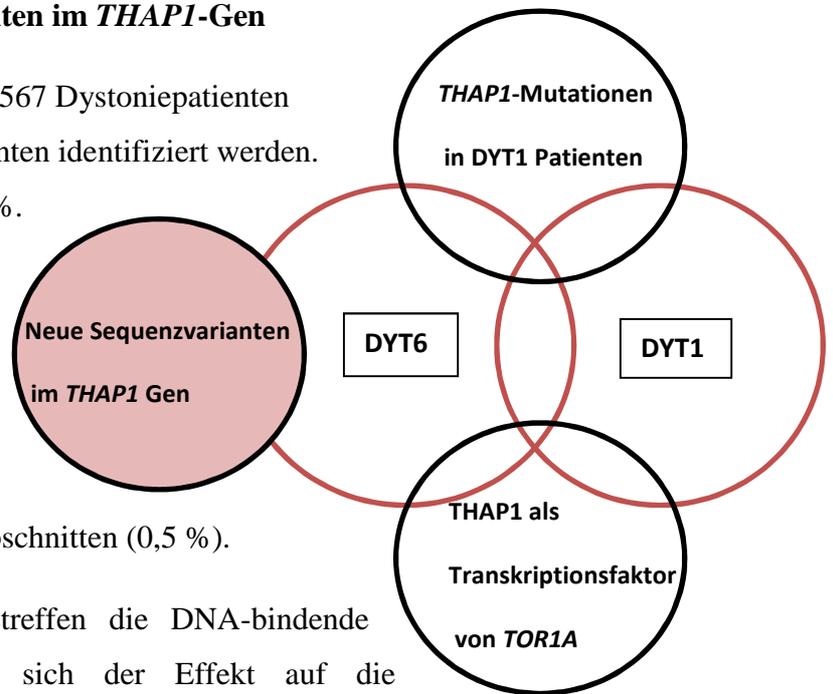
(n=3) oder segmentalen Dystonie (n=2), was bei mehr als 80 % der bisher beschriebenen

Patienten der Fall war. Auch die Tatsache, dass bei 4 von 5 Trägern der Missensemutationen

das Sprachvermögen beeinflusst war, deckt sich mit den Angaben in der Literatur, wo eine

Beteiligung der Sprache bei über 60 % der Betroffenen angegeben wird.^{22-26, 31, 32, 39, 44, 45} Von

allen neu identifizierten Patienten mit Missensemutationen wiesen nur zwei (L4155/c.68A>C



und L4318/c.77C>T) eine positive Familienanamnese auf. Bei ebendiesen Mutationen zeigte sich in den Luciferase-Reportergen-Assays die stärkste Reduktion der *THAP1*-Aktivität (auf 20 und 40%). Möglicherweise zeichnen sich diese Mutationen auf Grund ihrer starken Beeinträchtigung der *THAP1*-Funktion durch eine höhere Penetranz aus, was dazu führt, dass mutationstragende Familienmitglieder ebenfalls Symptome zeigen.

Auch bei der Missensemutation c.238A>G korrelieren die Ergebnisse der *in silico*- und *in vitro*-Analyse stark: Beide Softwares stuften die Mutation als benigne ein und die *THAP1* Aktivität am *TORIA*-Promotor unterschied sich nicht von der der Wildtyp-Sequenz. Auch der Effekt auf das *THAP1*-Protein legt die Vermutung nahe, dass es sich bei dieser Sequenzvariante um eine benigne Variante handelt. Durch die Substitution von Isoleucin zu Valin werden zwei Aminosäuren der Gruppe der unpolaren Aminosäuren gegeneinander ausgetauscht, die sich strukturell sehr ähnlich sind. Ferner wurde Lysin 70 als letzte Aminosäure identifiziert, die an der DNA-Bindung durch die *THAP*-Domäne beteiligt ist.⁵³ Isoleucin bzw. Valin 80 ist somit wahrscheinlich nicht mehr für diese Funktion des Proteins verantwortlich. Auch der klinische Befund des betroffenen Patienten unterscheidet sich von denen der anderen Mutationsträger. Mit 41 Lebensjahren liegt das Erkrankungsalter deutlich über jenem, welches man bei einer *DYT6*-Dystonie typischerweise erwarten würde. Darüber hinaus blieb die Symptomatik des Betroffenen im Sinne einer fokalen Dystonie auf den Hals beschränkt und die Stimme ist nicht beeinträchtigt. Letzten Endes kann aber nicht mit absoluter Sicherheit ausgeschlossen werden, dass die Substitution von Isoleucin zu Valin an Position 80 eine andere Funktion des *THAP1*-Proteins beeinflusst und somit für die Symptomatik des Patienten verantwortlich ist.

Im Gegensatz dazu konnte durch den Nachweis eines gestörten Imports des verkürzten *THAP1*-Proteins (p.Lys190fs199X) in den Zellkern die Pathogenität dieser Mutation nachgewiesen werden. Zwar betrifft die Leserasterverschiebung nicht die NLS-Domäne direkt, da sich diese von Aminosäure 146 bis 162 erstreckt⁴⁹, doch unsere Ergebnisse suggerieren, dass die Funktion dieser Region dennoch eingeschränkt ist. Wahrscheinlich ist der Effekt der Mutation auf eine gestörte Proteinfaltung in Richtung C-Terminus des NLS zu erklären, die die korrekte Bildung des NLS und somit dessen Bindung an Proteine, die für den Import in den Zellkern verantwortlich sind, stört. Die klinischen Daten des betroffenen Patienten spiegeln auch nicht das typische Bild einer *DYT6*-Dystonie wieder. Zum einen manifestierte sich die Krankheit erst im 49. Lebensjahr und hat sich in 10 Jahren nicht weiter auf andere Körperregionen ausgebreitet. Ferner ist das Sprachvermögen des Patienten nicht

beeinflusst. Diese Befundkonstellation ist möglicherweise darauf zurückzuführen, dass trotz des gestörten Imports des verkürzten Proteins immer noch relativ viel funktionelles THAP1 im Zellkern zur Verfügung steht und als Transkriptionsfaktor fungieren kann. Dies könnte den relativ späten Krankheitsbeginn und die vergleichsweise milde Symptomatik des Patienten erklären.

Über den Effekt der Sequenzvarianten in den nicht-kodierenden Regionen lässt sich auf Grund des Mangels an Untersuchungsmaterial nichts aussagen. Deswegen wäre eine Korrelation zu den klinischen Befunden dieser beiden Patienten rein spekulativer Natur.

Die Ergebnisse bezüglich des Polymorphismus -237,236GA>TT suggerieren eine mögliche Assoziation mit einzelnen Subtypen der Dystonie. Am häufigsten wurde diese Sequenzvariation bei Patienten mit zervikaler und Musikerdystonie gefunden, wobei die Anzahl der Probanden zu klein ist, um verlässliche Aussagen bezüglich einer Assoziation zu treffen. Die Daten einer anderen Arbeitsgruppe, deren Studienpopulation hauptsächlich aus Patienten mit fokalen Dystonien, wie z.B. der zervikalen oder brachialen Dystonie bestand, fanden besagten Polymorphismus interessanterweise öfter bei Patienten als bei Kontrollen.⁴⁵ Diese Befallsmuster sind die häufigsten bei Patienten mit DYT6-Dystonie.²²⁻²⁶ Die Ergebnisse der Arbeitsgruppe von Houlden et al. zeigen keinerlei Assoziation der Dystonie mit dem Polymorphismus.²⁴ Ein möglicher Grund könnte hierbei in der Auswahl der Probanden liegen. Lediglich 20 % litten unter einer fokalen Dystonie und 75 % wiesen einen Krankheitsbeginn von unter 30 Jahren auf. Letztes könnte die Studienpopulation dahingehend beeinträchtigt haben, dass mehr Patienten mit monogenetischer Form der Dystonie vertreten waren statt mit polygenetischen Risikofaktoren, sodass keine Assoziation feststellbar war.

Da die Sequenzvariante IVS1+9C>A nur einmal bei jeweils einem Patienten und einer Kontrolle gefunden wurden, kann keine Aussage über eine mögliche Assoziation mit der DYT6-Dystonie getroffen werden.

Insgesamt konnten also in unserer Patientenkohorte zehn neue Sequenzvarianten identifiziert werden, wobei für sechs von ihnen ein funktioneller Effekt bestätigt werden konnte. Unsere Untersuchungen demonstrieren weiterhin, dass allein die Identifikation von Mutationen im *THAP1*-Gen nicht ausreichend ist, um eine Aussage über etwaige Pathogenität zu treffen. An die Analyse der Sequenz des *THAP1*-Gen sollte sich im Idealfall eine angemessene funktionelle Untersuchung anschließen.

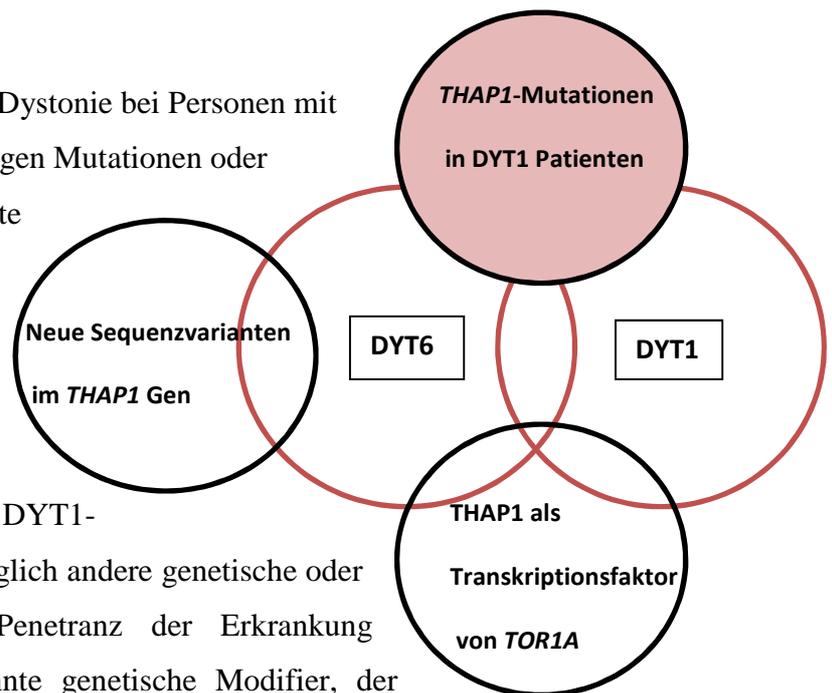
5.2. Einfluss von *THAP1*/*DYT6*-Mutationen auf Penetranz und Ausprägung der *DYT1*-Dystonie

Die Hypothese, dass die Ausprägung der Dystonie bei Personen mit GAG-Deletion im *TOR1A*-Gen von etwaigen Mutationen oder SNPs im *THAP1*-Gen abhängig ist, konnte durch unsere Experimente nicht bestätigt werden.

Somit konnte durch unsere Versuche keine Erklärung für die variable Penetranz und Krankheitsausprägung der *DYT1*-

Dystonie erbracht werden. Es müssen folglich andere genetische oder Umweltfaktoren vorliegen, die die Penetranz der Erkrankung beeinflussen. Der bisher einzige bekannte genetische Modifier, der D216H- Polymorphismus im *TOR1A*-Gen selbst, könnte bei einem Teil unserer Patienten eine mögliche Erklärung für das Vorliegen-, bzw. das Nicht-Vorliegen von Dystonie-Symptomen sein. Mutationsträger des H-Allels haben ein geringeres Risiko bei bestehender GAG-Deletion eine *DYT1*-Dystonie zu entwickeln. Unser Patientenkollektiv wurde nicht auf das Vorhandensein des D216H-Polymorphismus überprüft, sodass in diesem Fall keine Aussagen hierzu gemacht werden können.

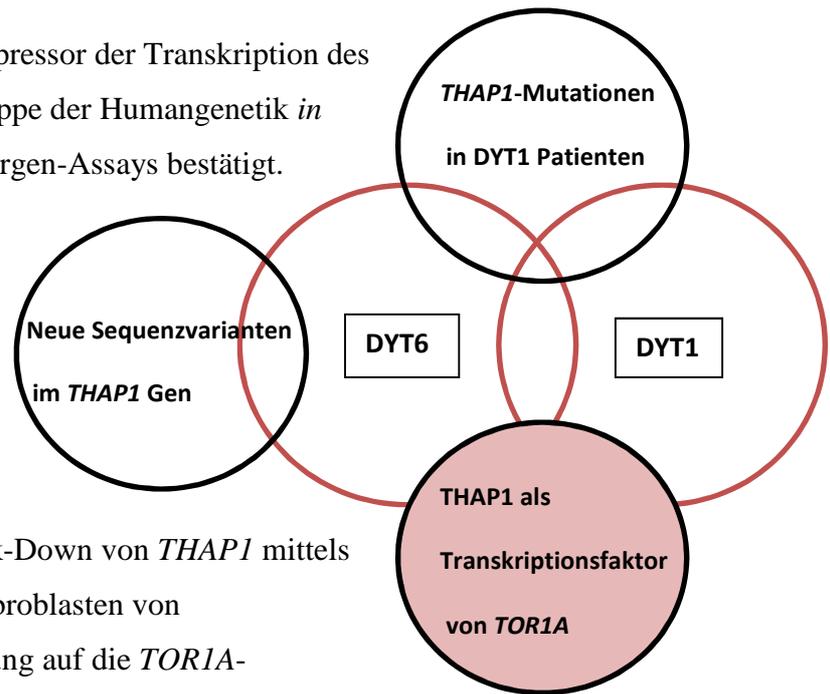
Bezüglich der potentiell mit der *DYT-6* Dystonie assoziierten Polymorphismen ließ sich ebenfalls kein eindeutiger Trend feststellen. Um Assoziationen der bekannten Polymorphismen mit statistischer Relevanz nachweisen zu können, sind bedeutend größere Kohorten von *DYT1*-Dystonie Patienten erforderlich.



5.3. Die Rolle von THAP1 als Transkriptionsfaktor auf die Expression von TOR1A

Die Funktion des THAP1-Proteins als Repressor der Transkription des *TOR1A*-Gens wurde durch die Arbeitsgruppe der Humangenetik *in vitro* durch ChIP- und Luciferase-Reportergen-Assays bestätigt.

Erstaunlicherweise konnte der Effekt von verkürztem THAP1 auf die Expression von *TOR1A* im Zellmodell nicht nachgewiesen werden. Die erwartete höhere Expression von *TOR1A* in Patientenzellen konnte in der RT-PCR nicht festgestellt werden. Auch der Knock-Down von *THAP1* mittels transienter Transfektion von siRNA in Fibroblasten von Kontrollprobanden zeigte keine Auswirkung auf die *TOR1A*-Expression.



Auch auf Proteinebene war kein Unterschied zwischen *THAP1*-Mutationsträgern und entsprechenden Kontrollen festzustellen.

Interessanterweise wurde aber eine erhöhte Konzentration von *THAP1*-mRNA in Patientenzellen mit verkürztem THAP1-Protein festgestellt werden. Diese Ergebnisse legen die Vermutung nahe, dass das mutierte Allel in allen untersuchten Patienten stabil ist und die mRNA keinem Abbaumechanismus unterworfen wird.

Die höhere Expression von *THAP1* in Mutationsträgern ist am ehesten durch eine Autoregulation des *THAP1*-Gens durch das THAP1-Protein selbst zu erklären. Wie die Ergebnisse von Erogullari et al zeigen (*noch nicht veröffentlicht*), bindet *THAP1* an mehrere THABS innerhalb des *THAP1*-Promoter und unterdrückt dort seine eigene Expression. Diese physiologische Feedbackschleife bewirkt folglich eine Überexpression von *THAP1* in Mutationsträgern und könnte somit einen kompensatorischen Effekt haben. Dies könnte ein Grund dafür sein, dass keine Veränderung in der Expression von *TOR1A* in unseren Versuchen nachweisbar war.

Möglicherweise ist die autoregulatorische Funktion des THAP1-Proteins dafür verantwortlich, dass über längeren Zeitraum der Einfluss des mutierten Allels kompensiert werden kann. Das Auftreten der Dystonie, bzw. deren Progredienz in ein generalisiertes

Stadium könnte auftreten, sobald dieser kompensatorische Effekt nicht mehr ausreichend ist und die Regulation anderer Zielgene von THAP1, wie z. B. *TORIA*, zu stark gestört ist.

Ein anderer Grund dafür, dass in unseren Experimenten kein Effekt auf die Expression von *TORIA* nachgewiesen werden konnte, könnte an den verwendeten Zellen liegen. Die Dystonie ist eine neurologische Bewegungsstörung. In unseren Versuchen wurden auf Grund der relativ komplikationslosen Gewinnung von Patientenmaterial Hautfibroblasten verwendet. Denkbar ist, dass die Interaktion von THAP1 und *TORIA* in neuronalem Gewebe deutlich ausgeprägter ist. Es ist ebenso denkbar, dass die Regulation von *TORIA* durch THAP1 zu bestimmten Abschnitten in der Gehirnentwicklung eine größere Rolle spielt, als zu einem späterem Zeitpunkt. In Versuchen an Mäusen konnte z. B. gezeigt werden, dass die *TORIA*-Expression in der perinatalen Phase am höchsten ist.⁵⁴ Der jüngste unserer untersuchten Patienten war 36 Jahre alt als die Hautbiopsie durchgeführt wurde, sodass etwaige Effekte von THAP1 auf die *TORIA*-Expression, die früher eine Rolle in der Pathogenese der DYT6-Dystonie gespielt haben könnten, nicht mehr nachzuweisen sind.

5.4. Schlussfolgerungen

Im untersuchten Patientenkollektiv von 567 Patienten mit primärer Dystonie konnten insgesamt zehn bisher unbeschriebene Mutationen bei neun Individuen entdeckt werden. Es handelt sich hierbei in sechs Fällen um Missensemutationen, die allesamt die THAP-Domäne des THAP1-Proteins betreffen. Ferner wurde eine Deletion identifiziert, die eine Leserasterverschiebung in unmittelbarer Nähe zu den für das NLS kodierenden Bereich zur Folge hat. Drei weitere Punktmutationen betreffen den nicht kodierenden Bereich in der 5' – bzw. 3'-UTR.

Nach anschließenden funktionellen Untersuchungen der Pathogenität der gefundenen Varianten mittels *in-silico*-Analyse und Luciferase-Reporter-Gen-Assays konnten bei sechs der gefunden Mutationen ein pathogener Effekt nachgewiesen werden. Dies entspricht einer Frequenz von 1,1 %. Unsere Untersuchungen zeigen somit ferner, dass die DYT6-Dystonie ein eher seltener Auslöser einer primären Dystonie ist und dass sich Mutationsanalysen idealerweise eine funktionelle Diagnostik anschließen sollte, um benigne von pathogenen Sequenzvarianten unterscheiden zu können.

Bezüglich des mutmaßlich mit der DYT6-Dystonie assoziierten Polymorphismus - 237,236GA>TT zeigte sich ein häufigeres Auftreten in einzelnen Subgruppen unserer Studienpopulation, nämlich bei Patienten mit Beteiligung der orofazialen, zervikalen oder Handmuskeln. Die Gesamtzahl der Betroffenen ist allerdings zu klein um eine statistisch relevante Assoziation feststellen zu können.

Die aufgestellte Hypothese, dass die Penetranz der DYT1-Dystonie möglicherweise von Sequenzvarianten des *THAP1*-Gens beeinflusst werden könnte, konnte in den durchgeführten Experimenten nicht bestätigt werden. Obwohl die Transkription des *TOR1A*-Gens vom THAP1-Protein beeinflusst wird, liegen wahrscheinlich andere Faktoren bzw. Umwelteinflüsse der variablen Penetranz der DYT1-Dystonie zu Grunde.

Der erwartete Effekt von verkürztem THAP1 auf die Expression von *TOR1A* konnte in den von mir verwendeten Hautfibroblasten nicht bestätigt werden. Es zeigte sich weder auf mRNA- noch auf Proteinebene ein Unterschied des *TOR1A*-Gehalts zwischen Patienten und Kontrollprobanden. Diese Ergebnisse sind am ehesten auf den unten beschriebenen autoregulatorischen Effekt von THAP1 zurückzuführen. Ferner könnte auch der Effekt von THAP1 auf die *TOR1A*-Expression gewebe- oder entwicklungsstadiums-spezifisch, und somit in Fibroblasten nicht nachweisbar sein.

Interessanterweise wurde ein höherer Gehalt an THAP1 bei Patienten mit verkürzenden Mutationen nachweisen. Dies ist wahrscheinlich auf eine autoregulatorische Funktion des THAP1-Proteins zurückzuführen, welches als Repressor an seinen eigenen Promotor bindet und dort seine eigene Transkription beeinflusst. Möglicherweise kann der Effekt des mutierten *THAP1*-Allels so über einen gewissen Zeitraum kompensiert werden, bis ein bestimmter Grenzwert überschritten ist.

6. Literaturverzeichnis

1. Uflacker N, Lohmann K, Erogullari A, Lohnau T, Winkler S, Dendorfer A, Schneider SA, Osmanovic A, Svetel M, Ferbert A, Zittel S, Kuhn AA, Schmidt A, Altenmuller E, Munchau A, Kamm C, Wittstock M, Kupsch A, Moro E, Volkmann J, Kostic V, Kaiser FJ, Klein C, Bruggemann N. Identification and functional analysis of novel THAP1 mutations. *Eur J Hum Genet.* 2012 Feb;20(2):171-5.
2. Kaiser FJ, Osmanovic A, Rakovic A, Erogullari A, Uflacker N, Braunholz D, Lohnau T, Orolicki S, Albrecht M, Gillessen-Kaesbach G, Klein C, Lohmann K. The dystonia gene DYT1 is repressed by the transcription factor THAP1 (DYT6). *Ann Neurol.* 2010 Oct;68(4):554-9.
3. Kamm C, Uflacker N, Asmus F, Schrader C, Wolters A, Wittstock M, Pahnke J, Gasser T, Volkmann J, Munchau A, Hagenah J, Benecke R, Klein C, Lohmann K. No evidence for THAP1/DYT6 variants as disease modifiers in DYT1 dystonia. *Mov Disord.* 2011 Sep;26(11):2136-7.
4. Fahn S, Bressman SB, Marsden CD. Classification of dystonia. *Adv Neurol.* 1998;78:1-10.
5. Nutt JG, Muenter MD, Melton LJ, 3rd, Aronson A, Kurland LT. Epidemiology of dystonia in Rochester, Minnesota. *Adv Neurol.* 1988;50:361-5.
6. Tarsy D, Simon DK. Dystonia. *N Engl J Med.* 2006 Aug 24;355(8):818-29.
7. Lohmann K, Klein C. Genetics of dystonia: what's known? What's new? What's next? *Mov Disord.* 2013 Jun 15;28(7):899-905.
8. Albanese A, Bhatia K, Bressman SB, DeLong MR, Fahn S, Fung VS, Hallett M, Jankovic J, Jinnah HA, Klein C, Lang AE, Mink JW, Teller JK. Phenomenology and classification of dystonia: a consensus update. *Mov Disord.* 2013 Jun 15;28(7):863-73.
9. Schmidt A, Schneider SA, Hagenah J, Klein C. [Dystonia]. *Nervenarzt.* 2008 Sep;79 Suppl 2:53-63; quiz 4-5.
10. Xiao J, Uitti RJ, Zhao Y, Vemula SR, Perlmutter JS, Wszolek ZK, Maraganore DM, Auburger G, Leube B, Lehnhoff K, LeDoux MS. Mutations in CIZ1 cause adult onset primary cervical dystonia. *Ann Neurol.* 2012 Apr;71(4):458-69.
11. Charlesworth G, Plagnol V, Holmstrom KM, Bras J, Sheerin UM, Preza E, Rubio-Agusti I, Ryten M, Schneider SA, Stamelou M, Trabzuni D, Abramov AY, Bhatia KP, Wood NW. Mutations in ANO3 Cause Dominant Craniocervical Dystonia: Ion Channel Implicated in Pathogenesis. *Am J Hum Genet.* 2012 Dec 7;91(6):1041-50.
12. Fuchs T, Saunders-Pullman R, Masuho I, Luciano MS, Raymond D, Factor S, Lang AE, Liang TW, Trosch RM, White S, Ainehsazan E, Herve D, Sharma N, Ehrlich ME, Martemyanov KA, Bressman SB, Ozelius LJ. Mutations in GNAL cause primary torsion dystonia. *Nat Genet.* 2012 Dec 16;45(1):88-92.
13. Lohmann K, Wilcox RA, Winkler S, Ramirez A, Rakovic A, Park JS, Arns B, Lohnau T, Groen J, Kasten M, Bruggemann N, Hagenah J, Schmidt A, Kaiser FJ, Kumar KR, Zschiedrich K, Alvarez-Fischer D, Altenmuller E, Ferbert A, Lang AE, Munchau A, Kostic V, Simonyan K, Agzarian M,

- Ozelius LJ, Langeveld AP, Sue CM, Tijssen MA, Klein C. Whispering dysphonia (DYT4 dystonia) is caused by a mutation in the TUBB4 gene. *Ann Neurol*. 2012 Dec 13.
14. Almasy L, Bressman SB, Raymond D, Kramer PL, Greene PE, Heiman GA, Ford B, Yount J, de Leon D, Chouinard S, Saunders-Pullman R, Brin MF, Kapoor RP, Jones AC, Shen H, Fahn S, Risch NJ, Nygaard TG. Idiopathic torsion dystonia linked to chromosome 8 in two Mennonite families. *Ann Neurol*. 1997 Oct;42(4):670-3.
 15. Bressman SB, Sabatti C, Raymond D, de Leon D, Klein C, Kramer PL, Brin MF, Fahn S, Breakefield X, Ozelius LJ, Risch NJ. The DYT1 phenotype and guidelines for diagnostic testing. *Neurology*. 2000 May 9;54(9):1746-52.
 16. Bressman SB, de Leon D, Brin MF, Risch N, Burke RE, Greene PE, Shale H, Fahn S. Idiopathic dystonia among Ashkenazi Jews: evidence for autosomal dominant inheritance. *Ann Neurol*. 1989 Nov;26(5):612-20.
 17. Kramer PL, Heiman GA, Gasser T, Ozelius LJ, de Leon D, Brin MF, Burke RE, Hewett J, Hunt AL, Moskowitz C, et al. The DYT1 gene on 9q34 is responsible for most cases of early limb-onset idiopathic torsion dystonia in non-Jews. *Am J Hum Genet*. 1994 Sep;55(3):468-75.
 18. Ozelius LJ, Hewett JW, Page CE, Bressman SB, Kramer PL, Shalish C, de Leon D, Brin MF, Raymond D, Corey DP, Fahn S, Risch NJ, Buckler AJ, Gusella JF, Breakefield XO. The early-onset torsion dystonia gene (DYT1) encodes an ATP-binding protein. *Nat Genet*. 1997 Sep;17(1):40-8.
 19. Nery FC, Zeng J, Niland BP, Hewett J, Farley J, Irimia D, Li Y, Wiche G, Sonnenberg A, Breakefield XO. TorsinA binds the KASH domain of nesprins and participates in linkage between nuclear envelope and cytoskeleton. *J Cell Sci*. 2008 Oct 15;121(Pt 20):3476-86.
 20. Kamm C, Fischer H, Garavaglia B, Kullmann S, Sharma M, Schrader C, Grundmann K, Klein C, Borggraefe I, Lobsien E, Kupsch A, Nardocci N, Gasser T. Susceptibility to DYT1 dystonia in European patients is modified by the D216H polymorphism. *Neurology*. 2008 Jun 3;70(23):2261-2.
 21. Risch NJ, Bressman SB, Senthil G, Ozelius LJ. Intragenic Cis and Trans modification of genetic susceptibility in DYT1 torsion dystonia. *Am J Hum Genet*. 2007 Jun;80(6):1188-93.
 22. Bressman SB, Raymond D, Fuchs T, Heiman GA, Ozelius LJ, Saunders-Pullman R. Mutations in THAP1 (DYT6) in early-onset dystonia: a genetic screening study. *Lancet Neurol*. 2009 May;8(5):441-6.
 23. Djarmati A, Schneider SA, Lohmann K, Winkler S, Pawlack H, Hagenah J, Bruggemann N, Zittel S, Fuchs T, Rakovic A, Schmidt A, Jabusch HC, Wilcox R, Kostic VS, Siebner H, Altenmuller E, Munchau A, Ozelius LJ, Klein C. Mutations in THAP1 (DYT6) and generalised dystonia with prominent spasmodic dysphonia: a genetic screening study. *Lancet Neurol*. 2009 May;8(5):447-52.
 24. Houlden H, Schneider SA, Paudel R, Melchers A, Schwingenschuh P, Edwards M, Hardy J, Bhatia KP. THAP1 mutations (DYT6) are an additional cause of early-onset dystonia. *Neurology*. 2010 Mar 9;74(10):846-50.
 25. Xiao J, Zhao Y, Bastian RW, Perlmutter JS, Racette BA, Tabbal SD, Karimi M, Paniello RC, Wszolek ZK, Uitti RJ, Van Gerpen JA, Simon DK, Tarsy D, Hedera P, Truong DD, Frei KP, Dev Batish S, Blitzer A, Pfeiffer RF, Gong S, LeDoux MS. Novel THAP1 sequence variants in primary dystonia. *Neurology*. 2010 Jan 19;74(3):229-38.

26. Sohn AS, Glockle N, Doetzer AD, Deuschl G, Felbor U, Topka HR, Schols L, Riess O, Bauer P, Muller U, Grundmann K. Prevalence of THAP1 sequence variants in German patients with primary dystonia. *Mov Disord.* 2010 Sep 15;25(12):1982-6.
27. Saunders-Pullman R, Raymond D, Senthil G, Kramer P, Ohmann E, Deligtisch A, Shanker V, Greene P, Tabamo R, Huang N, Tagliati M, Kavanagh P, Soto-Valencia J, Aguiar Pde C, Risch N, Ozelius L, Bressman S. Narrowing the DYT6 dystonia region and evidence for locus heterogeneity in the Amish-Mennonites. *Am J Med Genet A.* 2007 Sep 15;143A(18):2098-105.
28. Fuchs T, Gavarini S, Saunders-Pullman R, Raymond D, Ehrlich ME, Bressman SB, Ozelius LJ. Mutations in the THAP1 gene are responsible for DYT6 primary torsion dystonia. *Nat Genet.* 2009 Mar;41(3):286-8.
29. Blanchard A, Ea V, Roubertie A, Martin M, Coquart C, Claustres M, Beroud C, Collod-Beroud G. DYT6 dystonia: review of the literature and creation of the UMD Locus-Specific Database (LSDB) for mutations in the THAP1 gene. *Hum Mutat.* 2011 Nov;32(11):1213-24.
30. Blanchard A, Roubertie A, Simonetta-Moreau M, Ea V, Coquart C, Frederic MY, Gallouedec G, Adenis JP, Benatru I, Borg M, Burbaud P, Calvas P, Cif L, Damier P, Destee A, Faivre L, Guyant-Marechal L, Janik P, Janoura S, Kreisler A, Lusakowska A, Odent S, Potulska-Chromik A, Rudzinska M, Thobois S, Vuillaume I, Tranchant C, Tuffery-Giraud S, Coubes P, Sablonniere B, Claustres M, Collod-Beroud G. Singular DYT6 phenotypes in association with new THAP1 frameshift mutations. *Mov Disord.* 2011 Aug 1;26(9):1775-7.
31. Bonetti M, Barzaghi C, Brancati F, Ferraris A, Bellacchio E, Giovanetti A, Ialongo T, Zorzi G, Piano C, Petracca M, Albanese A, Nardocci N, Dallapiccola B, Bentivoglio AR, Garavaglia B, Valente EM. Mutation screening of the DYT6/THAP1 gene in Italy. *Mov Disord.* 2009 Dec 15;24(16):2424-7.
32. Clot F, Grabli D, Burbaud P, Aya M, Derkinderen P, Defebvre L, Damier P, Krystkowiak P, Pollak P, Leguern E, San C, Camuzat A, Roze E, Vidailhet M, Durr A, Brice A. Screening of the THAP1 gene in patients with early-onset dystonia: myoclonic jerks are part of the dystonia 6 phenotype. *Neurogenetics.* 2011 Feb;12(1):87-9.
33. De Carvalho Aguiar P, Fuchs T, Borges V, Lamar KM, Silva SM, Ferraz HB, Ozelius L. Screening of Brazilian families with primary dystonia reveals a novel THAP1 mutation and a de novo TOR1A GAG deletion. *Mov Disord.* 2010 Dec 15;25(16):2854-7.
34. Groen JL, Yildirim E, Ritz K, Baas F, van Hilten JJ, van der Meulen FW, Langeveld TP, Tijssen MA. THAP1 mutations are infrequent in spasmodic dysphonia. *Mov Disord.* 2011 Apr 29.
35. Jech R, Bares M, Krepelova A, Urgosik D, Havrankova P, Ruzicka E. DYT 6-A novel THAP1 mutation with excellent effect on pallidal DBS. *Mov Disord.* 2011 Apr;26(5):924-5.
36. Lohmann K, Uflacker N, Erogullari A, Lohnau T, Winkler S, Dendorfer A, Schneider SA, Osmanovic A, Svetel M, Ferbert A, Zittel S, Kuhn AA, Schmidt A, Altenmuller E, Munchau A, Kamm C, Wittstock M, Kupsch A, Moro E, Volkmann J, Kostic V, Kaiser FJ, Klein C, Bruggemann N. Identification and functional analysis of novel THAP1 mutations. *Eur J Hum Genet.* 2012 Feb;20(2):171-5.
37. Paisan-Ruiz C, Ruiz-Martinez J, Ruibal M, Mok KY, Indakoetxea B, Gorostidi A, Masso JF. Identification of a novel THAP1 mutation at R29 amino-acid residue in sporadic patients with early-onset dystonia. *Mov Disord.* 2009 Nov 11.

38. Schneider SA, Ramirez A, Shafiee K, Kaiser FJ, Erogullari A, Bruggemann N, Winkler S, Bahman I, Osmanovic A, Shafa MA, Bhatia KP, Najmabadi H, Klein C, Lohmann K. Homozygous THAP1 mutations as cause of early-onset generalized dystonia. *Mov Disord*. 2011 Apr;26(5):858-61.
39. Van Gerpen JA, Ledoux MS, Wszolek ZK. Adult-onset leg dystonia due to a missense mutation in THAP1. *Mov Disord*. 2010 Jul 15;25(9):1306-7.
40. Dobricic VS, Kresojevic ND, Svetel MV, Jankovic MZ, Petrovic IN, Tomic AD, Novakovic IV, Kostic VS. Mutation screening of the DYT6/THAP1 gene in Serbian patients with primary dystonia. *J Neurol*. 2013 Apr;260(4):1037-42.
41. Xiromerisiou G, Houlden H, Scarmeas N, Stamelou M, Kara E, Hardy J, Lees AJ, Korlipara P, Limousin P, Paudel R, Hadjigeorgiou GM, Bhatia KP. THAP1 mutations and dystonia phenotypes: genotype phenotype correlations. *Mov Disord*. 2012 Sep 1;27(10):1290-4.
42. Miyamoto R, Ohta E, Kawarai T, Koizumi H, Sako W, Izumi Y, Obata F, Kaji R. Broad spectrum of dystonia associated with a novel thanatosis-associated protein domain-containing apoptosis-associated protein 1 mutation in a Japanese family with dystonia 6, torsion. *Mov Disord*. 2012 Sep 1;27(10):1324-5.
43. LeDoux MS, Xiao J, Rudzinska M, Bastian RW, Wszolek ZK, Van Gerpen JA, Puschmann A, Momcilovic D, Vemula SR, Zhao Y. Genotype-phenotype correlations in THAP1 dystonia: molecular foundations and description of new cases. *Parkinsonism Relat Disord*. 2012 Jun;18(5):414-25.
44. Cheng FB, Wan XH, Feng JC, Wang L, Yang YM, Cui LY. Clinical and genetic evaluation of DYT1 and DYT6 primary dystonia in China. *Eur J Neurol*. 2011;18(3):497-503.
45. Groen JL, Ritz K, Contarino MF, van de Warrenburg BP, Aramideh M, Foncke EM, van Hilten JJ, Schuurman PR, Speelman JD, Koelman JH, de Bie RM, Baas F, Tijssen MA. DYT6 dystonia: mutation screening, phenotype, and response to deep brain stimulation. *Mov Disord*. 2010 Oct 30;25(14):2420-7.
46. Xiao J, Zhao Y, Bastian RW, Perlmutter JS, Racette BA, Tabbal SD, Karimi M, Paniello RC, Wszolek ZK, Uitti RJ, Van Gerpen JA, Simon DK, Tarsy D, Hedera P, Truong DD, Frei KP, Blitzer A, Rudzinska M, Pfeiffer RF, Le C, Ledoux MS. The c.-237_236GA>TT THAP1 sequence variant does not increase risk for primary dystonia. *Mov Disord*. 2011 Feb 15;26(3):549-53.
47. Clouaire T, Roussigne M, Ecochard V, Mathe C, Amalric F, Girard JP. The THAP domain of THAP1 is a large C2CH module with zinc-dependent sequence-specific DNA-binding activity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005 May 10;102(19):6907-12.
48. Sabogal A, Lyubimov AY, Corn JE, Berger JM, Rio DC. THAP proteins target specific DNA sites through bipartite recognition of adjacent major and minor grooves. *Nat Struct Mol Biol*. 2010 Jan;17(1):117-23.
49. Osmanovic A, Dendorfer A, Erogullari A, Uflacker N, Braunholz D, Rakovic A, Vierke G, Gil-Rodriguez C, Munchau A, Albrecht M, Bruggemann N, Gillissen-Kaesbach G, Klein C, Lohmann K, Kaiser FJ. Truncating mutations in THAP1 define the nuclear localization signal. *Mov Disord*. 2011 Jul;26(8):1565-7.
50. Roussigne M, Cayrol C, Clouaire T, Amalric F, Girard JP. THAP1 is a nuclear proapoptotic factor that links prostate-apoptosis-response-4 (Par-4) to PML nuclear bodies. *Oncogene*. 2003 Apr 24;22(16):2432-42.

51. Cayrol C, Lacroix C, Mathe C, Ecochard V, Ceribelli M, Loreau E, Lazar V, Dessen P, Mantovani R, Aguilar L, Girard JP. The THAP-zinc finger protein THAP1 regulates endothelial cell proliferation through modulation of pRB/E2F cell-cycle target genes. *Blood*. 2007 Jan 15;109(2):584-94.
52. Gavarini S, Cayrol C, Fuchs T, Lyons N, Ehrlich ME, Girard JP, Ozelius LJ. Direct interaction between causative genes of DYT1 and DYT6 primary dystonia. *Ann Neurol*. 2010 Oct;68(4):549-53.
53. Campagne S, Saurel O, Gervais V, Milon A. Structural determinants of specific DNA-recognition by the THAP zinc finger. *Nucleic Acids Res*. 2010 Jun;38(10):3466-76.
54. Vasudevan A, Breakefield XO, Bhide PG. Developmental patterns of torsinA and torsinB expression. *Brain Res*. 2006 Feb 16;1073-1074:139-45.

7. Anhang

7.1. Danksagung

Diese Dissertation ist meinem Großvater Johann Köster gewidmet, der mich in meiner Kindheit immer dazu angeregt hat Dinge zu hinterfragen, neugierig zu bleiben und Sachverhalten auf den Grund zu gehen. So hat er es geschafft in jungen Jahren mein Interesse für Naturwissenschaften zu wecken, welches mir bis heute erhalten geblieben ist.

Sehr herzlich möchte ich Frau Prof. Dr. Klein für die Möglichkeit danken, im Institut für Neurogenetik arbeiten zu dürfen. Die Betreuung, die ich an ihrem Institut genossen habe, war ausgesprochen herzlich und professionell und hat mir sowohl bei den experimentellen Arbeiten, wie auch in der wissenschaftlichen Ausarbeitung sehr geholfen. Besonders hervorheben möchte ich Frau Thora Lohnau und Dr. Aleksandar Rakovic, die mir jederzeit mit Rat und Tat im Labor zur Seite standen und ohne die die Umsetzung der experimentellen Arbeiten nicht möglich gewesen wäre. Ganz großer Dank gilt Frau PD Dr. rer. nat. Katja Lohmann, die die Konzeption vieler Experimente ausgearbeitet hat, mir jederzeit als Ratgeberin zur Seite stand und die sehr viel Geduld mit mir bewiesen hat.

“They certainly give very strange names to diseases.”

-Plato

7.2. Lebenslauf

Persönliche Daten

Name Nils Uflacker
Geburtstag, -ort 07.03.1987 in Oldenburg (Oldb)



Hochschulstudium

Seit 2006 Studium der Humanmedizin an der Universität zu Lübeck
2008 1. Abschnitt der ärztlichen Prüfung
Frühjahr 2014 2. Abschnitt der ärztlichen Prüfung

Promotion

Seit 2010 „Molekulargenetische Untersuchungen des *THAP1*-Gens“ am Institut für Neurogenetik der Universität zu Lübeck (Direktorin: Prof. Dr. med. Christine Klein)
Publikationen siehe Seite 2
Verleihung des akademischen Grades *Dr. med.* im Juni 2014

7.3. Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich, die vorliegende Arbeit selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel verwendet zu haben.

Lübeck, im Dezember 2013