

Die Rolle von TorsinA im sich entwickelnden zentralen Nervensystem

Dissertation

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Eberhard Karls Universität Tübingen
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

vorgelegt von

Dipl.-Biol. Benedikt Timo Fabry
aus Nürtingen

Tübingen

2015

Gedruckt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Eberhard Karls
Universität Tübingen.

Tag der mündlichen Qualifikation:

06.05.2016

Dekan:

Prof. Dr. Wolfgang Rosenstiel

1. Berichterstatter:

Prof. Dr. Olaf Rieß

2. Berichterstatter:

Prof. Dr. Thomas Gasser

Inhaltsverzeichnis

Tabellen- und Abbildungsverzeichnis	V
Abkürzungsverzeichnis	VII
Zusammenfassung	XI
1 Einleitung	13
1.1 Dystonie.....	13
1.2 DYT1 early onset generalisierte Dystonie	15
1.3 Torsin1A.....	17
1.3.1 Struktur von TorsinA.....	17
1.3.2 Expressionsmuster.....	19
1.3.3 Einfluss der Mutation ΔE auf Pathogenese und Interaktionspartner von TorsinA.....	23
1.3.4 Einfluss von TorsinA während der Entwicklung des zentralen Nervensystems	31
1.4 TorsinB.....	35
1.4.1 Räumliches Expressionsmuster von TorsinB.....	35
1.4.2 Zeitliches Expressionsmuster von TorsinB	36
1.4.3 Zelluläre Lokalisation und Funktion von TorsinB	36
1.4.4 Interaktionen von TorsinB.....	37
1.5 Zielsetzung dieser Arbeit.....	38
2 Material	41
2.1 Verbrauchsmaterial	41
2.2 Lösungen und Puffer	41
2.2.1 Lösungen für molekulargenetische Methoden	41
2.2.2 Lösungen für Proteinbiochemie.....	41
2.2.3 Lösungen für Immunhistochemie und Immunfluoreszenz	42
2.3 Zellkulturmedien	43
2.3.1 Medien für PC6-3 Zellen.....	43
2.3.2 Medien für primäre hippocampale Neuronen.....	43
2.4 Verwendete Zelllinien	44
2.5 Oligonucleotidprimer	44

2.6	Antibiotika.....	45
2.7	Antikörper, Fluorophoren und Farbstoffe	45
2.8	Verwendete Größenstandards.....	46
2.9	Mäuse	46
2.10	Verwendete Kits.....	47
2.11	Verwendete Tools.....	47
2.12	Verwendete Software	47
2.13	Verwendete Chemikalien	47
2.14	Verwendete Geräte	49
3	Methoden.....	51
3.1	Molekulargenetische Methoden	51
3.1.1	DNA-Isolierung aus Gewebe	51
3.1.2	Polymerase-Kettenreaktion (PCR) zur Maus-Genotypisierung	51
3.1.3	Agarosegelelektrophorese	52
3.1.4	Sequenzierung	52
3.2	Proteinbiochemische Methoden	53
3.2.1	Bestimmung der Proteinkonzentration	53
3.2.2	SDS-PAGE (SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese).....	53
3.2.3	Western Blot.....	54
3.3	Tiere.....	54
3.3.1	Haltung und Zucht der Mäuse	54
3.3.2	Biopsienahme und Markierung der Tiere.....	55
3.3.3	Präparation von Organen.....	55
3.3.4	Transkardiale Perfusion.....	55
3.3.5	Verhaltenstests.....	56
3.3.6	SHIRPA-Test.....	56
3.3.7	RotaRod-Test.....	57
3.3.8	CatWalk.....	58
3.3.9	Automatische Verhaltenskäfige (Labmaster)	58
3.4	Immunhistochemische Methoden.....	59

3.4.1	Herstellung von Paraffinschnitten	59
3.4.2	Immunhistochemische Färbungen für Hellfeldmikroskopie	59
3.4.3	Immunfluoreszenzfärbungen	60
3.4.4	Transmissionselektronenmikroskopie	60
3.5	Eukaryotische Zellkultur	61
3.5.1	Auftauen, Kultivierung und Passagieren von PC6-3 Zellen.....	61
3.5.2	Kryokonservierung	61
3.5.3	Präparation und Kultivierung von primären hippocampalen Neuronen.....	62
3.5.4	Immunfluoreszenzfärbung von eukaryotischen Zellen	62
3.5.5	Neurite Outgrowth Staining	64
4	Ergebnisse	65
4.1	Generierung und Phänotypisierung eines Mausmodells zur Rettung des TorsinA Knockout Phänotyps	65
4.1.1	Generierung des Modells.....	65
4.1.2	Analyse der Neuropathologie durch Immunhistochemie	69
4.1.3	Strukturelle Analyse der Zellkernmembran	73
4.1.4	Phänotypisierung der “Rescue-Tiere”	75
4.1.5	Zusammenfassung	79
4.2	Charakterisierung des ersten TorsinB Knockout Mausmodelles.....	80
4.2.1	Bestätigung des Knockout durch Sequenzanalyse	80
4.2.2	Expressionsanalyse von TorsinB und TorsinA	80
4.2.3	Phänotypische Charakterisierung	84
4.2.4	Elektronenmikroskopische Analyse der TorsinB Knockout Tiere	91
4.3	Funktion von TorsinA im sich entwickelnden Nervensystem.....	94
4.3.1	Überexpression von TorsinA in PC6-3 Zellen	94
4.3.2	Funktionskontrolle der PC6-3 Zellen	94
4.3.3	Einfluss von überexprimiertem TorsinA auf die Neuritenlänge.....	96
4.3.4	Einfluss des TorsinA Knockout auf die Dendritenlänge	97
5	Diskussion	100
5.1	Generierung und Phänotypisierung eines Mausmodells zur Rettung des TorsinA Knockout Phänotyps	100

5.1.1	Generierung des Mausmodells	100
5.1.2	Kontrolle der TorsinA Expression.....	102
5.1.3	Phänotypische Charakterisierung der „Rescue-Tiere“	103
5.1.4	Neuropathologie der „Rescue-Tiere“	105
5.2	Charakterisierung des ersten TorsinB Knockout Mausmodells	114
5.2.1	Genotypisierung der TorsinB Knockout Tiere	114
5.2.2	Expressionsanalyse von TorsinB und TorsinA	114
5.2.3	Phänotypische Charakterisierung	116
5.2.4	Elektronenmikroskopische Analyse der Kernmembran	118
5.2.5	Zusammenfassung und Ausblick.....	120
5.3	Funktion von TorsinA im sich entwickelnden Nervensystem.....	122
5.3.1	Die Expression von TorsinA führt zu erhöhtem Neuritenwachstum in PC6-3 Zellen	122
5.3.2	Verlust von TorsinA führt zur Bildung verkürzter Dendriten	124
5.3.3	Zusammenfassung und Ausblick.....	126
6	Literaturverzeichnis.....	127
7	Danksagung	140

Tabellen- und Abbildungsverzeichnis

<i>Tab. 1.1.1 Kategorien zur Beschreibung einer Dystonie</i>	14
<i>Tab. 1.1.2 Klassifizierung der DYT-Loci</i>	15
<i>Tab. 2.5.1: Verwendete Oligonucleotidprimer</i>	44
<i>Tab. 2.6.1: Verwendete Antibiotika</i>	45
<i>Tab. 2.7.1: Verwendete primäre Antikörper</i>	45
<i>Tab. 2.7.2: Verwendete sekundäre Antikörper</i>	45
<i>Tab. 3.1.1: Standard PCR-Programm</i>	52
<i>Tab. 3.2.1: Verwendete SDS-Gele</i>	53
<i>Tab. 3.4.1: Deparaffinierungsschritte für Paraffin-fixiertes Gewebe</i>	60
<i>Tab. 3.5.1: Färbemethoden für verschiedene Zelltypen</i>	63
<i>Tab. 4.1.1 Kategorien des SHIRPA-Tests</i>	76
<i>Abb. 1.3.1 Struktur TorsinA</i>	17
<i>Abb. 1.3.2 Die Hexamerstruktur von TorsinA</i>	18
<i>Abb. 1.3.3 Interaktion von TorsinA mit LAP1</i>	27
<i>Abb. 1.3.4 Signalwege der Basalganglien</i>	30
<i>Abb. 1.4.1 Alignment von humanem TorsinA und B auf Aminosäureebene</i>	35
<i>Abb.: 2.8.1 Verwendete Größenstandards</i>	46
<i>Abb. 3.2.1: Exemplarischer Western Blot Aufbau</i>	54
<i>Abb. 3.3.1: Ohrlochschemata zur Markierung der Tiere</i>	55
<i>Abb. 4.1.1 Kreuzungsschema zur Generierung des neuen Mausmodells</i>	65
<i>Abb. 4.1.2 Verteilung der Genotypen der "Rescue-Mäuse" und Kontrolle der KO Mäuse</i>	66
<i>Abb. 4.1.3 Expressionslevel von endogenem und transgenem TorsinA in verschiedenen Gehirnregionen</i>	67
<i>Abb. 4.1.4 Das Expressionslevel von TOR1A ist mit der Anzahl endogener Tor1a-Allele verknüpft</i>	68
<i>Abb. 4.1.5 Expressionslevel von humanem TorsinA in inneren Organen</i>	69
<i>Abb. 4.1.6 Repräsentative immunhistochemische Färbungen durch Anti-V5-Tag Antikörper</i>	72
<i>Abb. 4.1.7 Struktur der Kernmembran in Striatum</i>	73
<i>Abb. 4.1.8 Elektronenmikroskopische Aufnahmen des Striatums und Cerebellums</i>	74
<i>Abb. 4.1.9 Analyse der Aktivität während des SHIRPA-Tests</i>	76
<i>Abb. 4.1.10 Analyse der motorischen Koordination auf dem RotaRod</i>	77
<i>Abb. 4.1.11 Analyse des Gangbildes durch das CatWalk-System</i>	78
<i>Abb. 4.2.1: Genotypisierung der Tor1b KO Tiere</i>	80
<i>Abb. 4.2.2 TorsinB zeigt gewebespezifisch unterschiedliche Expressionslevel</i>	81
<i>Abb. 4.2.3: Expressionsanalyse von TorsinB und TorsinA in Tor1b KO Mäusen</i>	82
<i>Abb. 4.2.4: Quantifizierung des TorsinA Expressionslevels in Tor1b KO Mäusen</i>	83

Tabellen-und Abbildungsverzeichnis

Abb. 4.2.5: Auswertung der Labmaster-Daten im Alter von drei Monaten	85
Abb. 4.2.6: Auswertung der Labmaster-Daten im Alter von sieben Monaten	86
Abb. 4.2.7: Analyse der motorischen Koordination bei TorsinB Knockout Tieren durch das RotaRod	88
Abb. 4.2.8: Analyse der Laufgeschwindigkeiten	89
Abb. 4.2.9: Analyse des Gangbildes von Kontroll-, Tor1b^(+/-)- und Tor1b^(-/-)-Tieren	90
Abb. 4.2.10: Elektronenmikroskopische Analyse der Leber	92
Abb. 4.2.11: Elektronenmikroskopische Analyse der Milz	93
Abb. 4.3.1 Einfluss von TorsinA auf das Neuritenwachstum von PC6-3 Zellen	95
Abb. 4.3.2 Einfluss von TorsinA auf den Wachstumskegel von PC6-3 Zellen	97
Abb. 4.3.3 Einfluss von TorsinA auf das Dendritenwachstum in hippocampalen Neuronenkulturen	99
Abb. 5.1.1 Aufbau des LINC Komplexes	112

Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
A	Ampere
AAA+	ATPases associated with a variety of cellular activities
Abb.	Abbildung
ad	auf
APS	Ammoniumperoxodisulfat
Art.	Artikelnummer
AS	Aminosäure(n)
ATP	Adenosintriphosphat
BCA	bicinchoninic acid (Bicinchoninsäure)
bFGF	basic Fibroblast Growth Factor
bp	base pair (Basenpaar)
BRIJ	Polyalkylenglycolether
BSA	Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
cDNA	complementary DNA
C. elegans	Caenorhabditis elegans
Cre	cyclization recombination
cm	Zentimeter
CMV	Cytomegalovirus
CPu	Striatum
C-Terminus	Carboxy-Terminus
°C	Grad Celsius
Da	Dalton
DA	Dopamin
DAT	Dopamintransporter
DNA	Deoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)
ΔE	Deletion der Aminosäure Glutamat
D1R	Dopaminrezeptor 1
D2R	Dopaminrezeptor 2
dd	doppelt destilliert
d.h.	das heißt
DMSO	Dimethylsulfoxid

Abkürzungsverzeichnis

dNTP	Deoxyribonucleoside triphosphate (Desoxynukleosidtriphosphat)
DOPAC	3,4-Dihydroxy-Phenylacetic Acid
DPS	Dystonie-Parkinson-Syndrom
DRD	Dopa-responsive Dystonie
DT-MRI	diffusion tensor magnetic resonance imaging
DYT	Dystonie
E11 - E19	Embryonaltag 11 - 17
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid (Ethyldiamintetraessigsäure)
ER	Endoplasmatisches Retikulum
et al.	et altera (lat. für: und andere)
EtOH	Ethanol
FBS	Fetal Bovin Serum (fötales Kälberserum)
fwr	forward
g	Gramm
GA	Golgi-Apparat
GABA	Gamma-Aminobuttersäure
GCH1	GTP cyclohydrolase 1
GPI	Globus pallidus lateralis
GPm	Globus pallidus internus
GD	Gyrus dentatus
H	Stunde
HBS	HEPES-gepufferte Salzlösung
HBSS	Hank's Balanced Salt Solution
HCl	Salzsäure
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazine-N'-2-Ethanesulfonic Acid
HEK	human embryonic kidney (Zelllinie)
HS	Horse serum (Pferdeserum)
k	Kilo-
KCl	Kaliumchlorid
KLC1	kinesin light chain 1
l	Liter
LAP1	lamina-associated polypeptide 1
L-DOPA	L-3,4-Dihydroxyphenylalanin
loxP	locus of X-cross of P1
LULL1	luminal domain like LAP1

μ	Mikrom
m	Milli-
M	molar
MeOH	Methanol
MgSO ₄	Magnesiumsulfat
min	Minute
mRNA	messenger RNA
MSN	medium spiny neurons
n	Nano-
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
NE	nuclear envelope (Kernmembran)
N-Terminus	Amino-Terminus
OB	bulbus olfactorius (Bulbus)
p	Pico-
P0 - P21	Postnaltag 0 – 21
PBS	Phosphate Buffered Saline
PC6-3	pheochromocytoma Zelllinie
PCR	Polymerase chain reaction (Polymerasekettenreaktion)
PET	Positronen-Emission-Tomographie
PFA	Paraformaldehyd
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration
PORN	Poly-DL-ornithine hydrobromide
mPrP	mini Prionprotein Promotor
Py	Pyramidenzellschicht des Hippocampus
rev	reverse
RNA	Ribonucleic acid (Ribonukleinsäure)
RNase	Ribonuklease
RPMI	Roswell Park Memorial Institute medium
RT	Raumtemperatur
rt-RCR	reverse transkriptase PCR
SDS	Sodium Dodecyl Sulfat
s	Sekunde
SH-SY5Y	Neuroblastom-Zelllinie
Snapin	SNARE-associated protein
SNARE s	oluble N-ethylmaleimide-sensitive-factor attachment receptor

Abkürzungsverzeichnis

Sun2	Sad1 and UNC84 domain containing 2
Tab.	Tabelle
Taq. Polymerase	<i>Thermophilus aquaticus</i> Polymerase
TE	Tris-EDTA-Puffer
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethan-1,2-diamin
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TBST	Tris-gepufferte NaCl-Lösung mit Tween-20 Zusatz
THAP1	THAP domain containing, apoptosis associated protein 1
TM	membranumspannende Domäne
TOR1A	torsin family 1, member A (Torsin A)
TOR1B	torsin family 1, member B (Torsin B)
TOR2A	torsin family 2, member A
TOR3A	torsin family 3, member A
Tris	Tris-(hydroxymethyl)aminomethan
U	Unit
U/min	Umdrehungen pro Minute
üN	über Nacht
UV	ultraviolett
V	Volt
VAMP2	vesicle-associated membrane protein 2
VMAT2/ VAT	vesikuläre Monamintransporter 2
Vol.	Volumen
v/v	volume per volume (Volumenprozent)
WT / wt	Wildtyp
ZNS	zentrales Nervensystem

Zusammenfassung

Das Krankheitsbild der Dystonie gilt als die dritthäufigste neurologische Bewegungsstörung nach Morbus Parkinson und Tremor. Die in dieser Arbeit untersuchte „early onset generalized dystonia“ wird durch eine 3 Basenpaardeletion im *DYT1*-Gen verursacht und führt nach dem Ausbruch zu einer sich graduell verschlimmernden Dystonie. Die Patienten sind zuerst nur von fokalen Kontraktionsstörungen betroffen, bevor mit fortschreitendem Alter immer mehr Extremitäten betroffen sind, daher der Name generalisierte Dystonie. Die Funktion des betroffenen Proteins TorsinA ist nur unvollständig geklärt. Durch seine strukturelle und funktionelle Zugehörigkeit zur AAA+-Proteinfamilie wirkt TorsinA bei vielen zellulären Funktionen, wie der Kontrolle der Proteinfaltung, der Antwort auf Stressreaktionen oder dem Aufbau des Zytoskeletts mit. Allerdings konnte noch keine eindeutige Störung einer dieser Funktionen für den Krankheitsverlauf ausfindig gemacht werden.

Da in den Gehirnen verstorbener Patienten gegenwärtig noch keine Hinweise für Neurodegeneration gefunden werden konnten wird die *DYT1*-Dystonie als „neurodevelopmental disease“ klassifiziert. Dies deckt sich mit den Ergebnissen aus mehreren Experimenten, wonach TorsinA bereits vor der Geburt eine essentielle Rolle in der Entwicklung des zentralen Nervensystems spielt.

Um die Rolle von TorsinA während der Entwicklung des zentralen Nervensystems im Rahmen dieser Arbeit zu untersuchen und besser zu verstehen wurden drei Teilprojekte durchgeführt:

1. Um die Funktion von TorsinA für die normale Entwicklung des ZNS zu untersuchen wurde im ersten Teilprojekt ein Mausmodell generiert, welches die Expression von humanem TorsinA unter Kontrolle des mPrP-Promotors in *Tor1a*^(-/-)-Tieren deren frühzeitiges Versterben verhindert. Diese Tiere zeigten keinen auffälligen dystonen Phänotyp, allerdings zeigten sie auffällig geweitete Kernmembranen. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass der mPrP-Promotor im Striatum der Tiere nur sehr schwach bis gar nicht aktiv ist, sowie eine Abhängigkeit der Expressionsstärke von humanem TorsinA von der Anzahl der endogenen TorsinA-Allele.
2. Um die Funktion des TorsinA Homologs TorsinB zu untersuchen und eventuell Rückschlüsse auf die Funktion von TorsinA ziehen zu können, wurde im zweiten Teilprojekt ein *Tor1b* Knockout Mausmodell charakterisiert. Hierbei konnten keine Einschränkungen der Lebensfähigkeit der KO-Tiere gefunden werden, auch zeigten die Tiere keinen dystonen Phänotypen genau wie motorischen Auffälligkeiten im Vergleich mit den Kontrolltieren. Es konnte des Weiteren bestätigt werden, dass TorsinB in den inneren Organen der wildtypischen Tiere ein weitaus höheres Expressionslevel besitzt als im Gehirn. Dies unterstreicht die Wichtigkeit von TorsinB in nicht

neuronalen Geweben und deckt sich auch mit den in dieser Arbeit gefunden membranösen Anhäufungen in der Leber und Milz der *Tor1b*^(-/-)-Tiere.

3. Da die TorsinA eine Funktion während der Entwicklung des ZNS innezuhaben scheint und auch schon ein Einfluss von TorsinA auf das Wachstum von Neuriten beobachtet werden konnte, wurde im dritten Teilprojekt das Wachstum von Neuriten in Abhängigkeit des TorsinA-Expressionslevels untersucht. So konnte in TorsinA WT, jedoch nicht in TorsinA-ΔE, überexprimierenden PC6-3-Zellen signifikant längere Neuriten gemessen werden, sowie deren Wachstumskegelfläche. Im Gegensatz hierzu wurden in primären hippocampalen Neuronenkulturen von *Tor1a*^(+/-)- und *Tor1a*^(+/-)-Tieren signifikant kürzere Dendriten als in Kontrolltieren gemessen, wobei sich die Anzahl der auswachsenden Dendriten erhöhte.

1 Einleitung

1.1 Dystonie

Als Dystonie (aus dem altgriechischen „dys“ = schlecht und „tonus“ = Spannung) wird das Krankheitsbild einer heterogenen Bewegungsstörung bezeichnet, die erstmals von Hermann Oppenheim im Jahre 1911 beschrieben wurde (Klein *et al.*, 2013). Charakteristisch für diese Bewegungsstörung sind unkontrollierbare (anhaltende) Kontraktionsstörungen verschiedener Muskelgruppen, was zu einer unnormalen Körperhaltung und repetitiven Gesten führen kann. Zu diesen Bewegungsstörungen, gehören unter anderem der Blepharospasmus (krampfhafter Lidschluss), Torticollis (Schiefhals) oder Schreibkrampf (das Verkrampfen der Hand bei Ausführung einer manuellen Tätigkeit) (Albanese *et al.*, 2013; Fahn *et al.*, 1987). Diese repetitiven Verkrampfungen werden durch gleichzeitige Aktivierung der Agonisten und Antagonisten verursacht, weshalb eine Fehlfunktion in den für die motorische Steuerung verantwortlichen Nervenbahnen des zentralen Nervensystems als Auslöser der Krankheit vermutet wird (Bragg *et al.*, 2011). Ein weiteres Merkmal einiger Dystonieformen ist die Verbesserung der Symptomatik nach Ausführen einer bestimmten Bewegung, der sogenannten „Geste antagonist“. Zusätzlich kann bei Patienten auch ein Tremor auftreten.

Zur Klassifikation der verschiedenen Formen der Dystonie wird ein von der Movement Disorder Society (MDS) entwickeltes System verwendet, welches eine Einteilung in zwei Achsen mit unterschiedlichen Subkategorien vorsieht. Dieses System soll die bisher angewandte Klassifizierung der Dystonien anhand ihrer Ätiologie in primäre und sekundäre Dystonie ablösen und darüber hinaus eine differenzierte Beschreibung der unterschiedlichen Symptome auch für die Diagnostik der Krankheit ermöglichen.

Die erste Achse beschreibt in fünf Unterkategorien die klinischen Phänotypen der Krankheit, während die zweite Achse die Ätiologie der Dystonie beschreibt (siehe Tab.1.1). Es erlaubt ferner eine exakte Einordnung neuer, noch zu klassifizierender Dystonien.

Dystonien sind die dritthäufigste Bewegungsstörung des Menschen und treten mit einer Prävalenz von 45/10000 Menschen auf (Fahn, 1988; Geyer *et al.*, 2006). Im Gegensatz zu neurodegenerativen Bewegungsstörungen wie M. Parkinson, konnte für die meisten Dystonien bisher keine eindeutige Degeneration, Inflammation von neuronalem Gewebe oder Verlust von Neuronen nachgewiesen werden (Augood *et al.*, 2003; Paudel *et al.*, 2012; Paudel *et al.*, 2014; Rostasy *et al.*, 2003; Walker *et al.*, 2002). Ausgehend von dieser Erkenntnis werden Dystonien den neurofunktionellen Erkrankungen zugeordnet (Berardelli *et al.*, 1998; Fahn *et al.*, 1987).

Als ein weiteres Charakteristikum von Dystonien gilt die hohe Zahl an bisher identifizierten Genloci bei Patienten, welche unter einer erblichen Dystonie leiden. Zum Verfassungszeitpunkt dieser Arbeit waren 25 Loci identifiziert, welche nach den Richtlinien der Human Genome Organisation als DYT1-25 beschrieben. Die neueste Klassifizierung erfolgt nach Marras *et al.*, welche doppelte, falsche und unbestätigte Loci entfernt (siehe Tab. 1.2) (Marras *et al.*, 2012). Für den Großteil der Gene konnte die Funktion der kodierten Proteine für das zentrale Nervensystem noch nicht verifiziert werden, mit Ausnahme der DYT5-Gene, welche für Proteine des Dopaminstoffwechsels kodieren (Segawa, 2000). Dieses Faktum stellt für die wissenschaftliche Gemeinschaft eine große Herausforderung dar, da erst mit einem genauen Verständnis der betroffenen Proteine eine wirksame Therapie der Krankheit entwickelt werden kann. Therapeutische Maßnahmen bei Dystonie beschränken sich bis dato auf die Behandlung der Symptome der Krankheit, mit Ausnahme der Gabe von Levodopa, welches die Symptome der bereits erwähnten DOPA-responsiven Dystonie erheblich lindert, indem der Entstehungsmechanismus direkt angegangen wird (Nutt *et al.*, 2001). Als weitere Behandlungsmöglichkeiten gelten das Injizieren von Botulinumtoxin, einem potenten Muskelrelaxans, welches bei fokalen Dystonien wie Blepharospasmen, oromandibularer Dystonie oder zervikaler Dystonie ein Entkrampfen der betroffenen Muskelpartien bewirken kann (NIH, 1990). Bei einigen

Tab. 1.1.1 Kategorien zur Beschreibung einer Dystonie

Modifiziert nach Albanese *et al.*, 2013

Achse 1: Klinische Phänotypen	Achse 2: Ätiologie
<u>Alter beim Auftreten der ersten Symptome</u>	<u>Pathologie des Nervensystems</u>
Geburt bis 2 Jahre	Degeneration
3-12 Jahre	Läsion
13–20 Jahre	Keine Auffälligkeit
21–40 Jahre	<u>Vererbte Dystonie</u>
>40 years	Autosomal dominant
<u>Betroffen Körperregionen</u>	Autosomal rezessiv
Fokal	X-linked rezessiv
Segmental	Mitochondriale Vererbung
Multifokal	<u>Erworbene Dystonie</u>
Generalisiert	Perinatale Gehirnverletzung
Hemidystonie	Infektion
<u>Krankheitsverlauf</u>	Drogen/Medikamente
Statisch	Gifte
Progressiv	Vaskuläre Krankheiten
<u>Auftreten der Dystonie</u>	Neoplastische Transformation
Persistent	Gehirnverletzung
Aktionsspezifisch	Psychisch bedingt
Tageszeitspezifisch	<u>Idiopatische Dystonie</u>
Paroxysmal	Sporadisch
<u>Assoziierte Krankheitsbilder</u>	Familiär
Isolierte Dystonie	
Kombinierte Dystonie	
Weitere neurologische Krankheitsbilder	

Patienten generalisierter oder zervikaler Dystonie kann durch tiefe Hirnstimulation (Deep Brain Stimulation, DBS) des Globus pallidus internus, welcher den Basalganglien zugeordnet und für die Kontrolle der bewussten Motorik verantwortlich ist, eine Linderung der Symptome erfolgen (Albanese, 2014; Fox *et al.*, 2015).

Tab. 1.1.2 Klassifizierung der DYT-Loci

Modifiziert nach Marras *et al.*, 2012. (AD = autosomal-dominant; AR = autosomal rezessiv; XR = X-chromosomal-rezessiv)

Lokus	Name	Bezeichnung	Zusätzliche phäotypische Bezeichnungen	Erbgang
Isolierte Dystonien				
DYT1	<i>TOR1A</i>	DYT-TOR1A	Early-onset generalized dystonia	AD
DYT6	<i>THAP1</i>	DYT-THAP1	Adolescent-onset dystonia of mixed type	AD
DYT25	<i>GNAL</i>	DYT-GNAL	Adult-onset cranial-cervical dystonia	AD
Kombinierte Dystonien				
Dystonie plus Parkinsonismus				
DYT3	<i>TAF1</i>	DYT-TAF1 4		XL
DYT5a	<i>GCH1</i>	DYT-GCH1	Dopa-responsive dystonia	AD
DYT5b	<i>TH</i>	DYT-TH	Dopa-responsive dystonia	AR
nicht zugeordnet	<i>SPR</i>	DYT-SPR	Dopa-responsive dystonia & cognitive impairment	AR
DYT12	<i>ATP1A3</i>	DYT-ATP1A3	Rapid-onset dystonia-parkinsonism	AD
Dystonie plus Myoklonus				
DYT11	<i>SGCE</i>	DYT-SGCE		AD
Paroxysmale Dystonien				
DYT8	<i>PNKD</i>	DYT-MR-1	Paroxysmal non-kinesigenic dyskinesia (PNKD)	AD
DYT10	<i>PRRT2</i>	DYT-PRRT2	Paroxysmal kinesigenic dyskinesia (PKD)	AD
DYT18	<i>SLC2A1</i>	DYT-SLC2A1	Paroxysmal exertion-induced dyskinesia	AD

1.2 DYT1 early onset generalisierte Dystonie

DYT1-Dystonie ist eine autosomal dominant vererbte Bewegungsstörung (Risch *et al.*, 1990), welche durch eine Mutation im *TOR1A* Gen (OMIM #128100) ausgelöst wird. Bei dieser Mutation handelt es sich um eine Deletion der drei Basen GAG im *TOR1A*-Gen, welche zur Deletion einer Glutaminsäure (Glu³⁰² oder Glu³⁰³) führt, oftmals als ΔE oder ΔGAG beschrieben. Diese Mutation wurde als Gründermutation in der Population der Ashkenazi-Juden entdeckt (Bressman *et al.*, 1994) und ließen sich in weiteren ethnischen Gruppen bestätigen (Im *et al.*, 2004; Slominsky *et al.*, 1999; Valente *et al.*, 1998). Es handelt sich um eine schwere Form der generalisierten Dystonie. Das Alter der Patienten bei Ausbruch der Krankheit, der sogenannte „age of onset“, liegt zwischen dem ersten und 28 Lebensjahr und somit in einem Zeitraum, in welchem die motorischen Fähigkeiten ausgebildet werden (Berardelli *et al.*, 1998; Bressman, 2004). Die DYT1-Dystonie ist mit 1/160000 Betroffenen weltweit eine der häufigeren Formen der generalisierten Dystonie (Zeman *et al.*, 1967). Da die Penetranz der Mutation bei ca. 30-40% liegt, wird vermutet, dass weitere endo- und exogene Faktoren einen Einfluss auf die Krankheit haben (Risch *et al.*, 1990).

Durch das heterogene Krankheitsbild sind verschiedene Ausprägungen möglich. Zumeist beginnt die Krankheit fokal in einem Bein oder einem Arm, bevor sie meist über mehrere Jahre hinweg generalisiert

und weitere Extremitäten sowie den Körper erfasst. Von dieser Ausprägung der Symptome sind circa 65% der Patienten betroffen. Der Kopf- und Nackenbereich bleibt dabei meistens symptomfrei. (Ozelius *et al.*, 2014). Bei etwa 10% der Betroffenen bleibt es bei einer segmentalen Ausprägung, während bei 25% der Betroffenen unter einer fokalen Ausprägung der Dystonie leiden (Opal *et al.*, 2002). Auch eine milde Ausprägung der DYT1-Dystonie in Form eines Schreibkrampfes ist möglich (Gasser *et al.*, 1998). Neben der 3-Basenpaardeletion sind weitere Fälle von Sequenzvarianten im *TOR1A* Gen bekannt, wobei bislang nicht eindeutig bewiesen ist, ob sie zum Ausbruch einer Dystonie führen. Es konnte ein Austausch der Aminosäure Glutamin zu Arginin (c.863G>A) im Exon 5 eines Patienten mit early onset Dystonie identifiziert werden. Dieser Aminosäureaustausch ist evolutionär konserviert und führt zu einer Zellkernpathologie, die auf eine klinische Relevanz dieser Mutation hindeutet (Zirn *et al.*, 2008). Ebenfalls bei einem einzelnen Patienten (Leung *et al.*, 2001) konnte eine 18 Basenpaardeletion gefunden werden, welche sechs Aminosäuren einer putativen Phosphorylierungsstelle des Torsin1A-Proteins entfernt. Neben den von generalisierter Dystonie betroffenen Patienten können Mutationen in *TOR1A* auch bei weiteren Formen der Dystonie auftreten. So wurde bei einem Patienten mit fokaler Dystonie ein Austausch von Phenylalanin zu Isoleucin (c.613T>A) in *TOR1A* nachgewiesen (Calakos *et al.*, 2010), des Weiteren wurde bei einer Patientin mit zervikaler Dystonie eine 6 Basenpaardeletion (c.4045del) im *TOR1A*-Gen gefunden (Vulinovic *et al.*, 2014). Hettich *et al.* berichten von einem Patient mit generalisierte Dystonie, welcher eine „missense“ Mutation (R288Q) in *TOR1A* aufweist, sowie einem Myoklonus Patienten mit ebenfalls eine „missense“ Mutation (F205I) in *TOR1A* (Hettich *et al.*, 2014). Eine weitere Mutation von *TOR1A* (c.581A>T, p.Asp194Val) wurde in einem Patienten mit segmentaler Dystonie gefunden, der eine weitere Mutation im *THAPI*-Gen, verantwortlich für DYT6, aufweist (Cheng *et al.*, 2014).

Eine weitere Veränderung im *TOR1A*-Gen ist ein Polymorphismus, welcher anstatt der an Stelle 216 natürlicherweise vorkommenden Aminosäure Asparaginsäure (D) in 12% der Fälle für die Aminosäure Histin (H) codiert (Ozelius *et al.*, 1997). In nicht manifestierenden Trägern von *TOR1A* ΔE konnte ein vermehrtes Vorkommen des D216H-Polymorphismus beobachtet werden, wobei die Lokalisation *trans* zur ΔE Deletion einen Schutz darstellt, während die *cis* Lokalisation für die Penetranz förderlich ist (Risch *et al.*, 2007).

1.3 Torsin1A

1.3.1 Struktur von TorsinA

TorsinA wurde 1997 als Auslöser der DYT1-Dystonie identifiziert und der Familie der Hitzeschock- / Clp-Proteasen (Ozelius *et al.*, 1997; Ozelius *et al.*, 1998) zugeordnet. Diese zählen ihrerseits zur Familie der AAA+-Proteine (ATPases Associated with diverse cellular Activities) (Neuwald *et al.*, 1999). Strukturell handelt es sich bei TorsinA um ein 332 Aminosäuren langes und 37,8 kDa schweres Protein (siehe Abb. 1.3.1), welches hauptsächlich im Lumen des Endoplasmatische Retikulums (ER) sowie in weitaus geringeren Mengen im Zytoplasma und neuronalen Fortsätzen von Zellen nachgewiesen werden kann. Es besitzt am N-Terminus ein Signalpeptid (Aminosäuren 1-20), welches während des Transports in das ER abgespalten wird (Hewett *et al.*, 2003; Liu *et al.*, 2003). Die nachfolgenden 20 Aminosäuren (21-40) kodieren für einen hydrophoben Bereich, welcher zunächst auf eine Lokalisation des Proteins in der Membran des ERs hindeutet (Liu *et al.*, 2003). Weitere Forschungsergebnisse lassen allerdings darauf schließen, dass TorsinA selbst kein integratives Membranprotein ist, allerdings durch Interaktion mit einem Membranprotein trotzdem an der Membran des ERs lokalisiert ist (Callan *et al.*, 2007) (siehe Kapitel 1.3.3.1). Auch wurde durch Sequenzvergleiche eine Lokalisationssequenz für den Zellkern in TorsinA identifiziert (AS 76-94) (Shashidharan *et al.*, 2000b), welche allerdings umstritten ist, da bis dato kein TorsinA im Zellkern nachgewiesen werden konnte (Konakova *et al.*, 2001c; Walker *et al.*, 2001). AAA+-Proteine besitzen mehrere hochkonservierte Domänen, welche auch in TorsinA zu finden sind. Diese Walker A und B genannten Domänen sind für die Hydrolyse des Substrates ATP verantwortlich und werden durch AS 95-119 sowie

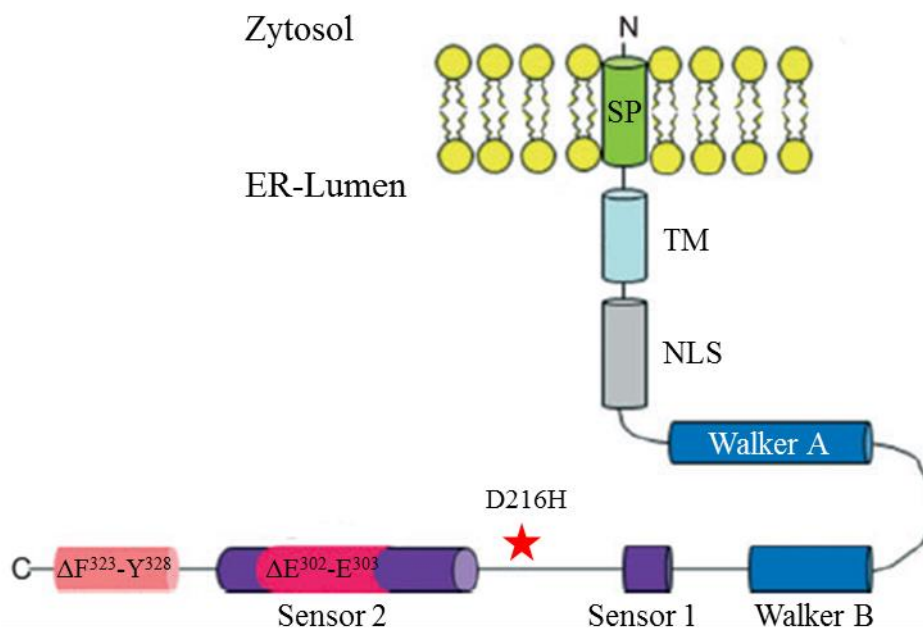


Abb. 1.3.1 Struktur TorsinA

SP = Signalpeptid; TM = Transmembran Domäne; NLS = Nukleäres Lokalisations Signal.
Modifiziert nach Granata *et al.*, 2009.

164-175 kodiert. Die Bindung des Phosphates wird durch die Walker A Domäne durchgeführt, während die eigentliche Hydrolyse an der Walker B Domäne stattfindet (Neuwald *et al.*, 1999). Zwei weitere konservierte Domänen, Sensor 1 und 2, sind ebenfalls an der Hydrolyse des ATPs beteiligt. So ist Sensor 1 für die Erkennung des Substrates und dem Ablauf der Hydrolyse unerlässlich (Iyer *et al.*, 2004). Sensor 2, in welchem die pathogene ΔE -Mutation auftritt, ist anschließend für die Verteilung der durch die Hydrolyse freigesetzte Energie an das Substrat beteiligt (Ogura *et al.*, 2001). Auch die pathogene 18 Basenpaardeletion $F^{323}-Y^{328}$ kann am C-Terminus des Proteins gefunden werden, während der putativ schützende D216H-Polymorphismus vor der Sensor 2 Domäne liegt.

Wie die meisten AAA+-Proteine bildet TorsinA ein ringförmiges Hexamer, bei welchem die ATPase-Domäne der Proteine in die Mitte des Rings zeigt. Es wird vermutet, dass Hexamere die funktionelle Einheit von TorsinA darstellen (siehe Abb. 1.3.2) (Li *et al.*, 2014). Durch die pathogene Mutation ΔE könnte es zu einem dominant negativen Effekt von TorsinA kommen, wodurch die Interaktionen der TorsinA Hexamerstruktur mit seinen Interaktionspartner gestört wird (Breakefield *et al.*, 2001; Goodchild *et al.*, 2005b; Torres *et al.*, 2004). Weitere Publikationen sprechen allerdings von einer „gain-of-function“, also dem Erwerb einer zusätzlichen Funktion durch die Mutation ΔE , bzw. machen eine

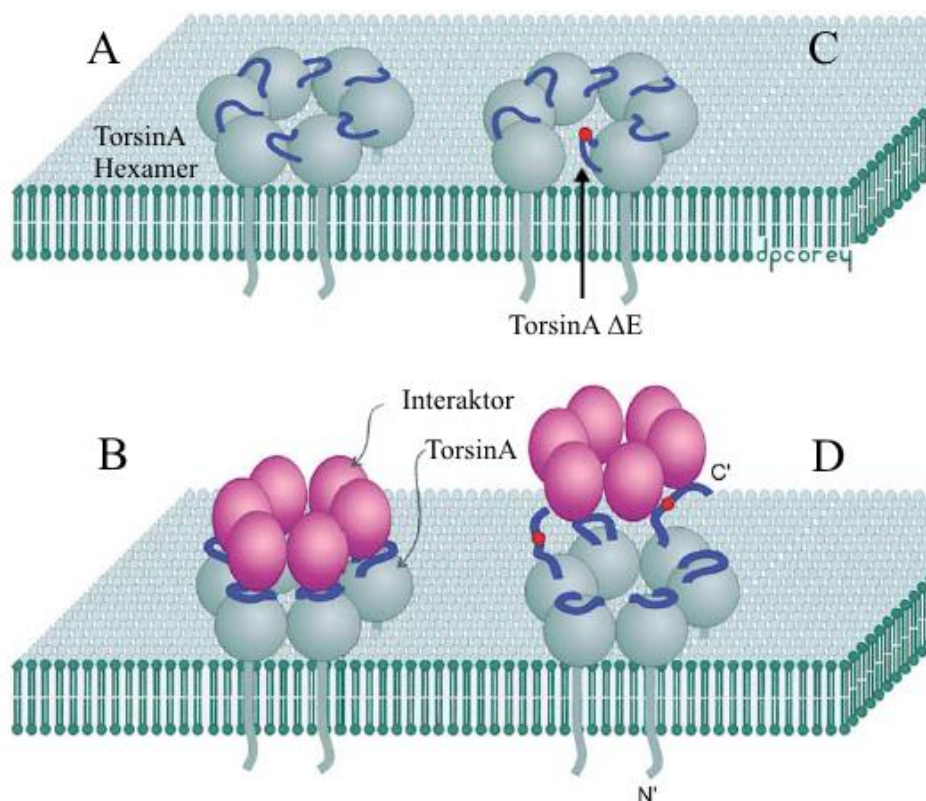


Abb. 1.3.2 Die Hexamerstruktur von TorsinA

Die Struktur von TorsinA ermöglicht die Formation einer Hexamerstruktur (A), welche mit noch nicht vollständig bekannten Proteinen interagieren kann (B). Durch den dominant negativen Effekt der Mutation ΔE auf TorsinA kommt es zu einer putativen Konformationsänderung, welche die Formierung der Hexamerstruktur stört (C) oder die Interaktion mit weiteren Proteinen zu stören vermag (D).
Modifiziert nach Breakefield *et al.*, 2001.

Mischung aus beiden Mechanismen für die Pathogenese verantwortlich (Jungwirth *et al.*, 2011; Naismith *et al.*, 2009).

TOR1A besitzt mit TOR1B, welches eine Homologie von 84% aufweist, sowie TOR2A und TOR3A drei Homologe in Säugetieren und konnte bisher auch im Zebrafisch (torsinC), Fruchtfliege (torp4a) und in Nematoden (OOC-5, TOR-2 und Tor3) (Basham *et al.*, 2001; Jungwirth *et al.*, 2010; Ozelius *et al.*, 1997; Ozelius *et al.*, 1999) nachgewiesen werden, allerdings nicht in Hefen oder Prokaryoten (Granata *et al.*, 2009).

1.3.2 Expressionsmuster

Zur genauen Lokalisation von TorsinA durch Immunhistochemie oder mRNA *In-situ*-Hybridisierung im Menschen sowie in Ratten und Mäusen wurden bereits verschiedene Studien durchgeführt, was eine chronologische Betrachtung sinnvoll erscheinen lässt.

Augood *et al.* konnten 1998 und 1999 durch *in-situ*-Hybridisierung eine Lokalisation von TorsinA-mRNA in dopaminergen Neuronen der Substantia nigra pars compacta sowie im Cerebellum und im Hippocampus nachweisen (Augood *et al.*, 1998). Die Lokalisation von TorsinA beschränkt sich auf neuronalen Zellen, in Gliazellen hingegen konnte keine TorsinA-mRNA gefunden werden. Neben der starken Expression in der Substantia nigra konnte in anderen Regionen, die den Basalganglien zugeordnet werden, darunter Putamen und Globus pallidus, keine erhöhte Expression festgestellt werden (Augood *et al.*, 1999).

Shashidharan *et al.* zeigten durch Immunhistochemie mit einem polyklonalen Anti-TorsinA-Antikörper sowohl im Menschen als auch in der Ratte eine Lokalisation von TorsinA in der Substantia nigra sowie im Hippocampus, dem Cerebellum und dem präfrontalen Kortex. TorsinA Immunoreaktivität konnte ausschließlich im Nukleus und im Zytoplasma neuronaler Zellen beobachtet werden. Auch in den nicht neuronalen Organen Leber und Niere konnte TorsinA durch Western Blot nachgewiesen werden, allerdings nicht in der Milz und Muskelgewebe (Shashidharan *et al.*, 2000b).

Walker *et al.* wiesen TorsinA im Großteil der Neuronen des zentralen Nervensystems der Ratte nach und bestätigten durch Färbungen mit einem Anti-TorsinA-Antikörper erneut die schon veröffentlichten Ergebnisse von **Augood *et al.*** und **Shashidharan *et al.*** (Walker *et al.*, 2001).

Auch **Konakova *et al.*** untersuchten menschliches post-mortem Gewebe durch Immunhistochemie, wobei sie erneut die Lokalisation von TorsinA im gesamten Gehirn feststellen konnten (Konakova *et al.*, 2001b). Mit einem Anti-TorsinA-Antikörper konnte auch in Mäusen durch Immunhistochemie die Lokalisation von TorsinA in allen Gehirnregionen nachgewiesen werden. Auch in der Maus scheint die Expression von TorsinA sich strikt auf neuronale Zellen zu beschränken (Konakova *et al.*, 2001c).

Augood *et al.* bestätigten in 2003 noch einmal ihre durch mRNA-Hybridisierung entstandenen Daten durch Immunhistochemie mit einem Anti-TorsinA-Antikörper (Augood *et al.*, 2003).

1.3.2.1 Lokalisation von TorsinA innerhalb der Zelle

Die subzelluläre Lokalisation von TorsinA variiert, was auf mehrere Ursachen wie Modellorganismus, Überexpression oder Mutation zurückzuführen ist.

Endogenes und überexprimiertes TorsinA WT ist in Zellkultur im ER sowie in Neuriten, am präsynaptischen Ende und teilweise in der Kernmembran lokalisiert. Dies konnte anhand Kolokalisation mit mehreren Markern, darunter Protein-Disulfid-Isomerase (PDI) und KDEL-Proteinen (Giles *et al.*, 2008; Gonzalez-Alegre *et al.*, 2004; Goodchild *et al.*, 2004; Hewett *et al.*, 2000), nachgewiesen werden. Ebenfalls zu einer Kolokalisation kommt es mit Markerproteinen von synaptischen Vesikeln, wie dem SNARE associated protein (SNAPIN) oder dem Vesikel-assoziierten Membranprotein 2 (VAMP2) (Granata *et al.*, 2008). Dieses Muster korrespondiert mit den in menschlichen- und Nagergehirnen gefundenen Ergebnissen, die einen Transport des Proteins vom ER in Vesikeln zum präsynaptischen Ende des Axons postulieren (Augood *et al.*, 2003).

Durch die ΔE -Mutation sowie deren Überexpression ändert sich die Lokalisation von TorsinA hin zur Kernmembran, wo es sich anreichert und membranöse Einschlusskörperchen ausbildet (Gerace, 2004; Giles *et al.*, 2008; Gonzalez-Alegre *et al.*, 2004; Goodchild *et al.*, 2004; Hewett *et al.*, 2000; Kustedjo *et al.*, 2003; Naismith *et al.*, 2004b).

Hierbei handelt es sich nicht um Aggregate eines Proteins, wie sie bei Morbus Parkinson zu beobachten sind, sondern um membranumschlossene Körper, deren Herkunft allerdings noch nicht geklärt ist, da eine Kolokalisation von ER- und Kernmembranproteinen mit den Einschlusskörperchen stattfindet (Gonzalez-Alegre *et al.*, 2004; Hewett *et al.*, 2000). Kolokalisationen mit den Einschlusskörperchen konnten den Proteinen SNAPIN (Granata *et al.*, 2008), Tyrosinhydroxylase (TH) (O'Farrell *et al.*, 2009), dem vesikuläre Monoamintransporter (VMAT2) (Misbahuddin *et al.*, 2005) und dem Protein TAU (Ferrari-Toninelli *et al.*, 2004) nachgewiesen werden. Ob diese Kolokalisationen aus einer direkten Interaktion mit TorsinA hervorgehen, die Proteine also mit TorsinA zusammen ummantelt werden, oder ob diese Proteine zum Aufbau der Einschlusskörperchen benötigt werden, ist nicht bekannt.

Die membranösen Einschlusskörperchen konnten auch in Tiermodellen beobachtet werden. Der Knockout von TorsinA führt zur Bildung membranöser Strukturen im Rückenmark von Mäusen (Goodchild *et al.*, 2005b). In Mäusen, welche TorsinA ΔE überexprimieren und bei DYT1-Dystonie-Patienten können ebenfalls Akkumulationen von TorsinA an der Kernmembran beobachtet werden, welche mit Ubiquitin und Lamin A/C kolokalisieren (Grundmann *et al.*, 2007; McNaught *et al.*, 2004).

1.3.2.2 Zeitliches Expressionsmuster

TorsinA kann als Transkript und Protein schon pränatal in Maus- und Rattengehirnen nachgewiesen, etwa in 11 Tage alten Mausedembryonen, bzw. 20 Tage alten Rattenembryonen (Vasudevan *et al.*, 2006; Xiao *et al.*, 2004). TorsinA kann während der gesamten Lebensspanne der Tiere nachgewiesen werden, allerdings mit unterschiedlichen Expressionsleveln. So konnte in Mäusen während der Embryonalentwicklung und bis zum einem Alter von sieben Tagen eine stetig wachsendes Proteinlevel im gesamten Gehirn nachgewiesen werden. Nach dieser Expressionsspitze sinkt das Proteinlevel allerdings mit steigendem Alter wieder ab. In verschiedenen Gehirnregionen findet man eine Verschiebung des Zeitpunktes der stärksten Expression. Im Striatum, Hippocampus und Thalamus und liegt sie zwischen Tag 15/17 der Embryonalentwicklung und sieben Tagen nach der Geburt, während im Kortex das höchste Expressionslevel zwischen Tag 15 und 17 der Embryonalentwicklung vorliegt. Ganz im Gegenteil zum Cerebellum und dem Hirnstamm, wo die Expression im Alter von 14 Tagen am höchsten ausfällt (Vasudevan *et al.*, 2006).

Die Quantifizierung von Real-time-PCR von TorsinA in Rattengehirn ergaben ähnliche Ergebnisse. Auch hier fällt das Expressionslevel von TorsinA nach hoher Expression während der Embryonalentwicklung ab einem Alter von sieben Tagen stark ab. Im Gegenteil zur Maus steigt die Expression von TorsinA im Kortex der Ratte im Alter von sieben Tagen stark an und erreicht sein Expressionsmaximum erst am Tag 14 nach der Geburt. Auch hier folgt ein starkes Absinken des TorsinA-Proteinlevels nach Erreichen des Maximums (Xiao *et al.*, 2004).

Da eine ähnlich aufwändige Studie am Menschen nicht möglich ist, kann das Expressionsmuster von TorsinA nur anhand weniger Proben ermittelt werden. Aber auch hier zeigt sich eine Expression in der frühen postnatalen Periode bis zum Tod. Allerdings konnte kein TorsinA in Föten oder Neugeborenen nachgewiesen werden, erst ab einem Alter von einem Monat konnte TorsinA Expression in dopaminergen Neuronen der Substantia nigra beobachtet werden (Siegert *et al.*, 2005).

Die in Mensch und Maus experimentell bestätigte starke Expression von TorsinA während der prä- und frühen postnatalen Phase deutet auf eine wichtige Funktion oder gar Unerlässlichkeit von TorsinA während der neuronalen Entwicklung hin. In der Phase starker TorsinA-Expression finden Neurogenese, Migration und Synapsenbildung im sich entwickelnden Gehirn statt (Vasudevan *et al.*, 2006). So korreliert die hohe Expression im Striatum mit dem Reifen der „medium spiny neurons“ im Striatum, die zu diesem Entwicklungszeitpunkt ihre elektrophysiologischen Eigenschaften entwickeln und Verbindungen zum Kortex herstellen (Sheth *et al.*, 1998; Tepper *et al.*, 1998).

Ebenfalls übereinstimmend mit der TorsinA-Expression im Striatum ist die Entwicklung des nigrostriatalen Dopaminstoffwechsels. So wachsen mit Anstieg des Dopaminlevels die ersten dopaminergen Axone ab Tag 13 der Embryonalentwicklung in das Striatum ein, kurz bevor die maximale Expression von TorsinA erreicht wird (Ohtani *et al.*, 2003; Popolo *et al.*, 2004). Danach korreliert der Anstieg des TorsinA-Levels mit der Anzahl der dopaminergen Neuronen, welche ein

dichtes Netzwerk im Striatum bilden, und im frühen postnatalen Stadium mit den medianen Bereichen des Gehirns dopaminerge Synapsen bilden (Moon Edley *et al.*, 1984; Riddle *et al.*, 2003; Specht *et al.*, 1981).

Auch im Hippocampus gibt es eine Korrelation zwischen TorsinA-Expression und Neurogenese. Diese beginnt am Tag 10 der Embryonalentwicklung und ist vor der Geburt abgeschlossen, während sie sich im Gyrus dentatus auch nach der Geburt fortsetzt, einer Phase starker TorsinA-Expression im Hippocampus (Altman *et al.*, 1990; Bayer, 1982; Cameron *et al.*, 1993; Gage *et al.*, 1998).

1.3.2.3 Expressionskontrolle

THAP1, ein Transkriptionsfaktor mit einem atypischen Zinkfingermotiv, kann direkt mit dem Promotor von TorsinA interagieren. Dies geschieht über eine bereits bekannte Erkennungssequenz, der THAP-domain-binding sequence (THABS), sowie über eine bisher unbekannte nicht konservierte Sequenz im upstream-Bereich des *TOR1A*-Promotors (Gavarini *et al.*, 2010; Kaiser *et al.*, 2010). Diese Interaktion führt zu einer Herunterregulierung der TorsinA-Expression, was eine Repressorfunktion von THAP1 vermuten lässt (Kaiser *et al.*, 2010).

Mutationen in THAP1 sind für die Entstehung der DYT6-Dystonie verantwortlich (Bressman *et al.*, 2009) und verhindern zusätzlich die Bindung von THAP1 an *TOR1A*.

Die fehlende Repression von TorsinA und die darauf folgende Überexpression könnte ein weiterer Faktor für den Ausbruch der DYT1-Dystonie darstellen, da TorsinA normalerweise während der Entwicklung streng reguliert zu sein scheint (siehe Kap. 1.3.3.2). Dies könnte auch ein weiterer genetischer Faktor sein, welcher die variable Expression bzw. Penetranz beeinflusst.

1.3.2.4 Halbwertszeit und Abbau von TorsinA

In verschiedenen Modellsystemen gibt es ähnliche Beobachtungen zur Halbwertszeit und dem Abbau von TorsinA. So konnte in SH-SY5Y-Zellen eine Halbwertszeit von ca. 80h für TorsinA WT und knapp 24h für TorsinA ΔE nachgewiesen werden. Es wurde argumentiert, dass dieser Unterschied durch verschiedene Abbauwege erklärbar sei. So wird TorsinA WT hauptsächlich durch den lysosmalen Weg, genauer Makroautophagie, abgebaut, was auch für die mutante Form zutrifft. Allerdings kommt es vermutlich wegen der Relokalisation von TorsinA ΔE zur Kernmembran zusätzlich zur Aktivierung des proteasomalen Weges, welcher auch für die Degradation von falsch gefalteten Proteinen zuständig ist (Giles *et al.*, 2008).

Experimente in Cos7-Zellen kamen zu einem ähnlichen Ergebnis. TorsinA WT wird exklusiv durch Makroautophagie abgebaut, während TorsinA ΔE durch den proteasomalen Weg abgebaut wird (Gordon *et al.*, 2008).

Diese „2-Wege-Strategie“ zur Degradation von TorsinA ΔE könnte darauf zurückzuführen sein, dass die Zelle nicht nur zwischen der Lokalisation der Proteine unterscheidet, sondern auch deren Struktur. So könnte die Degradation von Monomeren durch Endoplasmic-reticulum-associated protein degradation (ERAD) erfolgen, während durch Autophagie primär Oligomere und aggregierte Proteine abgebaut werden (Giles *et al.*, 2009).

1.3.3 Einfluss der Mutation ΔE auf Pathogenese und Interaktionspartner von TorsinA

Die exakte Funktion von TorsinA ist noch immer nicht bekannt. Ein wichtiger Faktor hierbei ist die enge Verwandtschaft TorsinAs zur AAA+-Proteinfamilie, die eine Konkretisierung der Funktion von TorsinA erschwert, da diese eine Vielzahl s besitzen (Snider *et al.*, 2008; Vale, 2000). TorsinA gehört zur AAA+-Familie, der eine Vielfalt von zellulärer Funktionen wie Proteinfaltung und Degradierung, Aufbau von Proteinkomplexen, Vesikeltransport und Herstellung sowie Auf- und Abbau des Zytoskeletts zugeordnet werden. Die Identifikation von Interaktionspartnern hat Aufschluss darüber geben können, welche verschiedenen Funktionen dieser Proteinfamilie TorsinA zugeordnet werden können, was wiederum zu Rückschlüsse auf den genauen Ablauf der Pathogenese der DYT1-Dystonie von der ursprünglichen Mutation ΔE in TorsinA bis zur Manifestation der ersten Symptome zuließ.

Da TorsinA in neuronalen und in nicht-neuronalen Geweben exprimiert wird (Augood *et al.*, 1998; Shashidharan *et al.*, 2000b) (siehe auch Kap. 1.3.2), die Krankheit jedoch einen ausschließlich neuronalen Phänotyp aufweist, wird davon ausgegangen, dass die ΔE Mutation eine neuronale Funktion von TorsinA stört.

Die auffälligste zelluläre Veränderung von TorsinA durch die ΔE -Mutation ist die verstärkte Relokalisation des TorsinA-Proteins vom Lumen des ER hin zur Zellkernmembran, wo es zur Bildung membranöser, perinukleärer Einschlusskörperchen kommen kann. Dies wurde durch zahlreiche Versuche mit verschiedenen überexprimierenden oder Knock-in ΔE -Zelltypen (Gonzalez-Alegre *et al.*, 2004; Goodchild *et al.*, 2004; Hewett *et al.*, 2000; Kustedjo *et al.*, 2003; Naismith *et al.*, 2004b), in Tiermodellen (Dang *et al.*, 2005a; Grundmann *et al.*, 2012b; Grundmann *et al.*, 2007; Shashidharan *et al.*, 2005) und auch im Patienten (McNaught *et al.*, 2004) nachgewiesen. Des Weiteren gibt es Hinweise darauf, dass auch die Überexpression von TorsinA WT zu diesem pathologischen Phänomen führen kann (Grundmann *et al.*, 2007).

Ebenso führt ein Knockout des *TOR1A* Gens in der Maus zu morphologischen Auffälligkeiten wie einer geweiteten und unterbrochenen Kernmembran sowie membranösen Einschlusskörperchen (Goodchild *et al.*, 2005b).

Eine Erklärung für die Akkumulation von TorsinA ΔE in der Kernmembran könnte das Vorhandensein eines Substrates für TorsinA in dieser sein. Da TorsinA ΔE eine geringere Hydrolyseaktivität und damit eine größere Affinität zu seinem Substrat besitzt, könnte dies zu einem „Substrate trap“, einem Festsitzen von TorsinA zusammen mit seinem Substrat, in der Kernmembran führen (Gerace, 2004;

Konakova *et al.*, 2005). Diese Hypothese kann durch eine weitere TorsinA Mutation (E171Q) unterstützt werden (Goodchild *et al.*, 2004; Naismith *et al.*, 2004a). Diese Mutation der Walker B Domäne führt zu einem Hydrolyse-defizienten Protein, dieses kann zwar ATP binden, aber nicht hydrolysieren, wodurch TorsinA E171Q ebenfalls in der Kernmembran gefunden werden kann, da es seine normale Funktion nicht vollenden kann. Diese Akkumulation von Proteinen an der Kernmembran könnte zu deren morphologischen Veränderungen führen (Bragg *et al.*, 2004b; Gonzalez-Alegre *et al.*, 2004). Da die Kernmembran auf einen erhöhten Proteinlevel mit einer erhöhten Syntheserate von Membranen antwortet, könnte dies das Auftreten der TorsinA positiver Einschlusskörperchen erklären (Wright *et al.*, 1988). Dies führt zur Bildung geometrischer Membranstrukturen, sogenannter „Karmellae“. Diese können auch durch die Überexpression von GFP, welches zur Bildung von Homodimeren neigt, in der Kernmembran induziert werden, was für das Hexamere bildende TorsinA ebenfalls zutreffen könnte (Snapp *et al.*, 2003).

Neben der Relokalisation führt die ΔE Mutation auch zu einer deutlich verringerten Halbwertszeit des TorsinA Proteins in dopaminergen Neuronen, was durch das deutlich verringerte TorsinA Proteinlevel in TorsinA ΔE Knock-in Tieren gestützt werden kann (Giles *et al.*, 2008; Goodchild *et al.*, 2005b).

1.3.3.1 Funktionen TorsinA als Chaperon

Aufgrund seiner engen Verwandtschaft mit Clp/Hitzeschockproteinen liegt die Vermutung nahe, dass TorsinA eine Funktion ähnlich eines Chaperons besitzt, auch wenn keine Stress-induzierte Hochregulation in Zellen stattfindet (Bragg *et al.*, 2004a; Goodchild *et al.*, 2004; Hewett *et al.*, 2003). Nichtsdestotrotz kann in Zellkultur die Überexpression von TorsinA vor oxidativem Stress schützen. Schon kleinste Dosen von H_2O_2 führen zu einer Zunahme der Molekularen Masse von TorsinA durch kovalente Modifikationen sowie zu einer Relokalisation in membranöse Ausstülpungen. Wie diese Veränderungen das Absterben der von PC12- und COS-1-Zellen unter oxidativem Stress verhindern können ist allerdings noch unbekannt (Hewett *et al.*, 2003; Kuner *et al.*, 2003; Shashidharan *et al.*, 2004). Dies ist besonders im Zusammenhang mit dem Dopaminstoffwechsel interessant, da hier große Mengen von ROS direkt in den dopaminergen Neuronen entstehen (Adams Jr *et al.*, 2001; Cao *et al.*, 2005). Da TorsinA ebenfalls in dopaminergen Neuronen exprimiert wird, könnte ein durch die ΔE -Mutation verringerter Schutz der Zelle vor ROS in intensiven Phasen des motorischen Lernens zum Ausbruch der Krankheit führen (Breakefield *et al.*, 2001; Hewett *et al.*, 2003; Kuner *et al.*, 2003). Auch in einem Modell für amyotrophe Lateralsklerose in *C. elegans* konnte ein verringertes Stresslevel im ER nach Überexpression von TorsinA nachgewiesen werden, einhergehend mit einer Verbesserung des motorischen Defektes dieses Modells (Thompson *et al.*, 2014). Über eine weitere Chaperonfunktion verfügt das zu TorsinA homologe Protein in *Drosophila melanogaster*, torp4a. Es schützt bei Überexpression vor Degradation der Retina (Muraro *et al.*, 2006).

Allerdings legen *in vitro*-Experimente nahe, dass TorsinA ΔE eine ähnliche hohe Schutzfunktion wie TorsinA WT besitzt (Burdette *et al.*, 2010). Auch im α -Synuclein überexprimierenden-Mausmodell kann nach dem Knockout von TorsinA keine erhöhten Schäden durch ROS festgestellt werden (Li *et al.*, 2012).

Neben der Schutzfunktion vor oxidativem Stress kann TorsinA auch Zellen vor Stress im ER schützen. Dieser tritt meist durch Anhäufung von (fehlgefalteten) Proteinen auf. Dies kann aus unterschiedlichen Gründen eintreten, unter anderem durch Glukosemangel oder virale Infektionen. Die Zelle antwortet darauf mit der „Unfolded Protein Response“ (UPR) (Chakrabarti *et al.*, 2011). So konnte anhand von Nematoden gezeigt werden, dass eine Überexpression von TorsinA WT die Expression des Heat Shock Protein-4 (*hsp-4*) als Reaktion auf ER-Stress senkt. Dieser Effekt konnte nicht mit TorsinA ΔE oder TorsinA-D216H alleine erzielt werden. Durch die Expression von TorsinA-D216H in Kombination mit TorsinA WT oder ΔE konnte der Stresslevel allerdings deutlich gesenkt werden, was eine möglicherweise schützende Funktion des D216H-Polymorphismus unterstreicht (Chen *et al.*, 2010). Des Weiteren konnte in Fibroblasten aus TorsinA ^(-/-)-Mäusen (Chen *et al.*, 2010) eine erhöhte Stressanfälligkeit festgestellt werden, ebenso in Fibroblasten aus DYT1-Patienten (Nery *et al.*, 2011). Auch während des Transports von defekten oder fehlgefalteten Proteinen aus dem ER in das Zytosol zum Abbau durch das Proteasom, der sogenannten „Endoplasmic-reticulum-associated protein degradation“ (ERAD) spielt TorsinA eine zentrale Rolle. Durch Interaktion mit den ERAD assoziierten Proteinen Derlin-1, p97 und VIMP scheint TorsinA eine Kontrollfunktion der Degradation innezuhaben (Nery *et al.*, 2011). Durch die Expression von TorsinA ΔE wurde der Abbau fehlgefalteter Proteine inhibiert. Diese Funktion kann durch Medikation in Nematoden verbessert werden und könnte ein Ziel für die Entwicklung von Medikamenten für den Patienten darstellen (Cao *et al.*, 2010).

Ein weiterer Hinweis auf eine mögliche Chaperonfunktion von TorsinA ist die Kolokalisation von TorsinA mit α -Synuclein in Lewy-Körperchen bei Parkinson-Patienten (Sharma *et al.*, 2001; Shashidharan *et al.*, 2000a). Auch in Patienten mit Chorea Huntington und Spinozerebellärer Ataxie Typ 3 konnte eine Kolokalisation von TorsinA mit den für die Krankheiten typischen ubiquitinierten intraneuralen Einschlusskörperchen nachgewiesen werden (Walker *et al.*, 2003). Zusätzlich zur Kolokalisation zeigen Experimente *in vitro* und in Nematoden eine protektive Funktion von TorsinA, welche die Zelle vor der Aggregation von Proteinen schützen kann, während TorsinA ΔE dies nicht vermag (Caldwell *et al.*, 2003; McLean *et al.*, 2002).

Da allerdings keine direkte Regulation von TorsinA bei Auftreten von Stress erfolgt, ist eine Art Pufferfunktion von TorsinA denkbar, die das Einsetzen des ER-Stresses hinauszuzögern vermag und durch die ΔE -Mutation in ihrer Funktion gestört wird (Chen *et al.*, 2010).

1.3.3.2 Interaktion mit dem Zytoskelett

TorsinA interagiert mit mehreren Proteinen des Zytoskeletts, unter anderem Vimentin, ein Klasse III Intermediärfiliament (Hewett *et al.*, 2006). Es bildet mit weiteren Bausteinen des Zytoskeletts ein Netzwerk um den Zellkern (Herrmann *et al.*, 2003) und ist unter anderem für die Aufrechterhaltung der Zellintegrität, Chemotaxis und Transport in der Zelle verantwortlich (Helfand *et al.*, 2003). Durch die Expression von TorsinA ΔE kommt es zu einer Anreicherung von Vimentin in TorsinA ΔE positiven Einschlusskörperchen, was die Funktionalität von Vimentin beeinflussen könnte. So konnte in Fibroblasten von DYT1-Patienten ebenfalls eine Anreicherung von Vimentin an der Kernmembran sowie eine verschlechterte Anheftung der Zellen auf den Kulturschalen beobachtet werden (Hewett *et al.*, 2006). Ein Grund dafür könnte eine stabilere Interaktion von Vimentin mit TorsinA ΔE als mit wildtypischem TorsinA sein, wodurch die ursprüngliche Funktion Vimentin in der Zelle verhindert werden könnte. Auch im Nematoden *C. elegans* interagiert das Protein OOC-5, ein TorsinA-Homolog, mit dem Zytoskelett. In diesem Kontext scheint es für die Lokalisation des Zellkerns während der Embryogenese verantwortlich zu sein (Basham *et al.*, 1999).

Eine Interaktion von TorsinA mit dem Protein TAU, welches unter anderem für die Polarität der Zelle verantwortlich ist, konnte in SH-SY5Y-Zellen nachgewiesen werden (Ferrari-Toninelli *et al.*, 2004).

Zusätzlich scheint TorsinA durch indirekte Interaktion über verschiedene Mikrotubuli-assoziierte Proteine einen wichtigen Einfluss auf das Zytoskelett auszuüben (Ferrari Toninelli *et al.*, 2003).

Ein weiterer Interaktionspartner von TorsinA ist Kinesin Light Chain 1 (KLC1), eine Untereinheit des Motorproteins Kinesin, welches für interzelluläre Transportprozesse entlang von Mitochondrien zuständig ist. Diese Interaktion deutet entweder auf einen anterograden Transport von TorsinA oder auf eine Regulation des Transportes respektive der Beladung der Kinesine hin, während eine Interaktion von TorsinA ΔE und KLC1 nicht nachgewiesen werden konnte (Kamm *et al.*, 2004). Weiter bestätigt werden kann dies durch die Kolokalisation von TorsinA mit Markern für synaptischen Vesikel. So zeigt sich in SH-SY5Y-Zellen eine Kolokalisation mit Synaptobrevin (Hewett *et al.*, 2000) beziehungsweise SNAPIN in PC12-Zellen (Hewett *et al.*, 2006).

1.3.3.3 Interaktion mit LAP1 und LULL

Im Jahr 2005 wurde das Protein LaminA associated protein 1 (LAP1) als Interaktionspartner von TorsinA identifiziert. LAP1 ist in Funktionen des Zytoskelettes involviert, es dient unter anderem der Instandhaltung der Kernmembran (Goodchild *et al.*, 2005a; Santos *et al.*, 2015).

Eine Überexpression von LAP1 kann TorsinA, wie die pathogene Mutation ΔE , an die Kernmembran rekrutieren (Goodchild *et al.*, 2005a), wo LAP1 lokalisiert ist. Neben LAP1 konnte in dieser Studie ein weiteres Protein als Interaktor von TorsinA identifiziert werden: lumenal domain like LAP1 (LULL1). Bei beiden Proteinen handelt es sich um Typ 2 transmembran Proteine, welche jeweils eine ähnliche

lumenale Domäne aufweisen. Im Gegensatz zu LAP1 ist LULL1 im ER lokalisiert, eine Überexpression führt jedoch ebenso zur Anreicherung von TorsinA zur Kernmembran (Vander Heyden *et al.*, 2009). Ursprünglich wurden beide Proteine als Substrat von TorsinA klassifiziert, da die Interaktion mit TorsinA ΔE zu einer stärkeren Bindung mit beiden Proteinen führte (Goodchild *et al.*, 2005a). Diese Interaktion findet über die lumenale Domäne von LAP1/LULL1 mit der Sensor 2 Domäne von TorsinA statt und scheint essentiell für die Funktion von TorsinA als ATPase zu sein (Zhu *et al.*, 2010). Kommt es zu einer direkten Interaktion der Proteine, steigert sich die ATPase Aktivität von TorsinA extrem. Hierbei scheint LULL1 eine knapp dreifach höhere Aktivität zu ermöglichen als die Interaktion mit LAP1. Dieses Phänomen kann auch bei den weiteren Vertretern der Torsin Proteinfamilie beobachtet werden, während TorsinA ΔE selbst mit hohen Konzentration von LAP1 und LULL1 keine ATPase-Funktion entfaltet (Zhao *et al.*, 2013).

Nach Aufklärung der Kristallstruktur von LAP1 wurde ein neuer Mechanismus der Interaktion von LAP1/LULL1 mit TorsinA vorgestellt. LAP1 und LULL1 sind in der Lage mit TOR1A heterohexamere Strukturen zu formen, die das aktive Hexamer darstellen (siehe Abb. 1.3.3). Des Weiteren konnte bei LAP1/LULL1 eine atypische AAA+ Domäne identifiziert werden, welche im Gegensatz zu den meisten AAA+ Proteinen dazu führt, dass LAP1 und LULL1 keine Nukleotide binden können. In einem Heterohexamer könnte diese Domäne aber direkt mit der korrespondierenden Domäne des TorsinAs interagieren und so eine aktivierende Funktion innehaben (Sosa *et al.*, 2014).

Ein weiteres Argument für den direkten Zusammenhang dieser Proteine ist der Phänotyp des LAP1 Knockout, welcher einen ähnlichen Phänotypen wie das TorsinA Knockout Modell zeigt, eine Erweiterung des perinukleären Spaltes sowie membranöse Einschlusskörperchen (Kim *et al.*, 2010).

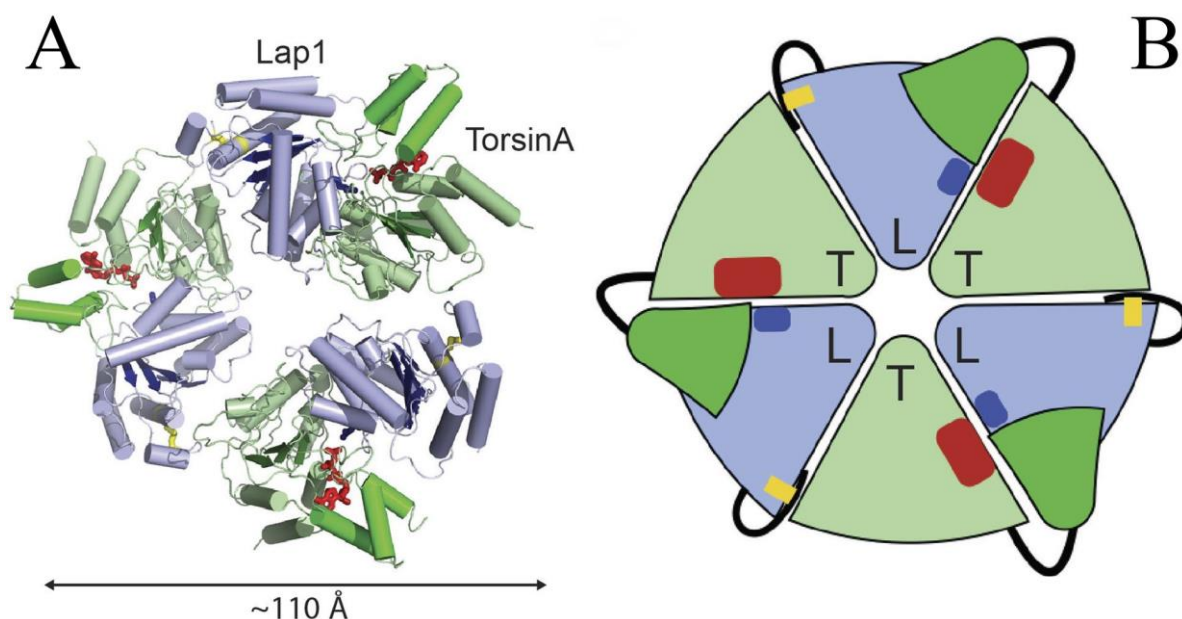


Abb. 1.3.3 Interaktion von TorsinA mit LAP1

TorsinA besitzt die Fähigkeit zusammen mit LAP1 eine metabolisch aktive Heterohexamere-Struktur zu formen. Darstellung der Strukturebenen (A) sowie schematisch (B). TorsinA wird in grün dargestellt, LAP1 in blau, zusätzlich wurde ein ATP in die Bindungstasche von TorsinA modelliert (rot). Modifiziert nach Sosa *et al.*, 2014.

1.3.3.4 Einfluss von TorsinA auf den sekretorischen Weg und Vesikelbildung

Neben seiner putativen Funktion in der Kontrolle der Proteinsynthese scheint TorsinA in gleicher Weise einen Einfluss auf die Sekretion von Proteinen über den Golgi-Apparat (GA) zu haben (Esapa *et al.*, 2007; Hewett *et al.*, 2000; Hewett *et al.*, 2007; Torres *et al.*, 2004). So führt die Überexpression von TorsinA zu einer verminderten Prozessierung von Membranproteinen, wie dem Dopamin Transporter (DAT) oder ϵ -Sacroglykan. Dieser Effekt ist bei Überexpression von TorsinA ΔE nicht zu beobachten (Esapa *et al.*, 2007; Torres *et al.*, 2004). In Fibroblasten von DYT1-Patienten kann ebenso eine verringerte Sekretionsrate beobachtet werden, ähnlich der Sekretionsrate in Fibroblasten mit durch siRNA herunterreguliertem TorsinA (Hewett *et al.*, 2008; Hewett *et al.*, 2007).

Des Weiteren konnte ein Effekt von TorsinA auf die Endo- und Exozytose von Vesikeln im synaptischen Spalt nachgewiesen werden, was durch die veränderten Mengen an Neurotransmitter im synaptischen Spalt ein Hinweis auf die Pathogenese von TorsinA sein könnte. In TorsinA WT überexprimierenden SH-SY5Y-Zellen wurde eine verlangsamte Wiederaufnahme von synaptischen Vesikeln beobachtet, in TorsinA ΔE überexprimierenden Zellen wurde das genaue Gegenteil, eine schnellere Wiederaufnahme der Vesikel (Granata *et al.*, 2008), beobachtet. Ein weiterer Hinweis auf eine Beteiligung von TorsinA während der Exozytose von synaptischen Vesikeln ist seine Interaktion mit dem Protein Signalosome complex subunit 4 (CSN4), durch sie auf die Stabilität von SNAPIN Einfluss nehmen (Granata *et al.*, 2011).

Versuche mit hippocampalen Neuronen von heterozygoten TorsinA ΔE Knock-in-Mäusen, ähnlich der Situation in DYT1-Patienten, zeigten eine erhöhte Exozytoserate im Vergleich zu Versuchen mit Wildtyptieren, besonders nach starker vorhergegangener Stimulation der Neuronen (Kakazu *et al.*, 2012).

Yokoi *et al.* nutzten ebenfalls heterozygote TorsinA ΔE Knock-in-Mäuse, um den Einfluss von TorsinA auf Endo- und Exozytose zu messen. Hierbei wurden elektrophysiologische Messungen an 400 μ m dicken hippocampalen Schnitten vorgenommen. Es konnten im Vergleich zum Wildtyp signifikant erhöhte „Paired Pulse Ratios“ an der Postsynapse gemessen werden. Diese sind invers proportional zur Wahrscheinlichkeit einer Transmitterausschüttung an der Präsynapse (Debanne *et al.*, 1996), was auf eine verringerte Exozytoserate von Vesikeln am synaptischen Spalt, bedingt durch die pathogene Mutation von TorsinA, schließen lässt (Yokoi *et al.*, 2013).

1.3.3.5 Interaktion von TorsinA mit dem Dopaminstoffwechsel und der dopaminergen Synapse

Durch die häufig beobachteten Interaktionen von TorsinA und dem dopaminergen System wurde die Frage nach einem Zusammenhang der DYT1-Dystonie und Fehlfunktionen im dopaminergen System oder den Basalganglien aufgeworfen.

Nach Identifikation von Mutationen in den Genen der Tyrosinhydroxylase (Lüdecke *et al.*, 1995) sowie der GTP-Cyclohydrolase (Ichinose *et al.*, 1994), welche durch einen Mangel an Dopamin eine Dystonie (DYT5) hervorrufen können, wurde ein Zusammenhang zwischen Dopamin und einem dystonen Phänotyp immer deutlicher.

Auch nicht hereditäre Dystonien können teilweise auf eine Störung im Dopaminstoffwechsel zurückgeführt werden. Eine Läsion im Striatum oder die Einnahme von Dopamin Rezeptor 2 affinen Neuroleptika führen zu einer Dystonie beziehungsweise dystonen Phänotypen (Rupniak *et al.*, 1986). Die Medikation von Morbus Parkinson Patienten durch L-DOPA kann ebenso zu einem dystonen Phänotypen führen (Buchman *et al.*, 1988).

In bisher untersuchten Nagermodellen ist TorsinA stark in prä- und postnatalen Gehirnen, besonders in der Substantia nigra pars compacta exprimiert. Eine vergleichbar starke Expression konnte in Gehirnen von DYT1-Patienten bisher nicht nachgewiesen werden, was allerdings an einem Mangel an Gewebe liegt, da die starke Expression im Nagermodell meist 14 Tage nach Geburt absinkt (Rostasy *et al.*, 2003; Siegert *et al.*, 2005).

Allerdings kann eine Vergrößerung der dopaminergen Neuronen von Patienten mit mutantem TorsinA ΔE im Vergleich zu Neuronen der Kontrollen beobachtet werden. In Positronen-Emissions-Tomographie-Untersuchungen (PET) von DYT1-Patienten und nicht manifestierenden Trägern der ΔE -Mutation wurde zusätzlich eine erhöhte metabolische Aktivität der Basalganglien festgestellt. (Hedreen *et al.*, 1988; Rostasy *et al.*, 2003)

Die Veränderungen im Striatum von DYT1-Patienten wurden in post-mortem Gewebe nachgewiesen, die Bindung von Dopamin an seine D1 und D2 Rezeptoren fällt bei DYT1-Patienten schwächer aus als in den Kontrollen (Asanuma *et al.*, 2005; Augood *et al.*, 2002).

Ebenso konnte ein erhöhter Level von 3,4-Dihydroxyphenylethylsäure (DOPAC) bei gleichzeitig niedrigerem Level von Dopamin gemessen werden. DOPAC ist ein Metabolit von Dopamin, ein höheres DOPAC-Level deutet daher auf einen erhöhten Dopamin-Umsatz hin (Augood *et al.*, 2002).

Aufgrund dieser Ergebnisse wurden in den verschiedenen Tiermodellen der Dopaminspiegel gemessen, was allerdings in unterschiedlichen, nicht einheitlichen Ergebnissen resultierte (Balcioglu *et al.*, 2007; Dang *et al.*, 2005a; Dang *et al.*, 2006; Grundmann *et al.*, 2012a; Grundmann *et al.*, 2007; Page *et al.*, 2010; Shashidharan *et al.*, 2005; Song *et al.*, 2012; Yokoi *et al.*, 2008; Zhao *et al.*, 2008), was auf Grund der verschiedenen verwendeten Tiermodelle begründet werden kann. Jedoch gelten diese Ergebnisse als ausreichend, um auf einen Einfluss von TorsinA auf den Dopamin-Level hinzuweisen.

Dieser Einfluss könnte auf die Interaktion von TorsinA mit dem Dopamintransporter (DAT) zurückzuführen sein, welche in transgenen hTorsinA ΔE Mäusen gestört ist und zu einer erhöhten Konzentration von Dopamin im postsynaptischen Spalt führt (Hewett *et al.*, 2010; Torres *et al.*, 2004). Neben Störungen der Wiederaufnahme und Prozessierung von Dopamin zeigen einige DYT1-Tiermodelle auch Auffälligkeiten an den Dopaminrezeptoren der Postsynapse.

So konnte mit transgenen hTorsinA ΔE Mäuse eine veränderte D2-Rezeptoraktivität gemessen werden, was zu einen exzitatorischen Effekt auf cholinerge Interneuronen (Pisani *et al.*, 2006) sowie sogenannte „medium spiny neurons“ des Striatums führt (Sciamanna *et al.*, 2009). Es wurde außerdem eine verringerte Menge an D2-Rezeptorprotein bei gleichbleibendem mRNA-Level nachgewiesen (Napolitano *et al.*, 2010). Dies wurde auch in hTorsinA- ΔE -Knock-in Mäusen beobachtet (Dang *et al.*, 2005b), ebenso wie eine verringerte Konzentration von D1-Rezeptoren, was erneut den Einfluss von TorsinA auf die dopaminerge Synapse unterstreicht (Yokoi *et al.*, 2015).

1.3.3.6 Die Rolle der Basalganglien

Die Dopamin Rezeptoren der Klasse 1 und 2 sind integrale Bestandteile der Signalkontrolle in den Basalganglien, welche eine Vielzahl von Steuerungsaufgaben innehaben, unter anderem für die Steuerung bewusster Bewegungen, Kognition, Lernen sowie Bewegung der Augen. Die genaue Funktion der Basalganglien ist noch nicht vollständig verstanden, die aktuelle Arbeitshypothese geht vereinfacht gesprochen von einem Regelkreis mit Filterfunktion aus. Dieser ermöglicht es gegenwärtig benötigte Handlungsmuster auszuwählen und zu prozessieren sowie nicht erwünschte Bewegungen zu

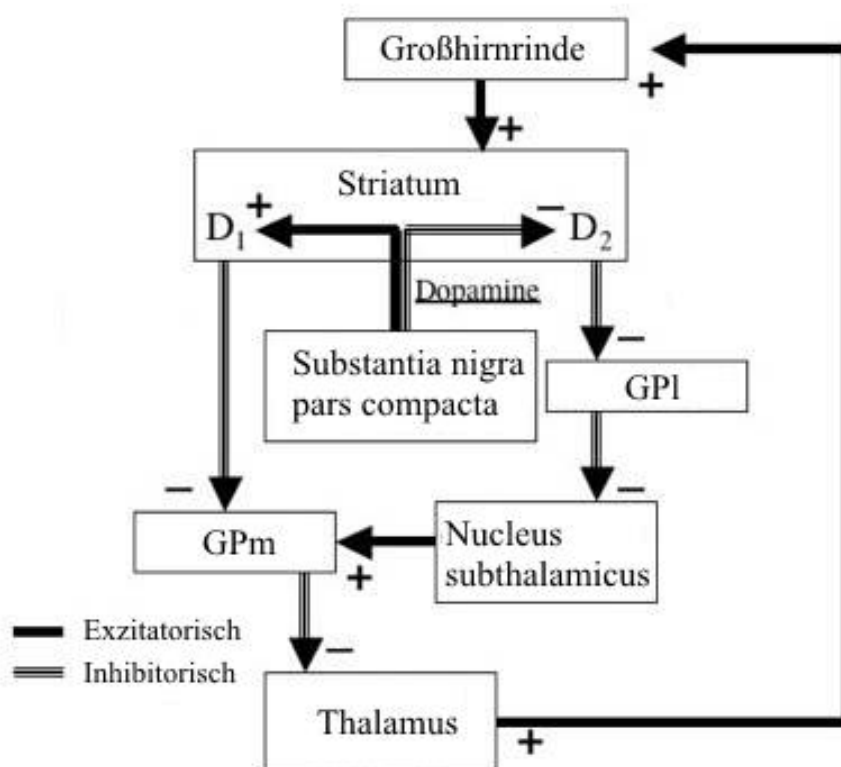


Abb. 1.3.4 Signalwege der Basalganglien

Das Striatum leitet die von der Großhirnrinde und der Substantia nigra erhaltenen Reize über einen direkten oder indirekten Signalweg weiter an den Thalamus, welcher in einer Rückkopplungsschleife die verarbeiteten Signale weiter an Nuclei der Großhirnrinde, z.B. den Motorcortex, leitet.

GPm = Globus pallidus medialis; GPI = Globus pallidus lateralis.

Modifiziert nach Swenson, 2006.

unterdrücken, um ein fehlerfreies Ablaufen von Handlungsmustern zu gewährleisten (Chakravarthy *et al.*, 2010; Stocco *et al.*, 2010).

Die Basalganglien liegen unterhalb der Großhirnrinde und bestehen aus mehreren miteinander verschalteten Nuclei (siehe Abb. 1.3.4), unter anderem auch dem Striatum, welches durch seine D1- und D2-Rezeptoren die Schnittstelle zur DYT1-Dystonie darstellt. Diese Rezeptoren teilen den Signalweg der Basalganglien in einen direkten (D1-Rezeptoren) sowie in einen indirekten Signalweg (D2-Rezeptoren) auf, welche sich gegenseitig hemmen können. Dies scheint eine Art Balance-Funktion darzustellen. Beide Signalwege erhalten exzitatorische Signale aus der gesamten Großhirnrinde, besonders aus der prämotorischen Rinde. Durch den direkten Signalweg werden inhibitorische Neuronen des Striatum aktiviert, welche die inhibitorische Wirkung des Globus pallidus medialis disinhibieren. Dies senkt den inhibitorischen Druck auf den Thalamus, welcher nun exzitatorisch auf den Motorkortex wirkt, was zu einer Bewegung führen kann.

Gegenteilig hierzu wirkt der indirekte Signalweg, welcher inhibitorische Signale an den Globus pallidus lateralis sendet. Da dieser gewöhnlich den Nucleus subthalamicus (NS) hemmt, führt dies nun zu einer Disinhibition, was einer Exzitation des NS entspricht. Der NS wirkt nun erregend auf den Globus pallidus medialis, was zu einer Inhibition des Thalamus und weitergeleitet zu einer Inhibition des Motorkortex führt (Swenson, 2006).

Verringerte Mengen an D2-Rezeptoren oder eine verringerte Aktivität, wie sie in Patienten und Tiermodellen nachgewiesen wurden, können daher eine den inhibitorischen Signalweg schwächen, was eine verringerte Schwelle für willkürliche Bewegungen darstellen kann (Asanuma *et al.*, 2005; Pisani *et al.*, 2006; Sciamanna *et al.*, 2009).

Wie die verringerte Menge von D1-Rezeptoren zur Pathogenese beiträgt, ist noch nicht abschließend geklärt, allerdings könnten hier weitere Fortschritte, wie auch bei der Erkenntnis über die Wirkweise der D2-Rezeptoren, zu möglichen Fortschritten in der Medikamentenentwicklung führen (Yokoi *et al.*, 2015).

1.3.4 Einfluss von TorsinA während der Entwicklung des zentralen Nervensystems

Die DYT1-Dystonie unterscheidet sich grundlegend von weiteren neurologischen Bewegungsstörungen wie Morbus Parkinson oder Chorea Huntington. Ein neurodegeneratives Krankheitsbild konnte bei den bisher untersuchten Patienten nicht nachgewiesen werden (siehe Kap. 1.1), allerdings zeigte eine Studie in DYT1-Patienten von McNaught *et al.* aus dem Jahr 2004 auffällige perinukleäre Einschlusskörperchen von TorsinA zusammen mit Ubiquitin und Lamin A/C in cholinergen und weiteren Neuronen des Hirnstamms (McNaught *et al.*, 2004). Diese Ergebnisse stimmen mit den Beobachtungen aus transgenen TorsinA ΔE überexprimierenden Tiermodellen sowie TorsinA ΔE Knock-in Tieren überein (Dang *et al.*, 2005a; Grundmann *et al.*, 2012b; Grundmann *et al.*, 2007; Shashidharan *et al.*,

2005). Die beschriebenen Beobachtungen konnten allerdings in keinen weiteren Patientenstudien repliziert werden (Paudel *et al.*, 2014).

Es wird daher im Moment von einer funktionellen Störung von Neuronen ausgegangen. Die genaue Ursache dieser Störung ist noch unbekannt, es könnte sich jedoch um eine Störung der generellen Funktion handeln oder aber auch um eine Störung, welche nur während der Entwicklung des zentralen Nervensystems (ZNS) von Bedeutung ist. Hierfür spricht, dass der Ausbruch der DYT1-Dystonie durch ein relativ genaues Zeitfenster definiert ist. Da die Penetranz der Krankheit lediglich circa 30% beträgt, können Träger der ΔE -Mutation, welche bis zu ihrem 28. Lebensjahr keine Symptome zeigen, davon ausgehen, dass sie auch weiterhin symptomfrei bleiben werden (siehe Kap. 1.1). Dieser Zeitraum korreliert stark mit der Reifung der Signalwege von Thalamus und des sensimotorischen Kortex (Barnea-Goraly *et al.*, 2005; Gogtay *et al.*, 2004; Niethammer *et al.*, 2011; Paus).

Des Weiteren ist die Expression von TorsinA im Gehirn streng reguliert und wird vor allem während der Embryonalentwicklung und in einem kurzen Zeitraum nach der Geburt stark hochreguliert (siehe Kap. 1.3.3.2). Diese Hochregulation erfolgt hauptsächlich in dopaminergen Neuronen.

Ein weiterer Hinweis auf die wichtige Rolle von TorsinA in der Embryonalentwicklung ist die Tatsache, dass homozygote *TORIA*-Knockout Mäuse kurz nach ihrer Geburt versterben.

In diesem Kontext hat sich der Begriff „neurodevelopmental disease“, eine Erkrankung des sich entwickelnden Nervensystems, in der Fachliteratur eingebürgert.

Allerdings ist weder geklärt, welcher Bereich (oder welche Bereiche) des Gehirns betroffen ist, beziehungsweise sind, noch zu welchem Zeitpunkt eine Mutation des *TORIA*-Gens die Entwicklung beeinträchtigt.

Durch die bereits beschriebene hohe Expression in den dopaminergen Neuronen des Striatums wurden zunächst die Basalganglien (siehe Kap. 1.3.5.1) als zentrales Element der DYT1-Pathogenese vermutet und untersucht. Neuere Studien schreiben allerdings auch dem Cerebellum eine wichtige Bedeutung zu (Carbon *et al.*, 2009; Jinnah *et al.*, 2006; Neychev *et al.*, 2008; Niethammer *et al.*, 2011).

Durch bildgebende Methoden wurden in DYT1-Dystonie Patienten, Mutationsträgern und Kontrollen, die cerebello-thalamo-corticalen-Signalwege als weitere wichtige Gehirnregionen für die Entstehung der DYT1-Dystonie klassifiziert, da sie auffällige mikrostrukturelle Veränderungen zeigten (Carbon *et al.*, 2004; Carbon *et al.*, 2008; Delmaire *et al.*, 2009; Niethammer *et al.*, 2011).

Auf zellulärer Ebene ist TorsinA durch verschiedene Experimente in Zusammenhang mit der Entwicklung der Neuronen gebracht worden. So scheint TorsinA für die Bildung von Neuronen nicht essentiell zu sein, da selbst die *TORIA*-Knockout Tiere, welche kurz nach ihrer Geburt versterben, keine neuroanatomischen Auffälligkeiten zeigen (Goodchild *et al.*, 2005b). Vielmehr scheint TorsinA eine Funktion während der Entwicklung bestimmter Gehirnstrukturen auszuüben, wie beispielsweise bei der Ausbildung der neuronalen Plastizität und des Neuritenwachstums.

1.3.4.1 Änderung der neuronale Plastizität

Neuronale Plastizität beschreibt die Möglichkeit von Neuronen ihre Signalstärke durch veränderte Signalübertragung anzupassen, sie zu potenzieren oder deprimieren.

Diese Möglichkeiten sind in DYT1-Patienten (Edwards *et al.*, 2006) wie auch in TorsinA ΔE Knock-in Mäusen (Martella *et al.*, 2009) und TorsinA ΔE überexprimierenden Ratten gestört (Grundmann *et al.*, 2012b). So zeigen striatale Neuronen in Knock-in Mäusen eine verringerte Fähigkeit ihre Signalstärke langfristig herab zu regulieren, was folglich zu einem Überschuss an Aktivität dieser Neuronen führt (Martella *et al.*, 2014).

1.3.4.2 Einfluss von TorsinA auf die Polarität von Neuronen

TorsinA ist nicht nur im Fokus der DYT1-Forschung, sondern beschäftigt auch Forscher außerhalb dieses Forschungsgebietes. So scheint TorsinA eine wichtige Funktion während der Abspaltung des Kapsids von Herpesviren von der Kernmembran zu haben, da eine Überexpression von TorsinA diesen Vorgang durch die Ausbildung von membranösen Einschlusskörperchen, wie sie auch in verschiedenen *in vitro* Modellen vorkommen, behindert (Maric *et al.*, 2011).

Einen ähnlichen Mechanismus zum Verlassen des Zellkerns wird auch von sogenannten Mega-Ribonucleotidproteinen (megaRNP) genutzt. MegaRNPs enthalten mRNAs sowie zu deren Translation benötigte Proteine und microRNAs. Diese vorgefertigten „Proteinfabriken“ werden zu bestimmten Arealen innerhalb der Zelle transportiert, wo sie nach Ankunft direkt mit der Synthese von Proteinen beginnen können. Dieser Mechanismus wird auch bei der Polarisierung der Zelle und der Ausbildung der Synapse genutzt, was bedeutet, dass megaRNPs vom Zellkern zur putativen Synapse transportiert werden. Dort dient meist das Auslösen der Synapse als Translationssignal. Dieser Vorgang wird in Verbindung mit der neuronalen Plastizität gebracht, da bei Langzeitdepression und Potenzierung neue Proteine synthetisiert werden müssen (Richter, 2001).

Auch zur direkten Ausbildung einer Synapse werden megaRNPs benötigt. So konnte in *Drosophila* beobachtet werden, wie Transkripte des WNT1-Rezeptors DFrizzld2 mit megaRNPs an die Postsynapse transportiert wurden, um dort einen Ankerpunkt für eine neue Synapse zu formen (Speese *et al.*, 2012). Neben der ursprünglichen Hypothese, dass megaRNPs den Zellkern durch Kernporen verlassen, konnte gezeigt werden, dass megaRNPs, ähnlich wie Herpesviren, die Fähigkeit besitzen, sich von der Kernmembran abzuknospen. Dies geschieht durch Ummantelung der viralen Kapside/megaRNPs durch die innere Kernmembran (IKM), wodurch sie in den perinukleären Spalt gelangen. Die anschließende Verschmelzung mit der äußeren Kernmembran (ÄKM) führt zur Freisetzung des Kapsids/megaRNP in das Zytoplasma (Speese *et al.*, 2012).

TorsinA spielt hierbei eine wichtige Rolle während der Ummantelung durch die IKM. So führt der Knockdown von TorsinA oder die Expression von TorsinA ΔE zu einer Akkumulation von megaRNPs

im perinukleären Spalt. Diese Behinderung des Transports könnte zu einer verringerten Anzahl an gebildeten Synapsen im Organismus führen, was die Verschaltung in bestimmten Gehirnregion empfindlich stören könnte und wiederum möglicherweise zum Ausbruch der DYT1-Dystonie führt (Jokhi *et al.*, 2013)

1.3.4.3 Der Einfluss von TorsinA auf das Neuritenwachstum

Durch seine Interaktion mit Zytoskelettproteinen (siehe Kap. 1.3.4.2) wurde der Einfluss von TorsinA auf das Neuritenwachstum untersucht, allerdings konnten bislang keine eindeutigen Erkenntnisse darüber gewonnen werden.

So beschreibt Ferrari-Toninelli 2004 einen negativen Einfluss von TorsinA auf des Neuritenwachstum der Neuroblastoma-Zelllinie SH-SY5Y nach Stimulation durch Retinsäure und dem Wachstumsfaktor „Brain-derived neurotrophic factor“, BDNF. Durch Knockdown des endogenen TorsinA wurde ein positiver Effekt auf die Neuritenlänge beobachtet. Es wurde eine mögliche Interaktion von TorsinA entweder direkt mit Mikrotubuli oder indirekt durch das Protein TAU postuliert. Eine Co-Immunpräzipitation bestätigte diese Hypothese und legt eine Modulation des Neuritenwachstums durch Interaktion von TorsinA und dem Protein TAU nahe (Ferrari-Toninelli *et al.*, 2004).

Hewett konnte 2006 in TorsinA ΔE überexprimierenden SH-SY5Y Zellen ebenfalls eine Verkürzung der Neuriten nach Stimulation mit BDNF feststellen, allerdings wurde hierbei eine generell positive Funktion von TorsinA auf das Auswachsen von Neuriten postuliert. Dies wurde durch einen weiteren Test mit DYT1-Patientenfibroblasten bestätigt. So zeigen ΔE -Fibroblasten Probleme beim Anwachsen auf den Zellkulturschalen im Vergleich zu den Kontrollen. Daraus wurde eine einschränkende Funktion von TorsinA ΔE abgeleitet. Diese Funktionen basieren auf dem Zytoskelettprotein Vimentin, die Interaktion mit TorsinA scheint in diesem Falle durch die ΔE -Mutation gestört zu sein.

Auch *in vivo* wurde eine Veränderung von Neuriten nachgewiesen. So besitzen die Purkinjezellen sowie die sogenannten „medium spiny neurons“ des Striatums von TorsinA ΔE Knock-in Mäusen deutlich weniger und dünnere Dendriten, als die Kontrollen. Zudem konnte gezeigt werden, dass die Knock-in Tiere ca. 12% weniger Dornfortsätze als ihre jeweiligen Kontrolltiere ausbilden (Song *et al.*, 2013; Song *et al.*, 2014).

Zusätzlich zu einer Funktion beim Wachstum der Neuronen scheint TorsinA auch eine Funktion während der Synaptogenese zu besitzen. So konnte in heterozygoten TorsinA KO Mäusen, sowie in TorsinA ΔE Knockin Mäusen eine deutlich reduzierte Formierung GABAerger Synapsen im Cerebellum dieser Mäuse (Vanni *et al.*, 2015).

1.4 TorsinB

TOR1B ist eines von drei homologen Genen von TorsinA. Sein 1011 Nukleotide langes Transkript kodiert für das ca. 38 kDa große Protein TorsinB, welches zur Familie der HSP100/Clp-Proteine, auch bekannt als AAA+-Proteine, gehört. Durch seine hohe Ähnlichkeit (ca. 84% auf Aminosäureebene, siehe (Abb. 1.4.1) zu TorsinA wird vermutet, dass es auch ähnliche Funktionen im Körper übernimmt. So besitzt TorsinB 4 konservierte Domänen (Walker A und B sowie Sensor 1 und 2), welche identisch mit Domänen aus TorsinA und Proteinen der HSP100/Clp-Proteinfamilie sind und für die ATPase-Funktion verantwortlich sind. (Ozelius *et al.*, 1997). Ebenso weist es auch die Aminosäuresequenz VAEEM auf, bei welcher eine Deletion eines Es in TorsinA zur DYT1-Dystonie führen kann.

Human Torsin A	(1)	----MKLGRAV LGL LLLA PSVQAVEPIS LGLAL ---AGVLTGYI -YPRLYCLFAECCGQKRS -LSREA
Human Torsin B	(1)	-MLRAGWLRGAAALALLLAARVVAAFEPIITVGLAIG -AASAITGYLSYNDIYCRFAECCREERP -LNASA
<i>Walker A</i>		
Human Torsin A	(63)	KDLDDN LFGQHLAKKTIILNAVFGFINNPKPKKPLTSLHGWGTGKNFVSKITIAENIYEGGLNSDYVHLF
Human Torsin B	(70)	LDLEEK LFGQHLATEVIFKALTGFRNNKNPKKPLTSLHGWAGTGKNFVSQLVAENLHPKGLKSNFVHLF
<i>Walker B</i>		
Human Torsin A	(133)	VATLHFPHASNITLYKDQLQLWIRGNVSACARSTFIFDEMCKMHA GLIDAIKPFLDYDLDVGVSYQKAM
Human Torsin B	(140)	VSTLHFPHAEQKIKLYQDQLQKWIRGNVSACANSVFIFDEMCKLHPGLIDAIKPFLDYEQVDGVSYRKAI
<i>Sensor 1</i>		
Human Torsin A	(203)	FIFLSNAGAEERITDVALDFWRSGKQREDIKLKDIEHALSVSVFNNKNSGFWHSSLIDRNLDYFVFPFLPL
Human Torsin B	(210)	FIFLSNAGGDLITKTALDFWRAGRKREDIQKLDLEPVLVGVFNNKHSGLWHSGLIDKNLDYFITPFLPL
<i>DYT1 mutation</i> <i>Sensor 2</i>		
Human Torsin A	(273)	EYKHLKMCIRVEMQSRGYEIDEDIVSRVAEEMTFFPKEERVFSDKGCKTVFTKLDYYDD
Human Torsin B	(280)	EYRHVKMCVRAEMRARGSAIDEDIVTRVAEEMTFFPRDEKIYSDKGCKTVQSRDLFH---

Abb. 1.4.1 Alignment von humanem TorsinA und B auf Aminosäureebene.

Modifiziert nach Sager *et al.*, 2012.

1.4.1 Räumliches Expressionsmuster von TorsinB

Die ersten Experimente zur Lokalisation von TorsinB wurden mit Nukleotid-basierenden Methoden durchgeführt und erbrachten keine eindeutigen Ergebnisse. So konnte TorsinB-RNA in post-mortem Gewebe von adulten Menschen durch Northern-Blot nachgewiesen werden (Ozelius *et al.*, 1997), allerdings nicht durch mRNA-in-situ-Hybridisierung (Augood *et al.*, 1999).

Erst durch immunhistochemische Methoden konnten verlässlichere Aussagen getroffen werden. TorsinB wurde in Gehirnen von Menschen und Mäusen ubiquitär innerhalb des ZNS detektiert, allein das Striatum der Maus zeigte eine schwächere Färbung. Diese Ergebnisse müssen jedoch kritisch betrachtet werden, da der verwendete Antikörper gegen TorsinB eine 62 kDa Bande detektiert, was ein ca. 50% höheres Molekulargewicht von TorsinB voraussetzt (Konakova *et al.*, 2001a; Konakova *et al.*, 2001c).

Durch weitere Experimente wurde ubiquitäre Lokalisation von TorsinB im ZNS allerdings bestätigt (Bahn *et al.*, 2006; Jungwirth *et al.*, 2010).

Es zeigte sich allerdings ein deutlich schwächeres Expressionslevel von TorsinB in neuronalen Zelltypen als in nicht neuronalen Geweben, wie zum Beispiel Leber und Muskelgewebe (Jungwirth *et al.*, 2010). So zeigten Mausembryonen am 18. Entwicklungstag in Herz-, Lungen-, Leber-, Niere-, Haut- und Zungengewebe eine deutlich höhere TorsinB Expression als in Geweben des ZNS (Kim *et al.*, 2010).

1.4.2 Zeitliches Expressionsmuster von TorsinB

Im menschlichen Gehirn kann die Expression von TorsinB ab einem Alter von vier Wochen detektiert werden (Bahn *et al.*, 2006), in Mäusen ab dem elften Tag der Embryonalentwicklung (Vasudevan *et al.*, 2006). So steigt der mRNA-Level von TorsinB im gesamten Gehirn ab dem elften Tag der Embryonalentwicklung bis zu Tag 30 nach der Geburt stetig an, während der Proteinlevel vor der Geburt stark zunimmt, aber ab der Geburt konstant bleibt.

Die Proteinlevel der einzelnen Gehirnregionen unterliegen starken Schwankungen. So steigt der TorsinB-Level in allen Regionen bis zu Geburt stark an, danach kommt es allerdings zu unterschiedlichen Entwicklungen. Der TorsinB-Level im Thalamus bleibt beispielsweise konstant, während im Kortex und Striatum der Level bis 14 Tage nach der Geburt ansteigt, um danach wieder abzufallen. Im Hippocampus beginnt die Steigerung des TorsinB-Levels erst zu diesem Zeitpunkt und steigt bis zu 30 Tage nach der Geburt weiter an. Auch im Cerebellum kommt es erst nach der Geburt zu einer Steigerung des TorsinB-Levels, allerdings nimmt es auch in dieser Region nicht mehr ab (Vasudevan *et al.*, 2006).

Diese Beobachtung unterscheidet sich von der zeitlichen Expression von TorsinA, dessen Proteinlevels 14 Tage nach der Geburt stark abfallen. Dies könnte ein weiterer Hinweis auf eine komplementierende Funktion von TorsinB sein.

1.4.3 Zelluläre Lokalisation und Funktion von TorsinB

TorsinB besitzt, ähnlich wie TorsinA, ein abspaltbares N-terminales Signalpeptid, was ein Hinweis für eine Lokalisation im ER sein kann. Dies konnte durch Überexpression von TorsinB in HEK293-Zellen experimentell bestätigt werden. Immunfluoreszenzfärbungen zeigten eine Kollokalisierung von TorsinB mit dem Protein PDI, einem Marker für das ER (O'Farrell *et al.*, 2004). Auch in SH-SY5Y-Zellen wurde durch Überexprimieren von TorsinB eine Kollokalisierung mit PDI gezeigt. In auffallender Weise zeigte sich auch eine starke Kollokalisierung mit der Zellkernmembran, welche jedoch nahtlos in das ER übergeht (Hewett *et al.*, 2004). Diese Beobachtung wurde auch *in vivo* gemacht, in menschlichen Neuronen konnte eine erhöhte Kollokalisierung von TorsinB mit der Zellkernmembran beobachtet, während weniger TorsinB im Zytoplasma und axonalen Auswüchsen nachweisbar war (Bahn *et al.*, 2006).

Auch wurde eine starke Tendenz von TorsinB zur Bildung von membranösen Einschlusskörperchen durch Überexpression von TorsinB festgestellt. Wird TorsinB zusammen mit TorsinA ΔE exprimiert, finden sich beide Proteine in diesen Einschlusskörperchen wieder (Hewett *et al.*, 2004; O'Farrell *et al.*, 2004).

In Zellkultur mit embryonalen Mausfibroblasten konnte durch Knockdown von TorsinB die Bildung von perinukleären membranösen Körperchen beobachtet werden, ähnlich denen in TorsinA Knockout Mäusen (Kim *et al.*, 2010). Dies ist, zusammen mit der Tatsache das TorsinB in nicht neuronalen Zellen ein viel höheres Expressionslevel besitzt, ein weiterer Hinweis dafür, dass TorsinA und TorsinB zwar ähnliche Funktionen besitzen dürften, diese aber in unterschiedlichen Gewebetypen ausüben.

1.4.4 Interaktionen von TorsinB

Über die Interaktionen von TorsinB mit weiteren Proteinen ist sehr wenig bekannt. So interagiert es mit TorsinA, sowohl in seiner normalen wie auch in seiner mutanten ΔE Form. Dies konnte durch Koimmunopräzipitation in Zellkultur und in menschlichem Gehirn nachgewiesen werden (Hewett *et al.*, 2004).

Ähnlich wie TorsinA interagiert auch TorsinB mit LAP1 und LULL1, wobei diese Interaktion zu einer erhöhten ATPase-Aktivität von TorsinB führt, ein weiterer Hinweis auf eine komplementäre Funktion (Zhao *et al.*, 2013).

1.5 Zielsetzung dieser Arbeit

Fasst man den aktuellen Forschungsstand zusammen, dann kommt man zu dem Ergebnis, dass mittlerweile viele Funktionen des TorsinA-Proteins beschrieben sind. Auch phänotypische Auswirkungen der bekannten Mutation (Ozelius *et al.*, 1997)z wie z.B. die Auffälligkeiten der Kernmembran (Goodchild *et al.*, 2005b) sind mittlerweile gut beforscht und wiederholt in verschiedenen Zellsystemen wie auch *in vivo* bestätigt. Welche der Funktionen des TorsinA-Proteins jedoch konkret zu einer Beeinträchtigung des Zentralnervensystems führen und damit pathophysiologisch in einem Zusammenhang mit der Erkrankung stehen, ist nicht geklärt. In dieser Arbeit soll es vor allem darum gehen, die Bedeutung des TorsinA-Proteins für das ZNS näher einzugrenzen. Vieles deutet also daraufhin, dass die Funktion des TorsinA-Proteins eng mit der Entwicklung des motorischen Zentralnervensystems assoziiert ist und dass die Mutation im *DYTI*-Gen eine Vulnerabilität spezifischer Neuronenpopulationen in verschiedenen Gehirnregionen hervorruft, die strukturell und funktionell miteinander in nicht bekannter Form zusammenhängen

So wissen wir, dass die Expression des TorsinA-Protein einem **spezifischen räumlichen und zeitlichen Expressionsmuster** folgt, insbesondere pränatal bzw. in den ersten Lebensjahren des Menschen wie auch im Ratten- bzw. Mausgehirn (Siegert *et al.*, 2005; Vasudevan *et al.*, 2006). Dies zu klären, wurden unter anderem *Tor1a*^(+/-)-Tiere mit *TORIA* überexprimierenden Tieren gekreuzt, um *Tor1a*^(+/-) / *TORIA*- und *Tor1a*^(-/-) / *TORIA*-zu generieren. Die transgene Tiere exprimieren humanes TorsinA unter Kontrolle des humanen mini-PrP-Promotors (mPrP) und ermöglichen uns damit eine genau definierte zeitliche und räumliche Expression des TorsinA-Proteins.

Ein weiterer wichtiger Aspekt bei diesem Experiment ist die für viele bereits existierende Modellsysteme, inwieweit das humane TorsinA-Protein tatsächlich die Funktion des murinen Proteins kompensiert. Bisher beruhte die Annahme ausschließlich auf einer weitgehend identischen Funktion beider Proteine auf der weitgehenden Homologie beider Proteine. Letztlich ging es auch darum zu untersuchen, inwieweit die Expression ausschließlich des humanen Proteins die bekannten phänotypischen Auffälligkeiten reproduziert, wie z.B. die Kernmembranauffälligkeiten.

Um zu untersuchen ob die Expression des menschlichen Homologs zu *Tor1a* unter Kontrolle des mPrP-Promotors diesen Phänotypen retten kann sollten anhand dieser Tiere sollten vier distinkte Fragestellungen beantwortet werden:

1. Kann die Expression von *TORIA* die *Tor1a*^(-/-)-Mäuse vor einem frühen Versterben retten?
2. Reicht diese Expression aus um phänotypisch gesunde Tiere zu generieren?
3. Können durch die Benutzung des mPrP-Promotors spezifische Gehirnregionen identifiziert werden, in denen die Expression von TorsinA besonders wichtig ist?
4. Können durch die Expression von *TORIA* die in *Tor1a*^(-/-)-Tieren beobachteten Kernmembran-auffälligkeiten verhindert werden?

Neben *TORIA* besitzt der Mensch noch drei weitere homologe Gene, *TOR1B*, *TOR2A* und *TOR3A*. Besonders *TOR1B*, welche für das Protein TorsinB codiert besitzt eine 84 %ige Ähnlichkeit auf Proteinebene zu TorsinA. Durch diese strukturelle Ähnlichkeit wird auch eine funktionelle Ähnlichkeit der beiden Proteine vermutet, da beide Proteine in unterschiedlichen Geweben verschieden starke Expressionslevel aufweisen. So zeigte sich in nicht neuronalem Gewebe eine deutlich stärkere Expression von TorsinB. Durch die Generierung von TorsinB Knockout Mäusen sollte diese mögliche Ähnlichkeit in der Funktion beider Proteine untersucht werden. Zuerst sollte die allgemeine Lebensfähigkeit der *Tor1b*^(-/-)-Tiere untersucht werden, da *Tor1a*^(-/-)-Tiere kurz nach ihrer Geburt versterben. Ist dies gegeben, können weitere Untersuchungen zur Proteinexpression und Histologie folgen. Ein Ziel sollte sein mögliche Schwankungen des TorsinA Proteinlevels in *Tor1b*^(-/-)-Tieren zu untersuchen, um eine mögliche Komplementierung der beiden Proteine zu identifizieren. Zusätzlich sollten die Tiere nach histologischen Auffälligkeiten, ähnlich wie in *Tor1a*^(-/-)-Tieren, untersucht werden um mögliche Rückschlüsse auf die auf TorsinB angewiesenen Gewebe ziehen zu können.

Da es konkrete Hinweise darauf gibt, dass TorsinA eine Rolle beim Wachstum von Neuriten spielt sollen durch verschiedene Zellkulturversuche die bereits publizierten widersprüchlichen Ergebnisse erneut verifiziert werden und ein möglicher Mechanismus für die Funktion von TorsinA identifiziert werden. Hierzu sollen zwei Zellkultursysteme verwendet werden, in welchen das Wachstum der Neuriten unter verschiedenen Level von TorsinA untersucht wird. Zum einen sollen PC6-3-Zellen verwendet werden, welche durch stabile Transfizierung wildtypisches TorsinA sowie TorsinA ΔE zu exprimieren. Als zweites Modell sollen primäre Neuronenkulturen aus dem Hippocampus von *Tor1a*^(-/-)-Tieren angelegt werden. Aufgrund ihrer gegensätzlichen Eigenschaften zur TorsinA Expression sollten die Ergebnisse besser interpretierbar sein. Die Verwendung von primären Neuronenkulturen dient des Weiteren zur

besseren Vergleichbarkeit mit der *in vivo* Situation, welche durch eine immortalisierte und zusätzlich mit Wachstumsfaktoren differenzierte Zelllinie nicht ausreichend gegeben ist.

2 Material

2.1 Verbrauchsmaterial

Verbrauchsmaterial wie Pipettenspitzen, Petrischalen oder Reaktionsgefäße wurden von den Firmen Eppendorf AG (Hamburg, D), Sarstedt AG & Co (Nümbrecht, D) und Greiner Bio-One GmbH (Frickenhausen, D) bezogen.

2.2 Lösungen und Puffer

2.2.1 Lösungen für molekulargenetische Methoden

TBE-Puffer (10 x)	0,1 M	Tris-(hydroxymethyl)aminomethan (Tris)
	0,1 M	Borsäure
	2 mM	Ethylenediaminetetraacetic acid, pH 8 (EDTA)

2.2.2 Lösungen für Proteinbiochemie

APS	10% (w/v)	Ammoniumperoxodisulfat
Laemmli-Puffer (5X)	62,5 mM	Tris-HCl pH 6.8
	5%	β-Mercaptoethanol
	10%	Glycerin
	2%	Sodium Dodecyl Sulfat (SDS)
	0,05 %	Bromphenolblau
Lyse-Puffer	30 mM	Tris-HCL pH 7.4
	150 mM	NaCl
	1%	Nonidet-P40
	10%	Glycerol
	1:100	Protease Inhibitor cOmplete (Roche)
	1:100	Phosphatase Inhibitor Cocktail 2 & 4 (Sigma)

PAGE-Puffer (10X)	1,92 M	Glycin
	250 mM	Tris
	1 %	SDS
RIPA-Puffer	50 mM	Tris
	150 mM	NaCl
	1%	NP 40
	0,5%	Natriumdesoxychelate
	0,1%	SDS

Anschließend mit HCL auf pH 7.5 einstellen und pro 25 ml angesetztem Puffer eine Tablette Proteinaseinhibitor cOmplete auflösen.

Sammelgelpuffer	0,5 M	Tris-HCL-pH 6.8
TBS-Puffer (10X)	100 mM	Tris-HCl pH 7.5
	1,5 M	NaCl
TBST-Puffer (10X)	100 mM	Tris-HCl pH 7.5
	1,5 M	NaCl
	1 %	Tween 20
Transferpuffer (10X)	250 mM	Tris
	1,92 M	Glycin
	20%	Methanol (MeOH)
Trenngelpuffer	1,5 M	Tris-HCL pH 8.8

2.2.3 Lösungen für Immunhistochemie und Immunfluoreszenz

Blockierungslösung in PBS	10 % (v/v)	Normalserum (Ziege oder Esel)
	0,3 % (v/v)	Triton X-100
Citrat-Puffer pH 6.0	10 mM Natriumcitrat	
	Einstellen auf pH 6.0 mit HCl	

PBS (10X) pH 7.4	1,37 M	NaCl
	27 mM	KCl
	100 mM	Na ₂ HPO ₄
	150 mM	KH ₂ PO ₄
	Einstellen auf pH 7.4 mit NaOH	
Permeabilisierungslösung	0,5 %	Triton X-100 (in PBS)
PFA 4 % (w/v) pH 7.4	4 %	Paraformaldehyd
	100 ml	10 x PBS (10X)
	Einstellen auf pH 7.4 mit HCl	
TE-Puffer pH 9.0	10 mM	Tris
	1 mM	EDTA
	Einstellen auf pH 9.0 mit HCl	

2.3 Zellkulturmedien

2.3.1 Medien für PC6-3 Zellen

Kollagen	100 µg / ml	Rat-Tail-Collagen
	(in Ultra Pure H ₂ O)	
PC6-3-Kulturmedium	10 %	Pferdeserum (HS)
	5 %	Fetal Bovine Serum (FBS)
	in RPMI 1640	
Einfriermedium	10 %	FBS
	10 %	DMSO
	in PC6-3-Kulturmedium	

2.3.2 Medien für primäre hippocampale Neuronen

Boratpuffer	0,15 M	Borsäure
	in ddH ₂ O, auf pH 8.35 einstellen	

PORN (Poly-DL-ornithine hydrobromide)	50 mg/ml in Boratpuffer	
PORN-Beschichtungslösung	10 µl/ml PORN in Boratpuffer	
Waschmedium	24,75 ml	Neurobasal
	250 µl	Glutamax-I
Kulturmedium	24,25 ml	Neurobasal
	500 µl	B27-Supplement
	250 µl	Glutamax-I
	5 ng/ml	basic Fibroblast Growth Factor (bFGF)

2.4 Verwendete Zelllinien

Die verwendeten PC6-3 Zellen wurden von Dr. Pedro Gonzalez-Alegre et al. hergestellt und freundlicherweise für experimentelle Zwecke zur Verfügung gestellt.

2.5 Oligonucleotidprimer

Tab. 2.5.1: Verwendete Oligonucleotidprimer
(for = forward, rev = reverse)

Verwendung	Sequenz 5' -> 3'	Schmelzpunkt
Genotypisierung KO Mäuse WT for	GCTGGCACGCCTTATTACTC	65°C
Genotypisierung KO Mäuse KO for	CGGTCGCTACCATTACCAGT	65°C
Genotypisierung KO Mäuse rev	TAGAGCTCTGGGCTTGAAA	65°C
Genotypisierung Transgen-Mäuse for	TTTGGAATATGTTTGCGCTG	65°C
Genotypisierung Transgen-Mäuse rev	TGTTTCAGACCACCCTCGTAA	65°C
Genotypisierung TorsinB KO for	TACCGGAAGTTCAGTCCCTG	58°C
Genotypisierung TorsinB KO rev	GAAGCGGCAGTAGAAATCGG	58°C

2.6 Antibiotika

Tab. 2.6.1: Verwendete Antibiotika

Antibiotikum	Konzentration	Hersteller
Blasticidin	2 mg / ml	Life Technologies, Darmstadt, D
Doxycyclin	1,5 mg / ml	Clontech Laboratories Inc., Saint-Germain-en-Laye, France
Hygromycin	50 mg / ml	Life Technologies, Darmstadt, D

2.7 Antikörper, Fluorophoren und Farbstoffe

Tab. 2.7.1: Verwendete primäre Antikörper

(F: Immunfluoreszenzfärbung, IHC: Immunhistochemiefärbung, WB: Western Blot)

Spezifität	Wirt	Artikelnummer	Verwendungszweck	Verdünnung
β -Actin	Maus	Cell Signaling 3700	WB	1:1000
Lamin A/C	Kaninchen	Cell Signaling 2032	IF	1:100
Lamin B1	Maus	Abcam ab8982	IF	1:300
Lamin B1	Kaninchen	Abcam ab16048	IF	1:300
MAP2	Maus	Sigma M1406	IF	1:500
MAP2	Kaninchen	Cell Signaling 4542	IF	1:500
TAU	Kaninchen	Sigma T6402	IF	1:500
TAU	Kaninchen	Abcam ab64193	IF	1:500
TorsinA	Kaninchen	Abcam ab ab34540	WB / IHC /IF	1: 300 / 1:100 / 1:300
TorsinA	Maus	Cell Signaling 2150	WB / IF	1:300 / 1:300
TorsinB	Kaninchen	Atlas HPA013403	WB	1:500
α/β -Tubulin	Kaninchen	Cell Signaling 2148	WB	1:1000

Tab. 2.7.2: Verwendete sekundäre Antikörper

(F: Immunfluoreszenzfärbung, IHC: Immunhistochemiefärbung, WB: Western Blot)

Spezifität	Wirt	Artikelnummer	Verwendungszweck	Verdünnung
Maus IgG Peroxidase	Ziege	Bio-Rad 172-1011	WB	1:10000
Kaninchen IgG Peroxidase	Ziege	Cell Signaling 7074	WB	1:10000
Maus IgG Peroxidase	Ziege	LICOR 926-68070	WB	1:10000
Kaninchen IgG Peroxidase	Ziege	LICOR 926-32211	WB	1:10000
Maus IgG biotinyliert	Ziege	Vector Labs BA 9200	IHC	1:200
Kaninchen IgG biotinyliert	Ziege	Vector Labs BA 1000	IHC	1:200
Maus IgG Alexa 488	Esel	Abcam ab150105	IF	1:1000
Kaninchen IgG Alexa 647	Esel	Abcam ab150075	IF	1:1000

2.8 Verwendete Größenstandards

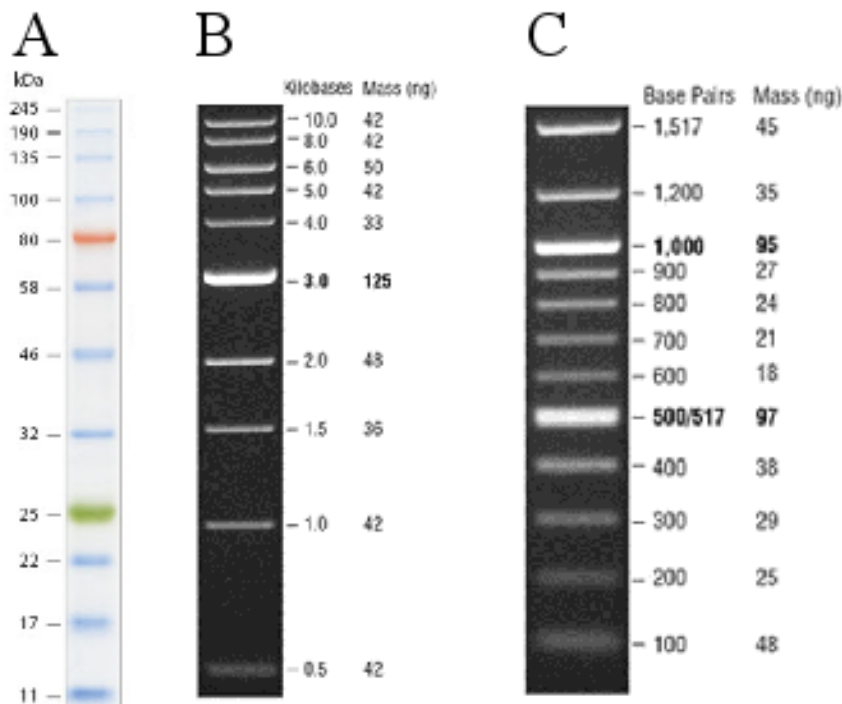


Abb.: 2.8.1 Verwendete Größenstandards

A) Für SDS-PAGE verwendeter Größenstandard Color Protein Standard broad range (New England Biolabs GmbH Frankfurt, D)

B) Für Agarosegelelektrophorese verwendeter Größenstandard 1K DNA-Ladder (New England Biolabs GmbH Frankfurt, D)

C) Für Agarosegelelektrophorese verwendeter Größenstandard 100 bp DNA-Ladder (New England Biolabs GmbH Frankfurt, D)

2.9 Mäuse

TorsinA Knockout Mäuse (C57BL/6J:Tg mTorA-KO) wurden von Dr. Rose Goodchild in einem C57BL/6J Hintergrund erzeugt und freundlicherweise für experimentelle Zwecke zur Verfügung gestellt. Transgene Mäuse, welche humanes TorsinA unter der Kontrolle des mPrP-Promotors exprimieren (C57BL/6N:Tg hTorA24), wurden unter Verwendung von C57BL/6N Tieren erzeugt.

Für Erhaltungszuchten beider Linien wurden Tiere aus entsprechenden Inzuchtlinien von Charles River Laboratories (Sulzfeld, D) bezogen.

Die durch Kreuzung dieser beiden Linien erzeugten *mTor1a*^{-/-} / *TOR1A*-Tiere tragen die Bezeichnung BL/6:Tg hTorA24/mTorA-KO.

TorsinB Knockout Mäuse wurden freundlicherweise von PD Dr. Thomas Ott zur Verfügung gestellt.

2.10 Verwendete Kits

Avidin/Biotin Blocking Kit	Vector Laboratories Inc., Burlingame, USA
BCA™ Protein Assay Kit	Thermo Fisher Scientific Inc., Rockford, USA
ECL Prime Western Blotting Detection Reagent	GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg, D
QIAquick® PCR Purification Kit	QIAGEN GmbH, Hilden, D
VECTASTAIN Elite ABC Kit (Standard)	Vector Laboratories Inc., Burlingame, USA

2.11 Verwendete Tools

Clustal Omega Multiple Alignment Tool	http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/
CRISPR/Cas9 Design Tool	http://crispr.mit.edu/
Ensembl Genome Browser	http://www.ensembl.org/index.html

2.12 Verwendete Software

DigiCam 740	Phase GmbH, Lübeck, D
GraphPad Prism	GraphPad Software Inc., La Jolla, USA
ImageJ	www.imagej.nih.gov
Inkscape 0.91	www.inkscape.org
JMP 10	SAS Institute GmbH, Böblingen, D
LI-COR Image Studio	LI-COR Inc., Lincoln, USA
Paint.net	http://www.getpaint.net
Photoshop CS2	Adobe Systems GmbH, München, D
R!	www.r-project.org
Zeiss Axiovision LE	Carl Zeiss AG, Oberkochen, D

2.13 Verwendete Chemikalien

Amersham Protran Premium	GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg, D
Acrylamid-Lösung (30%)	AppliChem GmbH, Darmstadt, D
Agarose (peqGOLD Universal Agarose)	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen, D
Ammoniumpersulfat (APS)	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, D
β-Mercaptoethanol	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, D
B-27 Supplement	Life Technologies, Darmstadt, D
Borsäure	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, D
Bromphenolblau Na-Salz	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, D
cOmplete Proteinaseinhibitor Cocktail	Roche Applied Science GmbH, Hamburg, DE
4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI)	Roche Applied Science GmbH, Hamburg, DE

ddH ₂ O	Millipore, Schwalbach, D
Dikaliumhydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, D
Direct PCR Lysis Tail	Viagen, Los Angeles, USA
Dinatriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄)	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, D
DMSO	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, D
dNTPs	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, D
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline	Life Technologies, Darmstadt, D
Ethanol Analysis Grade	VWR International, Darmstadt, D
Ethanol	SAV-Liquid, Flintsbach, D
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, D
Fetales Kälberserum	Life Technologies, Darmstadt, D
Fibroblast Growth Factor-basic	Life Technologies, Darmstadt, D
Glycin	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, D
GlutaMAX	Life Technologies, Darmstadt, D
GoTaq Flexi 5 x PCR-Puffer	Promega GmbH, Mannheim, D
GoTaq Polymerase	Promega GmbH, Mannheim, D
Hank's Balanced Salt Solution (HBSS)	Life Technologies, Darmstadt, D
Immunoselect Antifading Mounting Medium	Dianova GmbH, Hamburg, D
IS Mounting Medium	Dianova GmbH, Hamburg, D
Isopropanol	VWR International, Darmstadt, D
Kaliumchlorid (KCl)	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, D
Leica CV Ultra	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, D
Methanol	VWR International, Darmstadt, D
Mager-Milchpulver	Sucofin, Zeven, D
Midori Green	Biozym GmbH, Hessisch Oldendorf, D
Natriumacetat	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, D
Natriumchlorid (NaCl)	VWR International, Darmstadt, D
Natriumcitrat	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, D
Natronlauge 30% (NaOH)	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, D
Neurobasal Medium	Life Technologies, Darmstadt, D
Nonidet NP-40	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, D
Normalserum Esel	Dianova GmbH, Hamburg, D
Normalserum Ziege	Dianova GmbH, Hamburg, D
Objektträger SuperFrostR Plus	Menzel, Braunschweig, D
Paraformaldehyd	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, D
Pferdeserum	Life Technologies, Darmstadt, D
Phosphatase Inhibitor Cocktail 2 & 4	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, D

Poly-DL-ornithine hydrobromide	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, D
ProteinaseK	Genaxxon, Ulm, D
Roti-Histol	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, D
RPMI 1640 Medium	Life Technologies, Darmstadt, D
Salzsäure 30% (HCl)	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, D
Sodium Dodecyl Sulfat (SDS)	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, D
TEMED	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, D
tri-Natriumcitrat-Dihydrat	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, D
Triton X-100	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, D
TrizmaR base	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, D
Tris Pufferan	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, D
Trypsin (0,05 % Trypsin EDTA Solution)	Life Technologies, Darmstadt, D
Trypsin (0,25 % Trypsin EDTA Solution)	Life Technologies, Darmstadt, D
Tween 20	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, D
Ultra Pure Water	Genaxxon, Ulm, D
Whatman 3MM Papier	Sartorius AG, Göttingen, D

2.14 Verwendete Geräte

Autoklav D-150	Systec GmbH, Wettenberg, D
Axioplan2 Mikroskop	Carl Zeiss AG, Oberkochen, D
Biofuge primo	Heraeus, Hanau, D
CatWalk	Noldus Information Technology, Washington, USA
Centrifuge 5145 D	Eppendorf AG, Hamburg, D
CO2-Inkubator MC18AIC	Sanyo, Gunma-Ken, Japan
Digitalkamera Olympus Camedia	Olympus, Hamburg, D
Einbettkarussell Leica TP1020	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, D
Elektrophoresekammer (Agarose)	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen, D
Eppendorf Minispin	Eppendorf AG, Hamburg, D
Feinwaage ALC-110.4	Acculab Satorius AG, Göttingen, D
Geldokumentationstisch Repro	Hama, Monheim, D
Gießstation EG1160	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, D
Heizblock Thermo Stat Plus	Eppendorf AG, Hamburg, D
HeraSafe Sterilbank	Heraeus, Hanau, D
Inkubator Function Line	Heraeus, Hanau, D
Kolbenhubpipette (2,5; 10; 100; 1000 µl)	Eppendorf AG, Hamburg, D
Labmaster	TSE Systems, Inc. (Chesterfield, USA)

Microplate Reader Model 680	Bio-Rad GmbH, München, D
Mikrowelle	Panasonic, Hamburg, D
Motorisierte Pipette Pipetus	Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co. KG, Eberstadt, D
Multifuge 1 l-R	Heraeus, Hanau, D
Nikon Eclipse TS100 Mikroskop	Nikon GmbH, Düsseldorf, D
Orbital Shaker-Incubator ES 20	Grant Instruments, Cambridge, UK
PCR-Maschine PEQSTAR	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen, D
PCR-Maschine Primus 96 AdvancedR	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen, D
PerfectBlue Semi-Dry Electro Blotter	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen, D
pH-Meter	Schott Instruments GmbH, Mainz, D
Power-Supply E831	Consort, Turnhout, Belgien
Power-Supply PEQPower	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen, D
Rotarod	Ugo Basile Sri, Varese, I
SDS-Elektrophoresekammer Model 45-1614i	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen, D
Spektralphotometer Nanodrop ND-1000	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen, D
Schüttler Polymax 1040	Heidolph Instruments GmbH & Co.KG, Schwalbach, D
UV-Tisch ETX-20M	Phase, Lübeck, D
Variomag Electronicrührer	H+P Labortechnik AG, Mannheim, D
Waage Kern EW820-2NM	Kern & Sohn GmbH, Balingen, D
Wasserbad EW840-2MM	Kern & Sohn GmbH, Balingen, D

3 Methoden

3.1 Molekulargenetische Methoden

3.1.1 DNA-Isolierung aus Gewebe

Gewebebiopsien der Mäuse, z.B. nach durchgeführter Ohrlochmarkierung, wurden in einem Mix aus 150 µl DirectPCR (Tail) und 1% ProteinaseK bei 55°C und gleichzeitigem Schütteln 3 h in einem Schüttler inkubiert. Anschließend wurde die ProteinaseK 15 min bei 85°C inaktiviert und die Gewebeprouben kurz abzentrifugiert (13200 Umdrehungen pro Minute (u/min), 10 sec). Nach erfolgter Extraktion konnte DNA kurzzeitig bei +4°C gelagert werden.

3.1.2 Polymerase-Kettenreaktion (PCR) zur Maus-Genotypisierung

Zur Vervielfältigung von Nukleinsäuren wurde Polymerase-Kettenreaktion, welche eine exponentielle Vervielfältigung von Nukleinsäuren erlaubt, verwendet. Die hierbei verwendete DNA-Polymerase benötigt zum Starten der Polymerisation Oligonukleotide, sogenannte Primer, welche vom Experimentator gewählt wurden und somit eine spezifische Amplifikation gewünschter Bereiche ermöglichte.

Bedingt durch die heterogenen Schmelztemperaturen der verschiedenen verwendeten Primer, wurde die Annealingtemperatur des Standard PCR-Programmes entsprechend modifiziert. Ebenso wurde anhand der Herstellerangaben zur Reaktionsgeschwindigkeit der Polymerase die Dauer der Polymerisationsreaktion modifiziert.

Standard PCR-Reaktionsansatz für Genotypisierung (25 µl)

GoTAQ Flexi Puffer	1X
Primer forward	10 pM
Primer reverse	10 pM
dNTP-Mix	0,25 mM
MgCl ₂	2 mM
Template	2 µl isolierter DNA
ddH ₂ O	auf 25 µl auffüllen

Tab. 3.1.1: Standard PCR-Programm

PCR Schritt	Temperatur	Zeit	Zyklenzahl
Denaturierung	94°C	5 min	1
Denaturierung	94°C	30 s	
Annealing	variabel	30 s	35
Polymerisation	72°C	Variabel	
Polymerisation	72°C	10 min	1
Lagerung	4°C	∞	

3.1.3 Agarosegelelektrophorese

Zur Auftrennung von Nucleinsäuren nach ihrer Länge wurde eine Elektrophorese in Agarosegelen durchgeführt. Diese Methode nutzt die Gegebenheit, dass das Phosphatrückgrat der Nucleinsäuren negativ geladen ist und so in einem elektrischen Feld zur Anode wandert.

Je nach Anzahl der aufzutrennenden Proben wurden unterschiedlich dimensionierte Gelträger verwendet (9 x 11 cm, beziehungsweise 12 x 14 cm), welche jeweils mit einem 1,2%igem Agarosegel gefüllt wurden. Die Agarose wurde vor dem Gießen in 1X TBE-Puffer in einer Mikrowelle aufgekocht und nach dem Abkühlen auf ca. +40-50°C mit 0,025 µl Midori Green DNA-Stain pro ml Agarose versetzt.

Nach Erkalten der Agarose wurde der Gelträger in einer mit 1X TBE-Puffer gefüllten Laufkammer platziert. Nach dem Auftragen des Größenstandards und der Proben wurde die Auftrennung bei 100-130 V durchgeführt.

Zur Dokumentation wurden die Gele auf einem UV-Tisch mit einer durch die Software DigiCam gesteuerten Digitalkamera aufgenommen.

3.1.4 Sequenzierung

Sequenzierreaktionen wurden durch die Firma GATC Biotech AG (Konstanz, D) durchgeführt. Die DNA-Proben wurden durch das QIAquick® PCR Purification Kit aufgereinigt und die Konzentration gemessen. Anschließend wurden 5 µl DNA (Konzentration von 100 ng / µl) zusammen mit 5 µl des gewünschten Primers (Konzentration 5 pg / µl) in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß gegeben, mit einem fortlaufenden Barcode versehen und zur Durchführung der Reaktion an die Firma GATC Biotech versandt. Nach 48h konnten die Ergebnisse der Reaktion auf der Website der Firma heruntergeladen und kontrolliert werden.

3.2 Proteinbiochemische Methoden

3.2.1 Bestimmung der Proteinkonzentration

Zur Bestimmung der Konzentration von Proteinen in Lösungen wurde ein sogenannter BCA-Assay (BCA, bicinchoninic acid) durchgeführt. Die Reduktion von Cu^{+2} -Ionen durch Proteine in alkalischer Lösung zu Cu^{+1} -Ionen, welche mit Bicichonsäure nachweisbare Komplexe bilden, ist die Basis dieses Assays (Smith *et al.*, 1985). Die Anzahl der entstandenen Komplexe konnte bei einer Wellenlänge von 562 nm in einem Microplate Reader gemessen werden und dienen als Indikator für die Proteinkonzentration in der Probe. Dies wurde mittels eines Kits, dem BCA™ Protein Assay Kit, nach Herstellerangaben durchgeführt.

3.2.2 SDS-PAGE (SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese)

Zur besseren Analyse von Proteinen in verschiedenen Geweben werden die Proteine nach ihrem Molekulargewicht unter denaturierenden Bedingungen diskontinuierlich mittels SDS-PAGE aufgetrennt (Laemmli, 1970).

Die Auftrennung erfolgte in einer vertikalen Elektrophoresekammer, in welcher die Gele (Sammelgel 4%ig und Trenngel 12%ig) nach Herstellerangaben eingespannt wurden.

Zur Vorbereitung der aufzutrennenden Proben wurden 30 µg Proteinextrakt mit 1X PAGE-Puffer und 5X Laemmli-Puffer versetzt, bei +95°C für 5 min denaturiert und anschließend auf Eis gestellt. Nicht benötigte Taschen im SDS-Gel wurden mit 1X PAGE-Puffer zusammen mit 5X Laemmli-Puffer beladen. Die Auftrennung erfolgte in 1X PAGE-Puffer bei 100 V, bis die Proben vollständig in das Trenngel eingelaufen waren, nachfolgend wurde die Spannung auf 130 V erhöht. Als Größenstandard wurde der Proteinmarker „Color Protein Standard broad range“ verwendet.

Tab. 3.2.1: Verwendete SDS-Gele

	4% Sammelgel	12% Trenngel
30% AA & BisAA (29:1)	1,332 ml	9,7 ml
ddH ₂ O	4,6 ml	8,1 ml
1,5 M Tris-HCL, pH 8.8		6,24 ml
0,5 M Tris-HCL, pH 6.8	2 ml	
10% SDS	80 µl	240 µl
10% APS	80 µl	360 µl
TEMED	8 µl	9,6 µl

3.2.3 Western Blot

Zur Analyse der durch SDS-PAGE aufgetrennten Proteine mit Hilfe spezifischer Antikörper, wurden die Proteine vom SDS-Gel auf Nitrozellulosemembran transferiert und immobilisiert.

Dies geschah unter Zuhilfenahme des „semi-dry Elektroblothing“ Verfahrens. Hierbei wurden die Proteine mittels eines elektrischen Feldes vom SDS-Gel auf eine Nitrozellulosemembran, welche zwischen jeweils drei mit Transferpuffer getränkten Whatman-Filterpapieren lagen, übertragen. Ein luftblasenfreier Aufbau garantiert hierbei einen gleichmäßigen Fluss des Stromes und damit eine vollständige Übertragung der Proteine. Dies wurde bei einer Stromstärke von 210 mA über 1,5 h durchgeführt.

Anschließend wurde die Nitrozellulosemembran in 5%igem Magermilchpulver, gelöst in 1X TBST, für mindestens 1h blockiert, um unspezifische Bindungen der verwendeten Antikörper zu verhindern.

Die Membranen wurden über Nacht (üN) mit Antikörpern gegen das gewünschte Protein in 5%igem Magermilchpulver inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Membranen für 3x 10 min mit 1X TBST gewaschen und anschließend für 1h bei RT mit Fluorophoren-konjugierten Antikörpern (in 1X TBST) inkubiert. Vor der anschließenden Detektion mit einem UV-Kamerasystem wurden die Membranen erneut 3x 10 min mit TBST gewaschen.

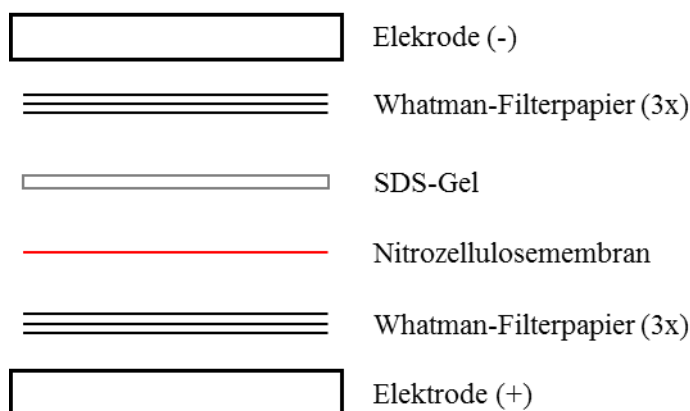


Abb. 3.2.1: Exemplarischer Western Blot Aufbau

3.3 Tiere

3.3.1 Haltung und Zucht der Mäuse

Die für die beschriebenen Versuche verwendeten Mausstämme wurden mit einheitlichen Haltungsbedingungen in sogenannten „Typ 2 long“ Käfigen gehalten. Die Gruppengröße entsprach je nach Gewicht der einzelnen Tiere aus zwei bis fünf Tieren, gemäß den Vorgaben der Europäischen Kommission. Die Haltung einzelner Tiere wurde nur durchgeführt, wenn Probleme in der

Gruppenhaltung auftraten (z.B. Verletzungen durch Rangordnungskämpfe). Die Tiere erhielten einheitliches Futter (sniff-Spezialitäten GmbH, Soest, D) und Wasser *ad libitum* sowie Spielzeug (mit Ausnahme von Käfigen mit mehreren Böcken, um keine Revierkämpfe zu provozieren). Die Standardbedingungen der Gesellschaft für Versuchstierkunde hinsichtlich der Umweltparameter (Umgebungstemperatur $22 \pm 2^\circ\text{C}$, Luftfeuchte $55 \pm 10\%$ sowie ein 12h Hell/Dunkel Rhythmus) wurden eingehalten.

Für Erhaltungszuchten wurden je ein Männchen und ein Weibchen nach Erreichen der Geschlechtsreife (nach 8-10 Wochen) zusammengesetzt. Die Jungtiere wurden nach 3-4 Wochen abgesetzt.

Für Zuchten zur Generierung von primären Neuronen wurden ebenfalls je ein Männchen und ein Weibchen nach Erreichen der Geschlechtsreife zusammengesetzt, allerdings wurden die Tiere nach 24h wieder getrennt, um eine exakte Tragezeit der Weibchen zu gewährleisten.

3.3.2 Biopsienahme und Markierung der Tiere

Um eine präzise Unterscheidung der Tiere eines Wurfes zu ermöglichen, wurden die Tiere durch Ohrlochbiopsien markiert. Hierbei wurden den Tieren im Alter von 3-4 Wochen nach einem festgelegten Schema (siehe Abb. 3.3.1) Ohrlochbiopsien entnommen. Die so erhaltenen Biopsien wurden zur Genotypisierung der Tiere verwendet.

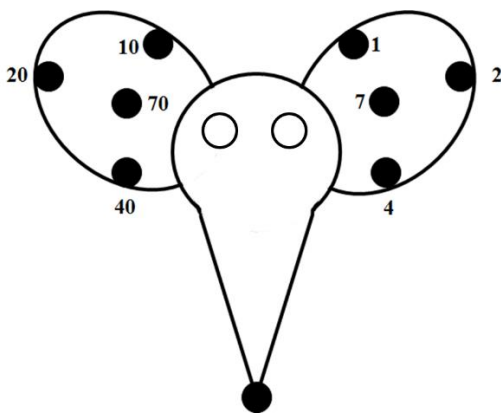


Abb. 3.3.1: Ohrlochschemata zur Markierung der Tiere

3.3.3 Präparation von Organen

Nach der Tötung der Mäuse durch CO_2 wurden die benötigten Organe herauspräpariert und sofort in Trockeneis schockgefroren. Die Lagerung bis zur weiteren Verarbeitung erfolgte bei -80°C .

3.3.4 Transkardiale Perfusion

Nach dem Töten der Tiere durch CO_2 wurde die Bauchdecke unterhalb des Sternums geöffnet und das Herz des Tieres freipräpariert. Danach wurde eine Kanüle in die linke Herzkammer eingeführt und anschließend 50 ml PBS durch Ausnutzen der Gravitation durch das Kreislaufsystem gepumpt. Um das

Blut abfließen zu lassen, wurde gleichzeitig der rechte Vorhof geöffnet. Nach der beschriebenen Spülung mit PBS, um das Blut aus dem Kreislaufsystem zu entfernen, wurde das Gewebe mit 50 ml 4% PFA fixiert. Nach diesem Schritt wurde das Tier dekapitiert, um das Gehirn zu entnehmen. Das Gehirn wurde dann üN bei 4°C in 4% PFA nachfixiert. Konnten die Gehirne anschließend nicht direkt dehydriert und eingebettet werden, wurde das 4% PFA durch 0,1% PFA ausgetauscht um längere Lagerzeit ohne Überfixierung zu ermöglichen.

3.3.5 Verhaltenstests

Alle Verhaltenstests (mit Ausnahme des SHIRPA-Tests) wurden in der Dunkelphase durchgeführt. Dies war notwendig, da die Mäuse nachtaktive Tiere sind. Als Beleuchtung für die Experimentatoren fungierte eine Rotlichtlampe, da die Tiere langwelliges Rotlicht (> 580 nm) nicht wahrnehmen können. Die statistische Auswertung der erzeugten Daten erfolgte mit Hilfe der Programme Excel 2010, GraphPad Prism, JMP und R!

Es wurden folgende Tests angewandt:

- 1-way ANOVA
- Tukey's *honest significant difference*
- Student's *t-test*

3.3.6 SHIRPA-Test

Zur Bewertung eines neu generierten Tiermodells wird häufig eine Klassifizierung durch den sogenannten SHIRPA-Test durchgeführt (Masuya *et al.*, 2005). Hierbei werden Veränderungen der Tiere hinsichtlich ihrer Aktivität, motorischer Koordination, Aggression, Reflexe und Aussehen untersucht und dokumentiert.

Die zu untersuchenden Tiere wurden hierfür 2min einzeln in einem sogenannten „viewing jar“, einem transparenten Kunststoffzylinder, welcher auf einer ebenfalls transparenten Kunststoffplatte steht, nach folgenden Kriterien beurteilt:

- Körperposition (aktiv/inaktiv)
- Tremor (ja/nein)
- Erscheinungsbild des Fells (gepflegt und sauber/Unregelmäßigkeiten)
- Hautfarbe der Fußsohlen (bleich/pink/rot)
- Vorhandensein von Schnurhaaren (ja/nein)
- Tränensekretion (ja/nein)
- Darmentleerung (ja/nein)

Nach erfolgter Überprüfung wurde das „viewing jar“ ca. 30 cm über eine Arena (Maße: 1 x 1 m), einer Box mit eingezeichnetem Gitternetz, gehalten und die Kunststoffplatte, die als Boden fungiert, entfernt. Nach erfolgtem Transfer des Tieres in die Arena wurden weitere Kriterien überprüft:

- Reaktion auf den Transfer (sofortiges Loslaufen / kurzes Verharren / verlängerte Starre von mind. 5 sec)
- Bewegungsaktivität (Wie viele Felder durchschreitet die Maus in 30 sec),
- Gang (flüssig/nicht flüssig)
- Anhebung des Schwanzes (schleifend am Boden/horizontal/vertikal)
- Schreckreaktion (ja/nein)
- Reaktion auf Berührung (ja/nein)

Anschließend wurden die Tiere am Schwanz aus der Arena gehoben und weitere Kriterien überprüft:

- Passivität (zappelt/zappelt nicht)
- Windung des Rumpfes (ja/nein)
- Ergreifen der Extremitäten (ja/nein)
- Zusammenziehen (self-clasping) der Hinterbeine (ja/nein)

Des Weiteren wurden folgende Reflexe und das Aggressionsverhalten der Tiere beurteilt:

- Ohrmuschelreflex (ja/nein)
- Stellreflex (ja/nein) (Rohre Ø 12 cm; Höhe 40 cm)
- Corneareflex (ja/nein)
- Lautäußerung während des Tests (ja/nein)
- Beißen während des Tests (ja/nein)

Abschließend wurden die Tiere auf einen Gitterdeckel gesetzt und dieser um 180 Grad gedreht und 5 s in dieser Stellung belassen, um die Griffstärke der Tiere zu beurteilen.

3.3.7 RotaRod-Test

Der RotaRod-Test erlaubt es, sowohl die allgemeine motorische Leistung, als auch das motorische Lernvermögen der Tiere zu testen. Es wurde ein speziell auf Mäuse zugeschnittenes System der Firma Ugo Basile, Sri (Varese, I) verwendet, welches eine Einstellung der Rotationsgeschwindigkeit pro Minute erlaubt.

Der RotaRod-Test wurde an fünf aufeinanderfolgenden Tagen durchgeführt, wobei der Versuchszeitraum in drei „Übungstage“ und zwei Teststage aufgeteilt wurde. An jedem Versuchstag wurden pro Tier zwei Läufe durchgeführt und die Zeit der Tiere auf der rotierenden Rolle gemessen (bis zu einem Maximum von 300 s). Die Startgeschwindigkeit des RotaRods betrug 4 U/min und steigerte sich alle 30 s um weitere 4 U/min bis zu einem Maximum von 40 U/min.

3.3.8 CatWalk

Zur Analyse des Gangbildes und weiterer Parameter des sich bewegenden Tieres, wurden die Tiere auf einem CatWalk-System (Noldus) gefilmt.

Hierbei wird grünes Licht waagrecht in eine Glasplatte eingestrahlt, welche durch eine Kamera gefilmt wird. Sobald das Tier die Glasplatte beritt wird das Licht gebrochen und die Fußabdrücke erscheinen deutlich sichtbar auf der Glasplatte und können abgefilmt werden. Durch eine anschließende Auswertung der Filme, sogenannte „runs“ können den Fußabdrücken die entsprechenden Gliedmaßen zugewiesen werden.

Die zu testenden Tiere wurden an drei aufeinanderfolgenden Tagen jeweils für 10 min im CatWalk-System gefilmt, wie sie den abgegrenzten Bereich auf der Glasplatte erkunden. Die geschah ohne vorheriges Training, um einen natürlichen Bewegungsablauf zu garantieren.

Die gefilmten „runs“ wurden vom System nach folgenden Parametern für relevante „runs“ vorsortiert:

- Laufdauer 0,5 bis 7 s
- Maximale Geschwindigkeitsabweichung von 60%

Nicht relevante „runs“ wurden direkt verworfen. Zur optimalen statistischen Auswertung wurden pro Tier zehn „runs“ aufgezeichnet.

3.3.9 Automatische Verhaltenskäfige (Labmaster)

Zusätzlich zur Charakterisierung einer neuen Tierlinie durch Verhaltensstudien zu bestimmten Bewegungsabläufen oder allgemeinem Gesundheitszustand, wurde eine vollautomatische Überwachung des Verhaltens der Tiere in einem Heimkäfig durchgeführt. Dafür wurden die Einzeltiere 70 Stunden in einem LabMaster-Käfig gehalten, welcher durch Lichtschranken und Gewichtssensoren folgende Parameter aufzeichnete:

- Bewegung in X-, Y- und Z-Achse
- Zurückgelegte Wegstrecke
- Futter- und Wasserverbrauch

Die Auswertung der Rohdaten erfolgte mit Hilfe eines Skriptes in R!, welches freundlicherweise von Herrn Dr. Nicolas Casadei (Universitätsklinik Tübingen) zur Verfügung gestellt wurde.

3.4 Immunhistochemische Methoden

3.4.1 Herstellung von Paraffinschnitten

Nach erfolgter Fixierung der Gehirne in PFA, wurden die Gehirne in einer aufsteigenden Alkohol/Xylol-Reihe dehydriert und im letzten Schritt in flüssigem Paraffin inkubiert. Zur Lagerung wurden die Gehirne ausgeblockt und das Paraffin ausgehärtet.

Zur weiteren Analyse wurden 7 µm dicke Schnitte am Mikrotom angefertigt und auf speziell beschichtete Objektträger, Superfrost Plus, aufgezogen. Die Schnitte wurden bei RT getrocknet und zur anschließenden Fixierung üN bei +55°C im Wärmeschrank inkubiert.

3.4.2 Immunhistochemische Färbungen für Hellfeldmikroskopie

Zur Vorbereitung der Färbung wurden die Schnitte auf den Objektträgern deparaffiniert und rehydriert. Nach Waschen mit 1X PBS (3x 5 min bei RT), konnten die Gewebeschnitte demaskiert werden. Hierbei wurde ein, dem Antikörper angepassten Puffer, in der Mikrowelle zum Kochen gebracht und die Schnitte 10 min in kochendem Puffer inkubiert. Um abzukühlen wurden sie anschließend für 30 min bei RT ruhen gelassen. Nach erneutem Waschen mit 1X PBS (3x 5 min bei RT), wurden die Schnitte in Blockierlösung mit Ziegenerum inkubiert (1h bei RT) und anschließend mit Primärantikörper inkubiert (üN bei 4°C).

Am darauffolgenden Tag wurden die Schnitte mit 1X PBS versetzt mit Polyalkylenglycolether (BRIJ) gewaschen (3x 5min bei RT) und anschließend mit biotinyliertem Sekundärantikörper inkubiert (1h bei RT). Gleichzeitig wurde der AB-Komplex, bestehend aus Avidin und Biotin, angesetzt und während der Inkubationszeit des Antikörpers ruhen gelassen.

Anschließend wurden die Schnitte mit 1X PBS_{BRIJ} gewaschen (3x 5 min bei RT) und mit dem AB-Komplex inkubiert (1,5 h bei RT).

Nach erneutem Waschen mit 1X PBS_{BRIJ} (3x 5 min bei RT) wurde die Farbreaktion durch Diaminobenzidin gestartet. Nach Erreichen der gewünschten Färbung, wurde die Reaktion mit ddH₂O abgestoppt und die Schnitte in einer aufsteigenden Alkohol/Xylol-Reihe dehydriert und reparaffiniert (Siehe Tab. 3.3, Reihenfolge umgekehrt). Danach wurden die Schnitte mit Leica CV Ultra eingedeckelt und üN unter einem Abzug durchgetrocknet.

Tab. 3.4.1: Deparaffinierungsschritte für Paraffin-fixiertes Gewebe

Xylol	8 min	3x
Ethanol 100 I-II:	5 min	2x
Ethanol 96%: I-II:	4 min	2x
Ethanol 70%:	3 min	1x
Ethanol 50%:	3 min	1x
1x PBS pH 7,4	dauerhaft	-

3.4.3 Immunfluoreszenzfärbungen

Zur Vorbereitung der Färbung wurden die Schnitte auf den Objektträgern deparaffiniert und rehydriert (siehe Tab. 3.3). Nach Waschen mit 1X TBS (3x 5 min bei RT), wurden die Schnitte zur Demaskierung des Gewebes in einem dem Antikörper angepassten Puffer 3x 5 min in einer Mikrowelle aufgeköcht und um abzukühlen anschließend für 30 min bei RT ruhen gelassen. Nach erneutem Waschen mit TBS (3x 5 min bei RT), wurden die Schnitte in IF-Blockierlösung inkubiert (1h bei RT) und anschließend mit Primärantikörper inkubiert (üN bei +4°C).

Am darauffolgenden Tag wurden die Schnitte mit 1X TBS gewaschen (3x 5min bei RT) und anschließend mit einem Fluorophoren-konjugierten Sekundärantikörper inkubiert (1h bei RT).

Anschließend wurden die Schnitte mit 1X TBS gewaschen (3x 5 min bei RT) und zur Färbung der DNA im Zellkern mit 0.5 µg/ml DAPI inkubiert (10 min bei RT).

Nach erneutem Waschen mit 1X TBS (3x 5 min bei RT), wurden die Schnitte mit IS Mounting Medium eingedeckelt und üN lichtgeschützt im Abzug durchgetrocknet.

3.4.4 Transmissionselektronenmikroskopie

Das gewünschte Gewebe wurde frisch präpariert und mit einer Rasierklinge in ca. 1mm große Stücke zerteilt. Anschließend wurde es in Karnovsky-Fixativ überführt und im Labor für Elektronenmikroskopie (Prof. Dr. med. M. Schaller, Hautklinik, Tübingen, D) weiter bearbeitet, um daraus Ultradünnschnitte (30 nm) herzustellen. Die Aufnahme und Analyse der Bilder wurde freundlicherweise von Frau Fehrenbacher durchgeführt.

3.5 Eukaryotische Zellkultur

3.5.1 Auftauen, Kultivierung und Passagieren von PC6-3 Zellen

PC6-3 Zellen sind ein Substamm von PC12-Zellen, welche aus einem Phäochromocytom einer Ratte abstammen. Die Zellen benötigten eine Beschichtung aller Oberflächen mit Kollagen, auf denen sie kultiviert werden.

Alle Arbeitsschritte zur Kultivierung und dem Passagieren von PC6-3 Zellen wurden unter sterilen Bedingungen in einer Sterilbank durchgeführt. Die Zellen wurden in einem Inkubator bei 37°C und 5% CO₂-Gehalt kultiviert. Es herrschte eine wassergesättigte Atmosphäre im Inkubator.

Zur Durchführung der Experimente wurden bei -80°C gelagerte Zellen in einem Wasserbad bei +37°C aufgetaut und in ein 15 ml Reaktionsgefäß mit 10 ml Nährmedium überführt. Die Zellen wurden nun in einer Zentrifuge präzipitiert (RT, 5 min bei 800 rpm), das Nährmedium abgenommen und die Zellen in 1 ml Nährmedium resuspendiert und ausplattiert. Das Nährmedium der Zellen wurde je nach Dichte der Zellen alle 3-4 Tage erneuert. Bei einer Konfluenz von ca. 90% wurden die Zellen jeweils passagiert, um ein übereinander Wachsen der Zellen zu verhindern. Hierzu wurden die Zellen zuerst mit 1X PBS gewaschen und anschließend mit einer 0,25%igen Trypsin-Lösung für 5 min inkubiert, um sie von der 6-Well-Platte abzulösen. Danach wurde die Wirkung der Trypsin-Lösung durch Zugabe von Medium abgestoppt und zentrifugiert (5 min bei 800 rpm). Anschließend wurde das Medium abgesaugt und die Zellen in 500 µl frischem Medium resuspendiert. Von der Versuchsplanung ausgehend wurden danach verschiedene Volumina Zellen neu ausplattiert.

3.5.2 Kryokonservierung

Zur Konservierung der Zellen zwischen den jeweiligen Experimenten wurden diese bei -80°C gelagert. Die Zellen wurden wie in Punkt 3.5.1 trypsiniert und abzentrifugiert. Danach erfolgte die Aufnahme der Zellen in einem speziellen Einfriermedium. Um ein langsames Durchfrieren zu gewährleisten, wurden die Zellen in einer Einfrierbox (zur Sicherstellung einer kontrollierten Herunterkühlung der Zellen um 1°C/sec) in den -80°C kalten Freezer überführt. Zur langfristigen Lagerung wurden die Zellen in flüssigen Stickstoff überführt.

Zur Durchführung weiterer Experimente wurden die Zellen im Wasserbad bei +37°C aufgetaut, in ebenfalls +37°C warmes Medium aufgenommen, zentrifugiert (5 min bei 800 rpm) und anschließend in Medium resuspendiert und ausplattiert.

3.5.3 Präparation und Kultivierung von primären hippocampalen Neuronen

Primäre Zellen wurden in dieser Arbeit verwendet um einen größtmögliche Nähe der verwendeten Zellen zu bestehenden Tiermodellen sicherzustellen und Ergebnisse zu erhalten, die der *in vivo* Situation entsprechen.

Um einen konstanten Entwicklungsstand der zu präparierenden Jungtiere zu garantieren, wurden alle verwendeten Muttertiere am 19ten Tag der Trächtigkeit getötet und die Jungtiere per Kaiserschnitt aus dem Mutterleib präpariert.

Da Immunfluoreszenzfärbungen der primären Neuronen angefertigt werden sollten, mussten die Zellen auf Glasdeckplättchen ausplattiert werden. Um ein Anwachsen der Zellen auf dem Glas zu ermöglichen, wurden diese mit PORN (Poly-DL-ornithine hydrobromide) beschichtet. Dafür wurden die Deckgläser mit 70%igem Alkohol gewaschen und anschließend drei Mal mit Ultra Pure H₂O gespült. Anschließend wurden sie mit PORN überschichtet und 1 h bei +37°C oder üN bei +4°C inkubiert.

Vor der Präparation der Jungtiere wurde pro Jungtier ein 1,5 ml Reaktionsgefäß mit 500 µl Hank's Balanced Salt Solution (HBSS) und eine 6 cm Zellkulturschale mit 2 ml HBSS vorbereitet.

Die Jungtiere wurden dekapitiert und die Gehirne in die Zellkulturschalen überführt. Dort wurde der Hippocampus aus beiden Hemisphären herauspräpariert und in die 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt, welche auf Eis gestellt wurden. Zur späteren Genotypisierung wurden Biopsien des Schwanzes genommen und bei -20°C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

Die Hippocampi wurden nun unter eine Sterilbank transferiert und das HBSS vorsichtig abgenommen. Danach wurde je 200 µl Trypsin auf die Hippocampi gegeben und 14 min bei +37°C inkubiert. In dieser Zeit wurde das PORN von den Deckgläschen abgesaugt und die Deckgläschen drei Mal mit HBSS gewaschen, bevor sie mit 500 µl Kultivierungsmedium überschichtet wurden. Die Deckgläschen wurden bis zum Ausplattieren bei 37°C gelagert.

Um die Reaktion des Trypsins abzustoppen, wurde 1 ml Waschmedium in das Reaktionsgefäß hinzugegeben und danach vorsichtig mit einer Pipette wieder abgesaugt. Dieser Schritt wurde noch drei Mal wiederholt, bevor 500 µl Waschmedium in die Reaktionsgefäße gegeben wurde, um anschließend das Gewebe durch achtmaliges auf- und abziehen mit einer 100 µl Pipette zu triturieren.

Beim Ausplattieren der Zellsuspension auf die vorbereiteten Deckgläschen wurde sichergestellt, dass keine Gewebestücke mit ausplattiert wurden.

Nach 24 h wurden 250 µl des Kulturmediums gewechselt, dies erfolgte weiter alle vier Tage. Die Zellen wurden fünf Tage kultiviert, bevor sie für Experimente verwendet wurden.

3.5.4 Immunfluoreszenzfärbung von eukaryotischen Zellen

Um die Lokalisation bestimmter Proteine in einer Zelle zu analysieren, wurden Immunfluoreszenzfärbungen durchgeführt. Hierbei wurden Antikörper, welche gegen die zu

analysierenden Proteine hergestellt wurden, benutzt. In dieser Arbeit wurden ausschließlich indirekte Färbungen vorgenommen, bei denen ein zweiter, sogenannter sekundärer Antikörper, der mit einem Fluorophor konjugiert war, den primären Antikörper sichtbar machte.

Je nach Zelltyp wurden unterschiedliche Methoden angewandt (Tab. 3.4). Bis zur Permeabilisierung der Zellen wurde jeder Schritt in einem 24er-Well durchgeführt, dabei wurde pro Well je 500 µl Flüssigkeit verwendet. Danach wurden die Zellen in eine Petrischale überführt und die Lösungen direkt auf das Deckglas gegeben (80 µl pro Deckglas). Ab der Inkubation mit dem sekundären Antikörper wurden alle Schritte im Dunkeln durchgeführt.

Nach dem letzten Waschschrift wurden die Deckgläser mit Immunoselect Antifading Mounting Medium auf einem Objektträger fixiert und üN im Dunkeln getrocknet.

Tab. 3.5.1: Färbemethoden für verschiedene Zelltypen

PC6-3 Zellen			Primäre Neuronen		
		Dauer			Dauer
Waschschrift	1X PBS	5 min	Vorfixierung	4% PFA	2 min
Fixierung	4% PFA	15 min	Fixierung	4% PFA	15 min
Waschschrift	1X PBS	3x 5 min	Waschschrift	1X PBS	3x 5 min
Permeabilisieren	0,5% Triton X-100 in PBS	2 min	Permeabilisieren	0,5% Triton X-100 in PBS	2 min
Blockieren	10% NDS in PBS	1 h	Blockieren	10% NDS in 0,1% Triton X-100/PBS	1 h
Primärer Antikörper	5% NDS in PBS	üN bei +4°C	Primärer Antikörper	5% NDS in PBS	üN bei +4°C
Waschschrift	1X PBS	3x 5 min	Waschschrift	1X PBS	3x 5 min
Sekundärer Antikörper	in 1X PBS	1 h	Sekundärer Antikörper	in 1X PBS	1 h
Waschschrift	1X PBS	3x 5 min	Waschschrift	1X PBS	3x 5 min
DAPI	1:2000 DAPI in PBS	30 s	DAPI	1:2000 DAPI in PBS	30 s
Waschschrift	1X PBS	2x 10 min	Waschschrift	1X PBS	2x 10 min
Waschschrift	ddH2O		Waschschrift	ddH2O	

3.5.5 Neurite Outgrowth Staining

Da PC6-3 aus dem Nebennierenmark isoliert wurden, welches sich aus dem Ektoderm des Embryos, entwickelte, ist es möglich die Zellen durch Zugabe von Nerve Growth Factor (NGF) zu Neuronen-ähnlichen Zellen zu differenzieren, die ähnlich der echten Neuronen auch Neuriten auswachsen. Um die Länge der Neuriten zu bestimmen, wurde das Neurite Outgrowth Staining Kit verwendet.

Um eine konstante Zelldichte auf den Deckgläschen zu erreichen, wurden die Zellen vor dem Ausplattieren mit einer Neubauer Zählkammer gezählt und anschließend in einer Dichte von 20000 Zellen ausplattiert. Hierbei wurde das Nährmedium 1:10 mit RPMI 1640 Medium verdünnt, um durch ein geringeres Nährstoffangebot die Zellteilung zu verhindern. Das Nährmedium enthielt zusätzlich 100 pg/ml NGF und 1,5 µg/ml Doxycyclin.

Das Nährmedium wurde nach zwei Tagen gewechselt und die Zellen nach 72 h gefärbt. Hierzu wurde das Nährmedium abgesaugt und die Zellen mit 500 µl des „Membrane Stain“ Farbstoffes (1:1000 in 4% PFA) für 15 min bei +37°C inkubiert.

Anschließend wurden die Zellen mit 1X PBS gewaschen, mit Immunoselect Antifading Mounting Medium auf einem Objektträger fixiert und üN im Dunkeln getrocknet.

4 Ergebnisse

4.1 Generierung und Phänotypisierung eines Mausmodells zur Rettung des TorsinA Knockout Phänotyps

4.1.1 Generierung des Modells

Zum Zwecke der Untersuchung der DYT1-Dystonie wurden bis dato verschiedene Tiermodelle generiert. Eines der am besten untersuchtesten ist die *Tor1a*-Knockout (KO) Maus, in welcher durch Gene-targeting die Sequenz von TorsinA unter Zuhilfenahme von Cre-Rekombinase gelöscht wurde. Homozygote *Tor1a*^(-/-) Mäuse verstarben kurz nach der Geburt aus unklaren Ursachen. Des Weiteren zeigten sie eine geweitete und ausgestülpte Kernmembran im Rückenmark (Goodchild *et al.*, 2005b). Um diesen Phänotyp zu retten, wurden *Tor1a*^(+/-)-Mäuse zunächst mit transgenen *TOR1A*-Tieren verpaart. Diese Tiere besaßen neben zwei Allelen endogenem TorsinA zusätzlich ein Konstrukt, welches humanes TorsinA unter der Kontrolle des mPrP-Promotors exprimiert (Grundmann *et al.*, 2007). Nach erfolgreicher Zucht wurden die *Tor1a*^(+/-)/*TOR1A*-Tiere erneut mit *Tor1a*^(+/-)-Tieren verpaart, um einen homozygoten KO des endogenen TorsinA zu erreichen (Abb. 4.1.1).

Im weiteren Verlauf dieser Arbeit werden die so generierten Tiere als „Rescue-Tiere“, oder „Rescue-Mäuse“ bezeichnet. Obwohl dieser Begriff eigentlich nur auf *Tor1a*^(-/-)/*TOR1A*-Tiere zutrifft, werden sowohl *Tor1a*^(-/-)/*TOR1A*-Tiere, als auch *Tor1a*^(+/-)/*TOR1A*-Tiere mit ihm bezeichnet, allerdings nur

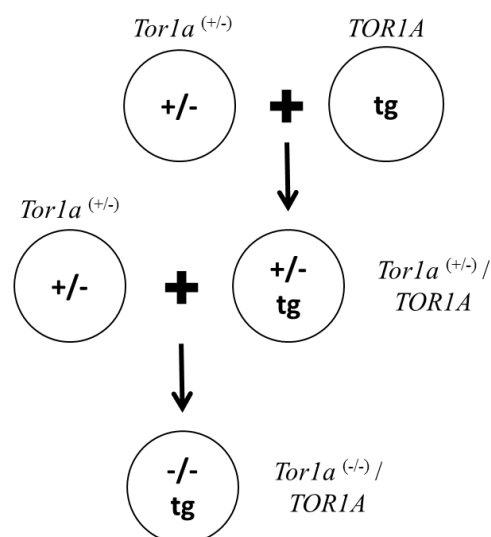


Abb. 4.1.1 Kreuzungsschema zur Generierung des neuen Mausmodells

Die in dieser Arbeit verwendeten Tiere wurden durch die wiederholte Kreuzung transgener *TOR1A*-Mäuse mit heterozygoten *Tor1a*^(+/-)-Mäusen generiert. Nach der erfolgreichen Zucht von *Tor1a*^(+/-)/*TOR1A*-Tieren wurden Männchen dieses Genotyps mit *Tor1a*^(+/-)-Weibchen verpaart, um die neue Linie zu expandieren und Tiere für weitere Experimente zu erhalten.

wenn auch tatsächlich beide Genotypen gleichzeitig genannt werden und keine Unterschiede zwischen ihnen auftreten.

Da die ursprünglichen Linien aus zwei unterschiedlichen Inzuchtlinien (siehe Kap. 2.8) generiert wurden, konnte keine entsprechende Wildtyp-Kontrolle gezüchtet werden. Stattdessen wurden wildtypische Tiere aus den Erhaltungszuchten der KO Mäuse als Wildtyp-Kontrolltiere für die folgenden Experimente benutzt.

Die Tiere wurden nach dem Absetzen durch Ohrlochbiopsien markiert und die so gewonnen Biopsien für eine Genotypen-Analyse durch PCR verwendet. Dadurch konnte die Verteilung der Genotypen mit den mendelschen Regeln abgeglichen werden. Diese trafen auch bei den „Rescue-Tieren“ zu. Allerdings eröffnet die Anzahl $n=136$ Raum für Abweichungen. Die hohe Anzahl an Totgeburten (Abb. 4.1.2 A) erklärt sich durch den Phänotyp der *Tor1a*^(-/-)-Tiere, wobei die Jungtiere zwar lebend geboren werden, aber kurze Zeit später sterben.

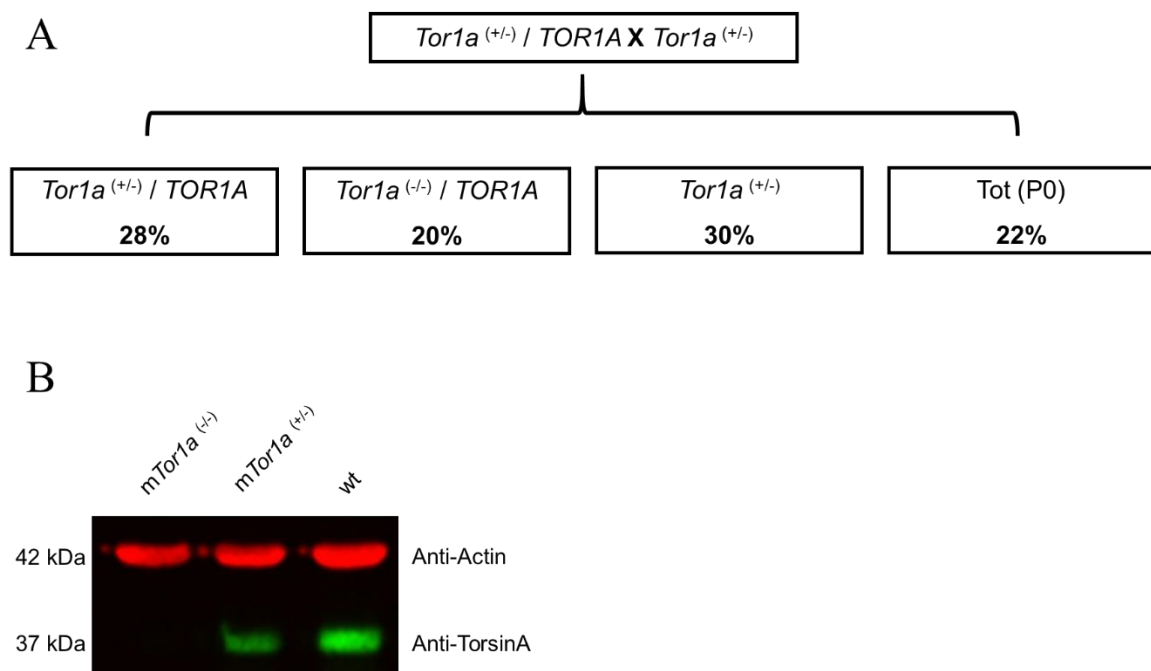


Abb. 4.1.2 Verteilung der Genotypen der "Rescue-Mäuse" und Kontrolle der KO Mäuse

A) Verteilung der Genotypen bei der Zucht durch *Tor1a*^(+/-) / *TOR1A*-Tieren mit *Tor1a*^(+/-)-Tieren, $n = 136$.

B) Repräsentativer Western Blot zum Test des Abcam Anti-TorsinA-Antikörpers. Proteinlysate wurden aus ganzen Gehirnen von Mäuse am Tag 18 der Embryonalentwicklung angefertigt, aufgetrennt und mit Anti-TorsinA-Antikörper detektiert. Hierbei konnte wie erwartet in Kontrolltieren das höchste TorsinA Proteinlevel nachgewiesen werden, während in *Tor1a*^(-/-) Mäusen kein TorsinA detektiert werden konnte. β -Actin diente als Ladekontrolle.

Nachdem die bei der Zucht erwarteten Genotypen (auf Grund der geringen Anzahl) den mendelschen Regeln annähernd entsprachen und die „Rescue-Tiere“ den Phänotyp des homozygoten *Tor1a* KO erfolgreich retten konnte, sodass die Tiere nicht auffällig oft verstarben, wurde als erster Schritt zur Charakterisierung des neuen Modells die Proteinexpression von TorsinA analysiert. Hierbei wurde die Tatsache ausgenutzt, dass das transgene *TORIA* mit einem V5-Tag markiert war und so eine größere Masse als das endogene TorsinA besitzt. Dies führt zu einem anderen Laufverhalten auf SDS-Gelen und ermöglicht die getrennte Detektion von endogenem und transgenem TorsinA. Da TorsinA drei eng verwandte Homologe besitzt, wurde zuerst die Spezifität des zur Verifizierung des KO's verwendeten Anti-TorsinA Antikörper von Abcam untersucht. Hierzu wurden *Tor1a* KO Jungtieren nach 19 Tagen Trächtigkeit getötet und die Gesamthirne präpariert. Hierbei konnte gezeigt werden, dass mit dem verwendeten Antikörper keinerlei unspezifische Banden detektiert werden. Ebenso konnte gezeigt werden, dass die Expressionsstärke des endogenen TorsinA Proteins mit der Anzahl der Allele korreliert, da das Expressionsniveau des TorsinA Proteins in wildtypischen Tieren beinahe doppelt so hoch wie in heterozygoten *Tor1a* KO Jungtiere war (Abb. 4.1.2 B). Nach erfolgter Verifizierung des Antikörpers konnte die Expression des endogenen TorsinAs in zwei Monate alten „Rescue-Tieren“ in verschiedenen Gehirnregionen nachgewiesen werden (Abb. 4.1.3 A). Wie zu erwarten zeigten auch hier wildtypische Tiere das höchsten Expressionsniveau, während in *Tor1a*^(-/-)/*TORIA* keine Expression von endogenem TorsinA nachgewiesen werden konnte. Die *Tor1a*^(+/-)/*TORIA*-Tiere zeigten wie auch schon in Abb. 4.1.2 B eine schwächere, jedoch deutlich sichtbare Expression.

Auch konnten in den einzelnen untersuchten Gehirnregionen Unterschiede im Expressionsniveau des TorsinA Proteins festgestellt werden. In wildtypischen Tieren deutete ein starkes Bandensignal von Hippocampus und Cerebellum auf erhöhte Mengen von TorsinA im Gegensatz zu Bulbus, Striatum oder Hirnstamm. Ein starkes Bandensignal konnte auch im Cortex detektiert werden, welcher auch in *Tor1a*^(+/-)/*TORIA*-Tieren eine erhöhte Expression zeigte. Der Promotor des **Prion Protein** cellular, ein

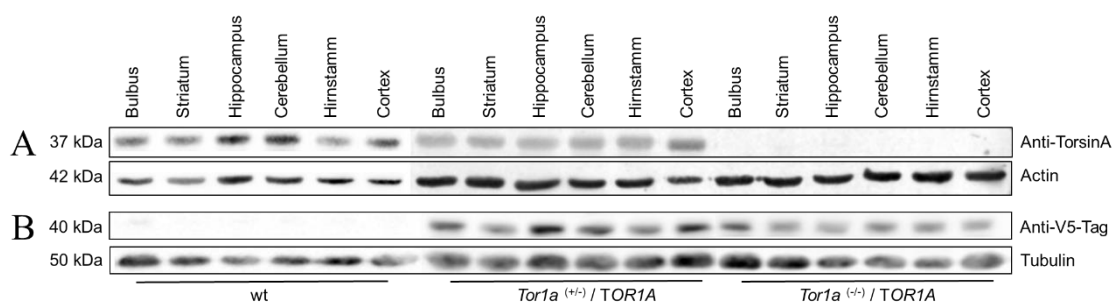


Abb. 4.1.3 Expressionslevel von endogenem und transgenem TorsinA in verschiedenen Gehirnregionen
A-B) Repräsentative Western Blot Analyse des TorsinA Proteinlevels in zwei Monate alten „Rescue-Mäusen“. Homogenate der verschiedenen Gehirnregionen wurden aufgetragen und mit verschiedenen Antikörpern detektiert.

A) Durch den Abcam Anti-TorsinA-Antikörper kann murines TorsinA in allen Tieren detektiert werden, mit Ausnahme der *Tor1a*^(-/-)/*TORIA* Mäuse, welche kein murines TorsinA exprimieren können. β -Actin diene als Ladekontrolle.

B) Detektion mit Anti-V5-Tag-Antikörper zeigt die Expression von humanem TorsinA in *Tor1a*^(+/-)/*TORIA* und *Tor1a*^(-/-)/*TORIA* Mäusen, während in Kontrolltieren kein humanes TorsinA nachgewiesen werden kann. α/β -Tubulin diene als Ladekontrolle.

Protein welches in seiner mutanten Form für die Entstehung von Prionenkrankheiten verantwortlich gemacht wird, wurde zur Expression von TOR1A in den transgenen Mäusen verwendet. Es handelte sich um eine 214 Basenpaar lange Version des Promotors, dem sogenannten mini-PrP-Promotors, welche speziell für die Expression in Purkinje-Zellen des Cerebellums entwickelt wurde (Asante *et al.*, 2002). Um die Expressionsniveaus des transgenen TorsinA in diesem Modell zu analysieren, wurde ein Anti-V5-TAG Antikörper verwendet, welcher ausschließlich das transgene TorsinA detektiert (Abb. 4.1.3 B). Wie erwartet konnte bei wildtypischen Tieren mit dem Anti-V5 Antikörper kein TorsinA detektiert werden, während bei den „Rescue-Tieren“ sich ein Signal bei ca. 40 kDa detektieren ließ, welches der molekularen Masse von TorsinA mit einem zusätzlichen V5-Tag entspricht. Obwohl die transgenen Tiere, mit denen die Rescue-Mäuse erzeugt wurden, aus einer Linie stammen und daher die gleiche Anzahl an transgenen *TOR1A*-Konstrukten tragen, konnte hier bei den Expressionsniveaus deutliche Unterschiede festgestellt werden. So zeigten *Tor1a*^(+/-) / *TOR1A*-Tiere ein deutlich höheres Expressionsniveau in allen untersuchten Gehirnregionen, als *Tor1a*^(-/-) / *TOR1A*-Tiere.

Um zu überprüfen ob die Unterschiede im Expressionsniveau mit der abnehmenden Anzahl an endogenen *Tor1a* Allelen in den „Rescue-Mäusen“ zusammenhängen, wurde zusätzlich das Expressionsniveau von TorsinA in transgenen Mäusen (*Tor1a*^(+/+) / *TOR1A*), welche weiterhin beide

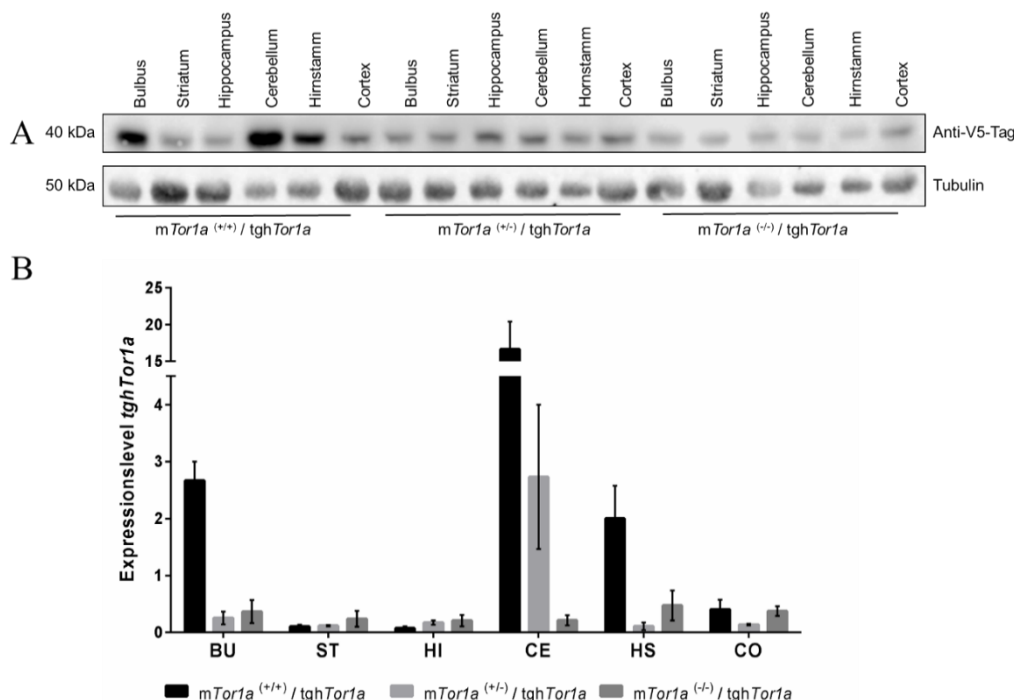


Abb. 4.1.4 Das Expressionslevel von TOR1A ist mit der Anzahl endogener *Tor1a*-Allele verknüpft

A) Repräsentative Western Blot Analyse von *Tor1a*^(+/+) / *TOR1A*-, *Tor1a*^(+/-) / *TOR1A*- und *Tor1a*^(-/-) / *TOR1A*-Tieren. Homogenate verschiedener Gehirnregionen wurden aufgetrennt und mit Anti-V5-Tag-Antikörper detektiert. α/β -Tubulin diente als Ladekontrolle.

B) Quantifizierung der Signalstärke des Anti-V5-Antikörpers in *Tor1a*^(+/+) / *TOR1A*-, *Tor1a*^(+/-) / *TOR1A*- und *Tor1a*^(-/-) / *TOR1A*-Tieren (n=3 pro Genotyp). Es konnte eine Abnahme der V5-Signalstärke bei transgenen Tieren mit einem hetero- bzw. homozygoten KO von murinem TorsinA im Vergleich mit transgenen Tiere ohne KO beobachtet werden.

BU = Bulbus olfactorius, ST = Striatum, HI = Hippocampus, CE = Cerebellum, HS = Hornstamm, CO = Cortex.

endogene *Tor1a* Allele tragen, untersucht (Abb. 4.1.4 A). Auch hier konnte gezeigt werden, dass das Expressionsniveau von TorsinA der *Tor1a*^(+/+) / *TOR1A*-Tiere in allen untersuchten Gehirnregionen höher ist, als das Expressionsniveau in den „Rescue-Mäusen“.

Auch innerhalb eines Genotyps sind starke Schwankungen bezüglich des Expressionsniveaus zwischen verschiedenen Gehirnregionen festzustellen, wobei diese nicht über alle Genotypen gleich verteilt sind (Abb. 4.1.4 B). Ebenfalls lassen sich starke Abweichungen in der Expression von humanem TorsinA in individuellen Tieren an den teils sehr großen Standardfehlern erkennen.

Um diese Beobachtung weitergehend zu untersuchen, wurde das Expressionsniveau von humanem TorsinA in weiteren Organen der „Rescue-Mäuse“ untersucht (Abb. 4.1.5). Auch hier konnte ein generell höheres Expressionsniveau von humanem TorsinA in *Tor1a*^(+/-) / *TOR1A*-Tieren gegenüber *Tor1a*^(-/-) / *TOR1A*-Tieren festgestellt werden. Ebenso konnte in diesen Proben eine unterschiedliche Stärke der Expression von humanem TorsinA in verschiedenen Organen innerhalb eines Genotyps

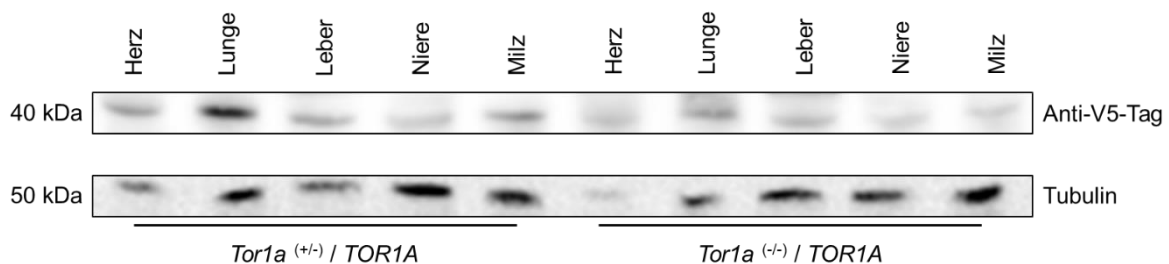


Abb. 4.1.5 Expressionslevel von humanem TorsinA in inneren Organen

Homogenate der inneren Organe von *Tor1a*^(+/-) / *TOR1A*- und *Tor1a*^(-/-) / *TOR1A*-Tieren wurden aufgetrennt und durch Anti-V5-Antikörper detektiert. Humanes TorsinA konnte in allen Organen detektiert werden, allerdings konnte auch hier eine Abhängigkeit des Expressionslevels von der Anzahl verbleibender endogener TorsinA Allele festgestellt werden. α/β -Tubulin dient als Ladekontrolle.

festgestellt werden.

4.1.2 Analyse der Neuropathologie durch Immunhistochemie

Um die Lokalisation des TorsinA Proteins zu analysieren, wurden immunhistochemische Färbungen von Paraffin-fixierten Gehirndünnschnitten angefertigt. Hierbei wurde ein Anti-TorsinA Antikörper von Abcam verwendet. Dies erfolgte unter der Hypothese, dass TorsinA in seiner mutanten Form, TorsinA ΔE , seine zelluläre Lokalisation von Zytoplasma, respektive Endoplasmatischem Retikulum, hin zur Zellkernmembran wechselt. Auch sollte anhand dieser Experimente untersucht werden, ob die Expression von humanem TorsinA durch den mPrP-Promotor einem anderen Muster folgt wie der endogene TorsinA-Promotor.

Es wurden zwei Monate alte wildtypische Mäuse sowie *Tor1a*^(+/-) / *TOR1A*- und *Tor1a*^(-/-) / *TOR1A*-Tiere untersucht. Hierbei konnte eine über alle untersuchten Gehirnregionen hinweg gut sichtbare Färbung beobachtet werden (Abb. 4.1.6). Besonders zeigte sie sich in den Purkinje Zellen des

Cerebellums, der äußeren und inneren Pyramidenzellschicht des Cortex, dem Corpus callosum, der Pyramidenzellschicht des Hippocampus und dem Hirnstamm. Diese Färbungen glichen sich in allen Genotypen, eine auffällige Veränderung der gefärbten Zellpopulationen in *Tor1a*^(+/-)/*TOR1A*- und *Tor1a*^(-/-)/*TOR1A*-Tieren gegenüber dem Wildtyp war nicht festzustellen.

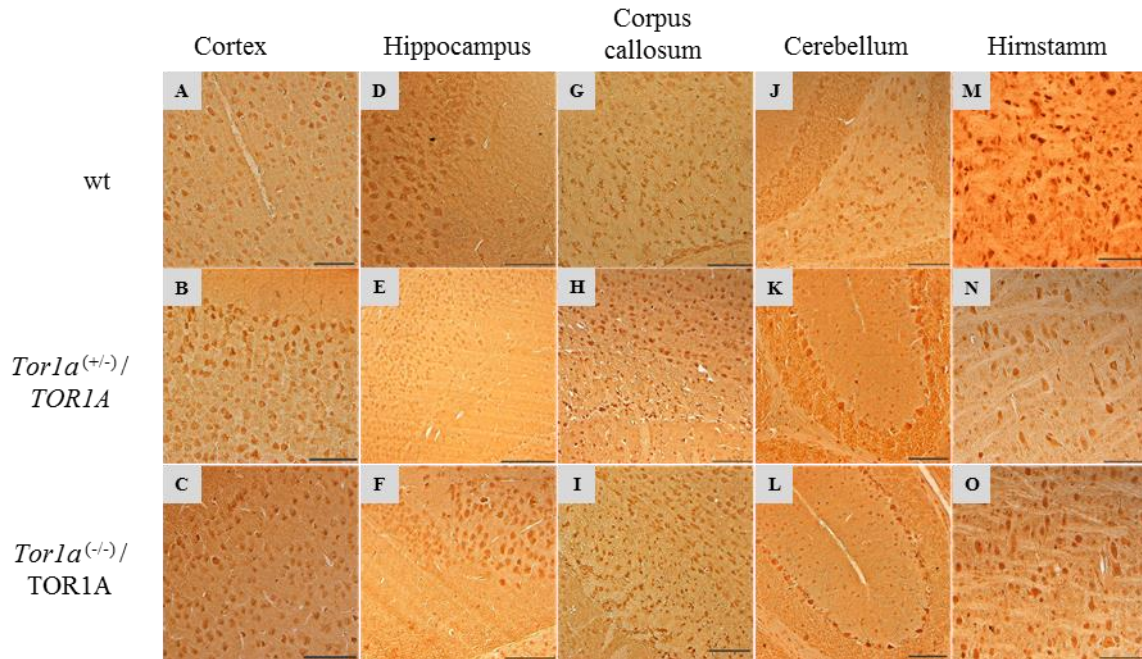


Abb. 4.1.6 Übersicht TorsinA positiver Gehirnregionen

A-O Übersichtsbilder in 200x Vergrößerung aller untersuchten Gehirnregionen der „Rescue-Tiere“ und wildtypischen Kontrollen. Eine Abweichung der gefärbten Zellpopulationen von wildtypischen Gehirnen konnte nicht festgestellt werden. Maßstabsbalken = 100 µm.

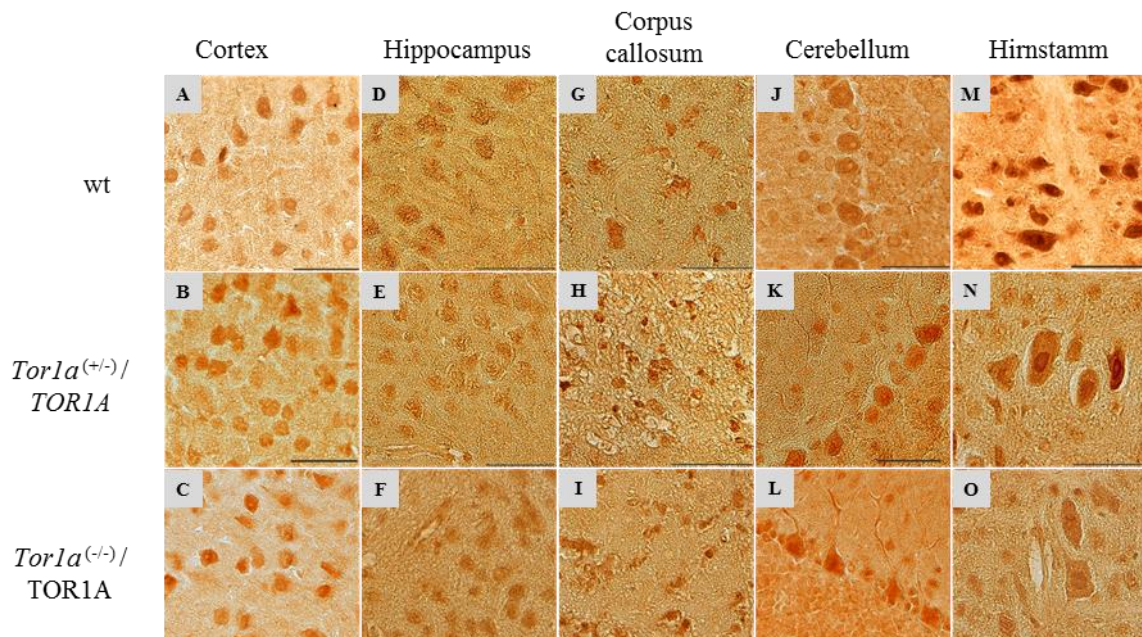


Abb. 4.1.7 Lokalisation von TorsinA innerhalb der Zellen

A-O Detailbilder einzelner Zellen in 630x Vergrößerung für alle untersuchten Gehirnregionen der Rescue-Tiere und wildtypischen Kontrollen. Eine Relokalisation von TorsinA konnte in keinem Genotyp festgestellt werden, TorsinA zeigt ein homogenes Signal im gesamten Zytoplasma der Zellen. Maßstabsbalken 50 µm.

Auch bei der Lokalisation von TorsinA innerhalb der Zelle konnten keine auffälligen Veränderungen von *Tor1a*^(+/-) / *TORIA*- und *Tor1a*^(-/-) / *TORIA*-Tieren gegenüber den wildtypischen Kontrollen beobachtet werden (Abb. 4.1.7). Eine präferentielle Lokalisation von TorsinA in der Kernmembran konnte weder in *Tor1a*^(+/-) / *TORIA*- noch in *Tor1a*^(-/-) / *TORIA*-Tieren detektiert werden. Das TorsinA Signal wurde wie auch in wildtypischen Tieren homogen im gesamten Zytoplasma der Zellen detektiert.

Da der Anti-TorsinA Antikörper bei immunhistochemischen Färbungen neben murinem auch humanes TorsinA erkennt, wurden weitere immunhistochemische Färbungen mit einem Anti-V5 Antikörper durchgeführt, welcher spezifisch nur das humane TorsinA unter Kontrolle des mPrP-Promotors detektiert (Abb. 4.1.8 A). Hierbei wurden die zuvor schon analysierten Gehirnregionen erneut untersucht, um mögliche Abweichungen in der Färbung zu erkennen, falls humanes TorsinA in murinen Hintergrund eine veränderte Lokalisation aufweisen sollte.

Die Färbungen mit Anti-V5 Antikörper zeigten keine Unterschiede in den angefärbten Gehirnregionen zu den bereits mit Anti-TorsinA Antikörper angefertigten Färbungen. Sowohl in *Tor1a*^(+/-) / *TORIA*- als auch in *Tor1a*^(-/-) / *TORIA*-Tieren zeigte sich keine Relokalisation von humanem TorsinA zur Kernmembran, sondern wie erwartet eine homogene zytoplasmatische Färbung in den Zellen aller untersuchten Gehirnregionen.

Überraschenderweise ließ sich weder im Striatum von zwei Monate alten *Tor1a*^(+/-) / *TORIA*- noch *Tor1a*^(-/-) / *TORIA*-Tieren durch immunhistochemische Färbung mit Anti-V5 Antikörper ein Signal detektieren. (Abb. 4.1.8 B) zeigt in aufsteigender Vergrößerung das Striatum von *Tor1a*^(+/-) / *TORIA*- und *Tor1a*^(-/-) / *TORIA*-Tieren. Hierbei lässt sich deutlich das Fehlen einer Färbung erkennen, zum Vergleich ist in 40x Vergrößerung die Färbung des Corpus callosum und des darüber liegenden Cortex erkennbar.

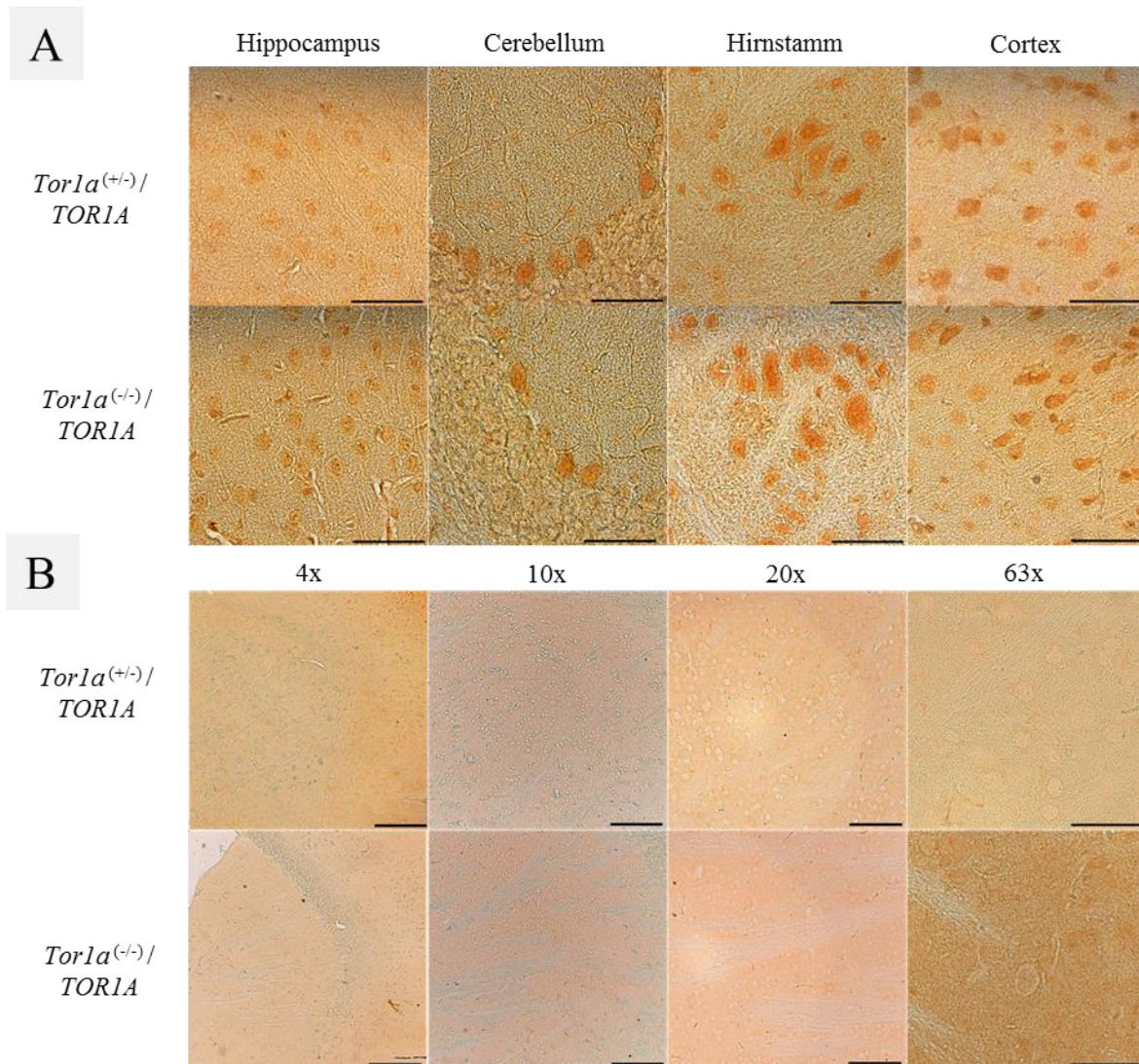


Abb. 4.1.6 Repräsentative immunhistochemische Färbungen durch Anti-V5-Tag Antikörper

A) In immunhistochemischen Färbungen zur Analyse der Verteilung des humanen TorsinA konnte kein Unterschied in extra- und intrazellulärer Lokalisation zwischen *Tor1a*^(+/-)/*TOR1A*- und *Tor1a*^(-/-)/*TOR1A*-Tieren in Hippocampus, Cerebellum, Cortex und Hirnstamm festgestellt werden. 630x Vergrößerung, Maßstabsbalken 100 µm.

B) Immunhistochemische Färbungen mit Anti-V5-Tag Antikörper zeigten keine spezifische Färbungsreaktion in den Striata von *Tor1a*^(+/-)/*TOR1A*- und *Tor1a*^(-/-)/*TOR1A*-Tieren. Maßstabsbalken: 40x = 500 µm, 100x = 200 µm, 200x = 100 µm, 630x = 50 µm.

4.1.3 Strukturelle Analyse der Zellkernmembran

Zur Analyse der Zellkernmembran wurden immunhistochemische Färbungen mit einem Anti-Lamin A/C Antikörper und fluoreszierendem Sekundärantikörper durchgeführt, da der TorsinA KO sowie die Überexpression von TorsinA sowohl in wildtypischer als auch mutierter Form zu einer Konformitätsänderung der Kernmembran führen kann. Lamin A und C dienen hierbei als Marker für die innere Kernmembran, deren Integrität im Striatum der „Rescue-Mäuse“ sowie in Kontrolltieren analysiert wurde. Hierbei konnte im Gegensatz zu den gleichmäßig geförmten und gefärbten Kernmembranen der Kontrollen in den *Tor1a*^(+/-)/*TOR1A*- und *Tor1a*^(-/-)/*TOR1A*-Tieren eine deutlich veränderte Kernmembran beobachtet werden (Abb. 4.1.9). Die Kernmembranen zeigten deutliche Unregelmäßigkeiten wie Einbuchtungen und Ausstülpungen in der Morphologie sowie starke Akkumulationen von Lamin A/C (weiße Pfeile)

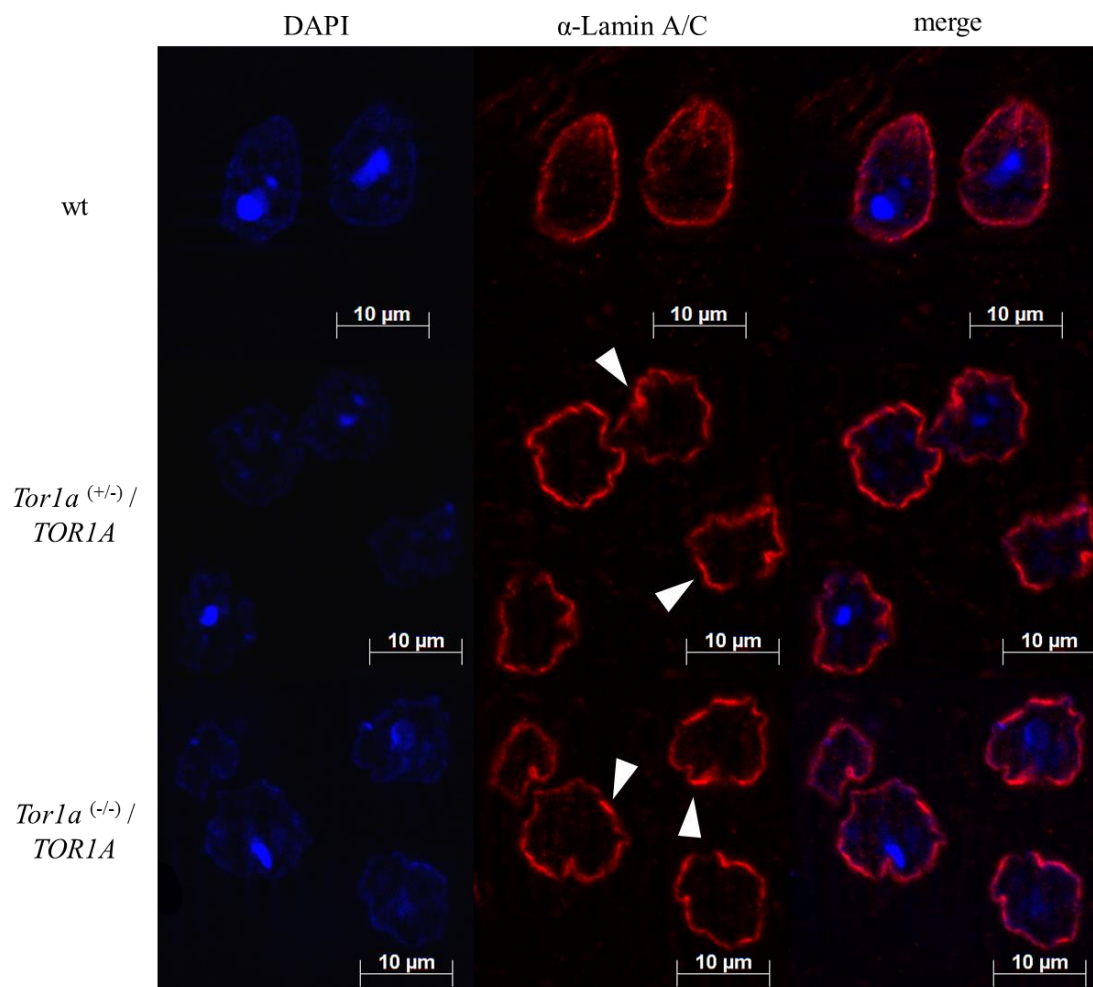


Abb. 4.1.7 Struktur der Kernmembran in Striatum

Immunfluoreszenzfärbungen von Lamin A/C zeigten eine auffällige Form der Kernmembran in *Tor1a*^(+/-)/*Tor1A*- und *Tor1a*^(-/-)/*Tor1A*-Tieren gegenüber den Kontrolltieren sowie mehrere verdickte Bereiche (weiße Pfeile). Vergrößerung 630x, Maßstabsbalken 10 µm.

Um die Auffälligkeiten in der Kernmembran detaillierter zu untersuchen, wurden elektronenmikroskopische Aufnahmen der Striata zwei Monate alter in *Tor1a*^(+/+)/*TOR1A*-, *Tor1a*^(-/-)/*TOR1A*- und *Tor1a*^(+/-)/*TOR1A*-Tiere sowie von Kontrolltieren angefertigt (Abb. 4.1.10 A und B). Hierbei konnte eine Weitung des Intermembranraums zwischen den Kernmembranen, dem sogenannten perinukleären Spalt, beobachtet werden. So zeigte der perinukleäre Spalt in wildtypischen Kontrollen keinerlei Auffälligkeiten und beide Kernmembranen zeigten einen zueinander parallelen Verlauf, während in *Tor1a*^(+/+)/*TOR1A*- und *Tor1a*^(-/-)/*TOR1A*-Tieren sich die äußere Kernmembran in Teilen ins Zytoplasma ausstülpte und der perinukleäre Spalt erweitert war (Abb. 4.1.10 B, rote Pfeile). Hierbei konnte auch beobachtet werden, dass die Ausstülpungen in *Tor1a*^(-/-)/*TOR1A*-Tieren weitaus häufiger

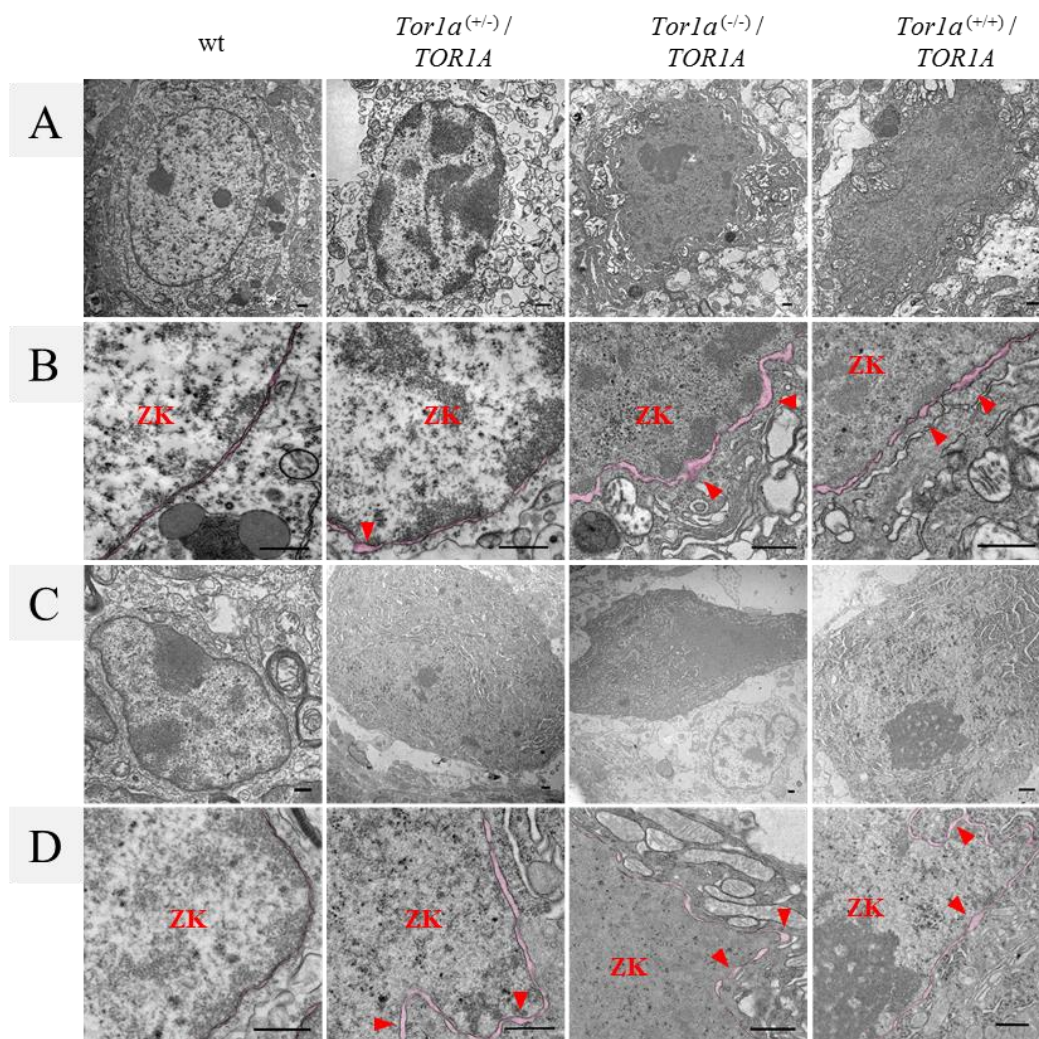


Abb. 4.1.8 Elektronenmikroskopische Aufnahmen des Striatums und Cerebellums

A) Elektronenmikroskopische Analyse von Neuronen im Striatum von *Tor1a*^(+/+)/*TOR1A*-, *Tor1a*^(-/-)/*TOR1A*-, *Tor1a*^(+/-)/*TOR1A*- sowie Kontrolltieren im Alter von zwei Monaten. B) Vergrößerte Ausschnitte der Zellkernmembran. In *Tor1a*^(+/-)/*TOR1A*-, *Tor1a*^(-/-)/*TOR1A*- und *Tor1a*^(+/+)/*TOR1A*-Tieren ist deutlich der in Teilen erweiterte perinukleäre Spalt (rosa Färbung) zwischen Kernmembranen zu erkennen (rote Pfeile), während in den Kontrolltieren ein paralleler Verlauf der Kernmembran zu beobachten ist. C) Elektronenmikroskopische Analyse von Purkinje-Zellen im Cerebellum von *Tor1a*^(+/+)/*TOR1A*-, *Tor1a*^(-/-)/*TOR1A*-, *Tor1a*^(+/-)/*TOR1A*- sowie Kontrolltieren im Alter von zwei Monaten. D) Vergrößerte Ausschnitte der Zellkernmembran und des perinukleären Spaltes (rosa Färbung). Wie in den Neuronen des Striatums kann auch in den Purkinje-Zellen der *Tor1a*^(+/-)/*TOR1A*-, *Tor1a*^(-/-)/*TOR1A*- und *Tor1a*^(+/+)/*TOR1A*-Tieren eine deutliche Weitung in Teilen des perinukleären Spaltes beobachtet werden (rote Pfeile). Die Aufnahmen wurden in Kooperation mit Prof. Dr. med. M. Schaller/ B. Fehrenbacher (Hautklinik, Tübingen) aufgenommen. Maßstabsbalken 2 Å (A/C) und 0,5 Å (B/D).

zu beobachten waren, als in *Tor1a*^(+/-) / *TORIA*-Tieren. Allerdings ließ sich eine Ausstülpung der Kernmembran auch in *Tor1a*^(+/+) / *TORIA*-Tieren beobachten. Da in immunhistochemischen Experimenten allerdings im Striatum keine Expression des humanen TorsinA festgestellt werden konnte, wurde zur Überprüfung des Einflusses von TorsinA auf die Auffälligkeiten in der Zellkernmembran zusätzliche elektronenmikroskopische Bilder der Purkinje-Zellen im Cerebellum angefertigt. In diesen Zellen konnte per Western Blot und immunhistochemischer Färbung eine starke Expression von humanem TorsinA gezeigt werden konnte (Abb. 4.1.10 C und D). In den Purkinje-Zellen konnte eine Erweiterung des perinukleären Spaltes in *Tor1a*^(+/-) / *TORIA*-, *Tor1a*^(-/-) / *TORIA*- und *Tor1a*^(+/+) / *TORIA*-Tieren nachgewiesen werden, während in den Kontrolltieren die Kernmembranen exakt parallel verliefen (Abb. 4.1.10 D, rote Pfeile).

4.1.4 Phänotypisierung der „Rescue-Tiere“

Da die „Rescue-Tiere“ sich als lebensfähig herausstellten, wurden zur Charakterisierung des neuen Modells mehrere Verhaltensanalysen durchgeführt, um eventuelle Verhaltensauffälligkeiten zu erkennen.

Dies diente dazu, den Erfolg des „Rescues“ sicherstellen, indem mögliche Dystonie-ähnliche Verhaltens- und Bewegungsauffälligkeiten der Tiere durch die Tests erkannt werden sollten. Zuerst wurde das Grundverhalten der Tiere durch den SHIRPA-Test untersucht, gefolgt von einem RotaRod-Test, welcher die motorischen Lern- und Koordinationsfähigkeiten der „Rescue-Mäuse“ untersucht. Als Test auf putative neurologische Einschränkungen wurde das CatWalk-System gewählt, welches eine extrem genaue Aufzeichnung und Auswertung des Laufbildes der Tiere ermöglicht.

In allen Tests wurden Kohorten von je zehn Tieren beider Geschlechter pro Genotyp im Alter von sechs Monaten verwendet. Einen Monat vor den Experimenten wurden die Mäuse ca. 2-3 Mal pro Woche für 5 min von den Experimentatoren zur Gewöhnung an die menschliche Hand aus den Käfigen genommen. Dies sollte eine extreme Stressreaktion der Tiere während der Experimente und eine dadurch entstehende Verfälschung der Experimente verhindern. Alle Experimente wurden während der Nachtphase der Tierhaltung durchgeführt, als Beleuchtung dienten Rotlichtlampen.

4.1.4.1 SHIRPA-Analyse

Um den allgemeinen Gesundheitszustand der Mäuse zu beurteilen, wurde der SHIRPA-Test durchgeführt (Smith Kline Beecham Pharmaceuticals, Harwell, Imperial College School of Medicine at St. Mary`s, Royal London Hospital, St. Bartholomew`s and the Royal London School of Medicine, Phenotype Assessment). Der Test setzt sich aus mehreren Kategorien zusammen (Tab. 4.1), in welchen verschiedene Tests aufgeführt werden. Für jeden Test erhalten die Tiere Punkte, welche einen Vergleich der verschiedenen Genotypen zulassen.

Tab. 4.1.1 Kategorien des SHIRPA-Tests

Kategorie	Test/Beurteilung
Erscheinungsbild	Aussehen des Fells, Hautfarbe, Schnurhaare, Schwanzhaltung
Aktivität und Motorik	Körperposition, Tremor, Bewegungsaktivität
Autonome Funktionen	Verschluss des Augenlids, Schreckreaktion, Windung des Rumpfes
Sensomotorik	Reaktion auf Berührung, Ohrmuschelreflex, Stellreflex, Corneareflex
Neuromuskuläre Funktion	Gang, Passivität
Angstverhalten/ Aggressivität	Darmentleerung, Reaktion auf Transfer in Arena, Lautäußerung, Beißen

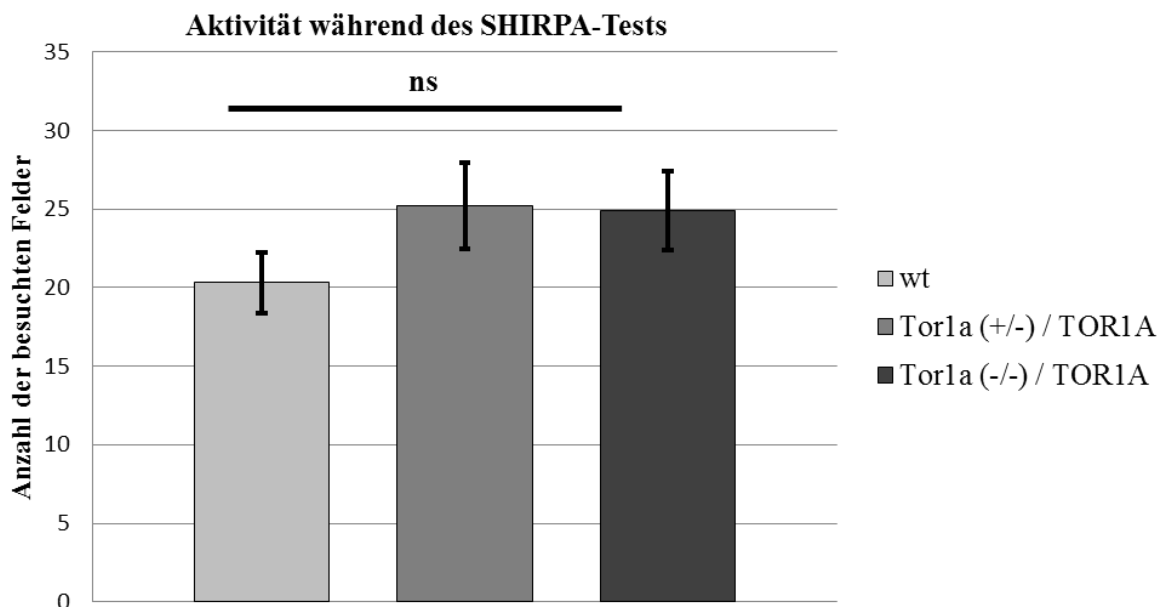


Abb. 4.1.9 Analyse der Aktivität während des SHIRPA-Tests.

Nach der Beobachtung der Tiere im Beobachtungsgefäß während des SHIRPA-Tests wurden die Tiere aus 30 cm Höhe in eine 1x1 m messende Arena fallen gelassen. Um eine Aussage über die Aktivität der Tiere treffen zu können, wurde während der ersten Minute nach dem Fall die Anzahl der von der Maus betretenen 10x10 cm großen Felder in der Arena gezählt. Fehlerbalken repräsentieren den Standardfehler.

Anhand des SHIRPA-Tests konnten alle Tiere als gesund klassifiziert werden. Zusätzlich konnten die Anzahl der besuchten Felder nach dem Transfer der Tiere in die Arena ausgewertet werden, was allerdings ebenfalls keine signifikanten Unterschiede zwischen den Genotypen aufzeigte (Abb. 4.1.9).

4.1.4.2 Analyse der motorischen Fähigkeiten der „Rescue-Tiere“

Mit Hilfe des RotaRod-Tests konnten die motorischen Fähigkeiten der „Rescue-Tiere“ untersucht werden. Dieser Test stellte eine hohe Anforderung an den Gleichgewichtssinn und die motorische Koordination. Die Schwierigkeit wurde durch die sich steigernde Geschwindigkeit des RotaRods zusätzlich erhöht. Nach einer Testphase, bei der sich die Tiere zuerst einmal mit dem Gerät vertraut machen sollten, wurden während der zwei Testtage die Verweildauer der Tiere auf dem RotaRod gemessen. Diese diente als Maßstab für die motorischen Fähigkeiten der Tiere. Wie in Abb. 4.1.10 zu sehen, scheint es eine hohe Abweichung der durchschnittlichen Verweildauer der Tiere auf dem Rotarod zu geben. So verblieben *Tor1a*^(+/-)/*TOR1A*-Tiere im Durchschnitt länger als wildtypische Tiere auf dem RotaRod, während *Tor1a*^(-/-)/*TOR1A*-Tiere schneller von der sich drehenden Rolle fielen. Allerdings waren die Abweichungen innerhalb eines Genotyps relativ hoch, was diesen Beobachtungen eine Signifikanz verwehrt.

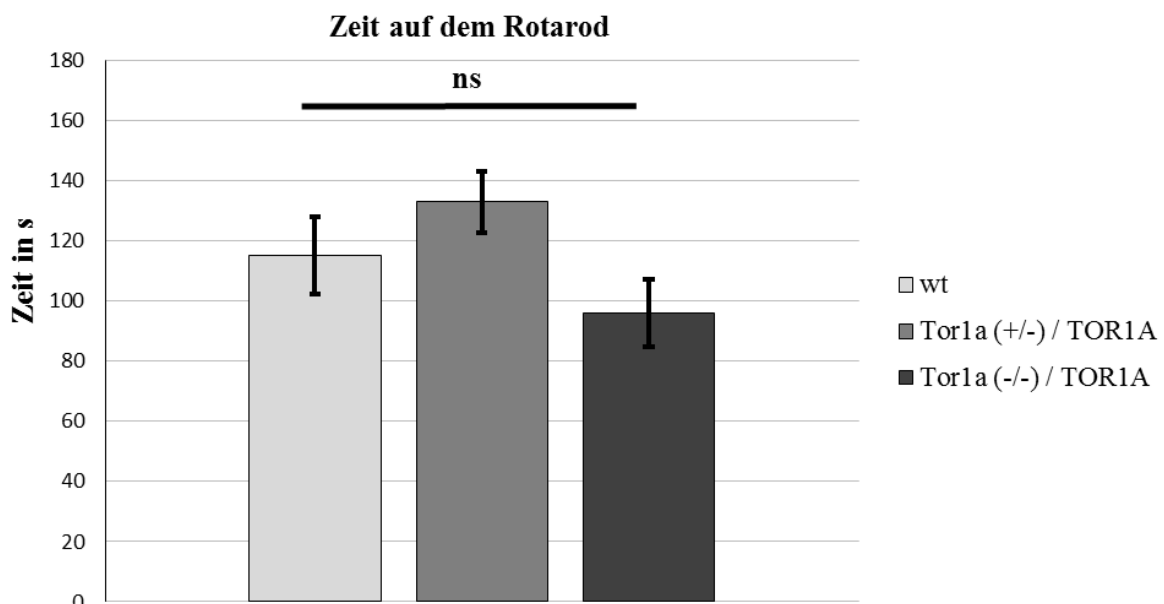


Abb. 4.1.10 Analyse der motorischen Koordination auf dem RotaRod

Bei der Analyse der durchschnittlichen Verweildauer der Tiere auf dem RotaRod während der zwei Testtage konnte keine signifikanten Unterschiede der getesteten Genotypen zueinander festgestellt werden. Fehlerbalken repräsentieren Standardfehler.

4.1.4.3 Analyse des Gangbildes der „Rescue-Tiere“ durch das CatWalk-System

Das CatWalk-System erlaubte durch Filmen der Tiere, wie sie über eine Glasplatte laufen (100x10 cm), eine sehr genaue Analyse des Gangbildes der „Rescue-Tiere“. Durch vorher festgelegte Parameter können direkt nach der Aufnahme eines Laufes nicht übereinstimmende Läufe gelöscht werden. Als

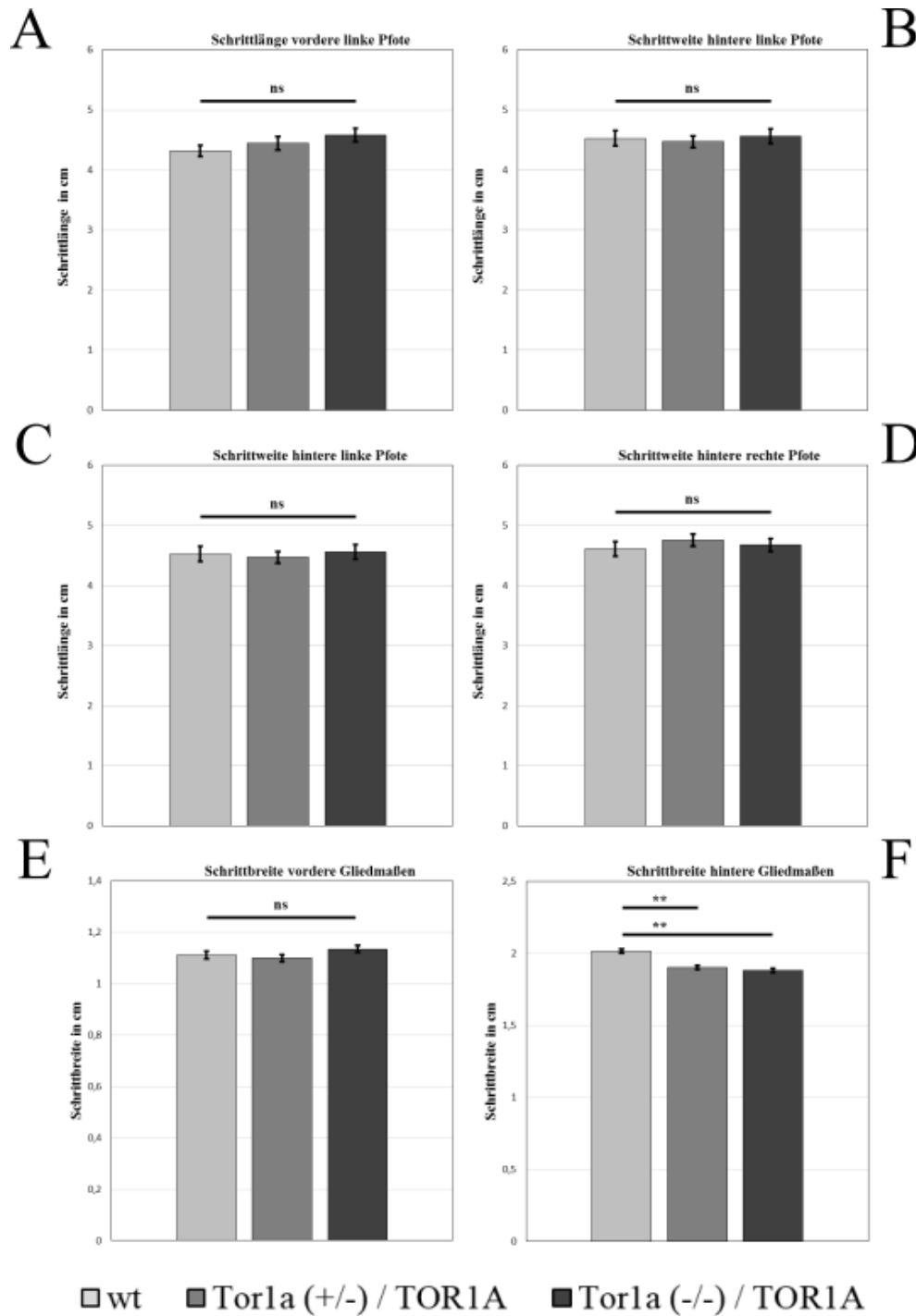


Abb. 4.1.11 Analyse des Gangbildes durch das CatWalk-System

Analyse der Schrittweite der vorderen Pfoten links (A) und rechts (B), der hinteren Pfoten links (C) und rechts (D) sowie der Schrittbreite der vorderen (E) und hinteren (F) Gliedmaßen. Einen signifikanten Unterschied zwischen den „Rescue-Tieren“ und den Kontrolltieren konnte in in der Schrittbreite der hinteren Gliedmaßen festgestellt werden ($p > 0,01$). Fehlerbalken repräsentieren den Standardfehler.

Parameter wurden in diesem Experiment eine Laufdauer von 0,5-7 s und eine Geschwindigkeitsvarianz von maximal 60 % gewählt. Nach der Akquisition von zehn Läufen pro Tier wurden die Videos ausgewertet und die Ergebnisse der Läufe automatisch berechnet. Jeweils gemessen wurde die Schrittlänge vordere linke Pfote (Abb. 4.1.11 A), Schrittlänge vordere rechte Pfote (Abb. 4.1.11 B), Schrittlänge hintere linke Pfote (Abb. 4.1.11 C), Schrittlänge hintere rechte Pfote (Abb. 4.1.11 D), Schrittbreite vordere Gliedmaßen (Abb. 4.1.11 E) sowie die Schrittbreite hintere Gliedmaßen (Abb. 4.1.11 F). Durch das Systematisieren der einzelnen Läufe können anschließend diejenigen Läufe aussortiert werden, die nicht einem typischen Laufverhalten entsprechen, wie spontane Stopps, Sprints oder Richtungsänderungen. Diese erlaubt eine bessere Auswertung der Parameter als z.B. der Footprint-Test. Dies lässt sich auch am sehr geringen Standardfehler ablesen.

Nach der Analyse der Daten ließen sich keine signifikanten Differenzen zwischen *Tor1a*^(+/-)/*TORIA*-, *Tor1a*^(-/-)/*TORIA*- und wildtypischen Tieren feststellen, bis auf den Punkt der hinteren Schrittbreite. Hier zeigen sowohl *Tor1a*^(+/-)/*TORIA*-, als auch *Tor1a*^(-/-)/*TORIA*-Tiere einen signifikanten Unterschied zu den Kontrolltieren.

4.1.5 Zusammenfassung

Durch Einkreuzen von *TORIA* unter der Kontrolle des mPrP-Promotors in *Tor1a*^(-/-)-Tiere konnten lebensfähige und motorisch unauffällige Tiere generiert werden. Es zeigte sich ein Einfluss von der Anzahl der endogenen TorsinA Allele auf die Expressionsstärke des transgenen humanen TorsinA-Proteins. Zudem konnte in *Tor1a*^(+/-)/*TORIA*-, *Tor1a*^(-/-)/*TORIA*-Tiere eine auffällige Weitung der Kernmembran beobachtet werden.

4.2 Charakterisierung des ersten TorsinB Knockout Mausmodelles

4.2.1 Bestätigung des Knockout durch Sequenzanalyse

Zur Analyse der für die Experimente vorgesehenen-Tiere wurden nach dem Absetzen der Jungtiere Ohrbiopsien entnommen und die genomische DNA extrahiert. Um den gewünschten Locus des KO zu amplifizieren, wurde eine PCR-Reaktion mit TorsinB spezifischen Primern durchgeführt. Zur Funktionskontrolle der PCR-Reaktion wurden 2 µl des Amplifikats auf ein Agarosegel gegeben (Abb. 4.2.1 A). Neben dem wildtypischen Allel konnten weitere PCR-Produkte mit abweichenden Längen erkannt werden. Der verbleibende Reaktionsansatz wurde durch das Quiaquick PCR Purification KIT aufgereinigt und zur Durchführung der Sequenzierreaktion an die Firma GATC Biotech AG versandt. Die zur Amplifikation des TorsinB-Lokus verwendeten PCR-Primer wurden so gewählt, dass sie gleichzeitig als Primer für die Sanger-Sequenzierung verwendet werden konnten. Nach Erhalt der Sequenzen wurden diese durch das Online-Alignment-Werkzeug „Clustal Omega“ mit der Sequenz von TorsinB, welche aus der Ensembl-Datenbank entnommen wurde, verglichen (Abb. 4.2.1 B). In den so analysierten F0-Tieren konnten eine Deletion zu Beginn des ersten Exons von TorsinB identifiziert werden, welche 22 Basen Länge aufwies. Diese Deletion führte zum Verlust von sieben Aminosäuren und einer zusätzlichen Verschiebung des Lesemusters. Das daraus resultierende Stoppcodon an der Stelle 21 führte darüber hinaus zu einem verfrühten Abbruch der Translation und einem erheblich verkürzten Protein, welches keinerlei aktive Funktion aufwies sollte.

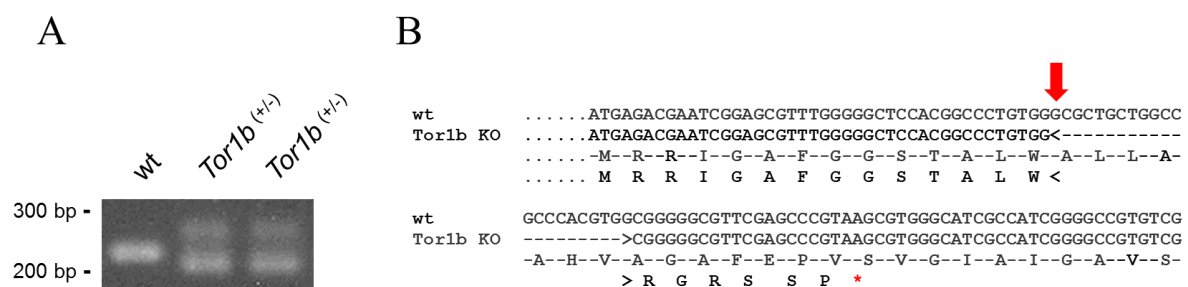


Abb. 4.2.1: Genotypisierung der *Tor1b* KO Tiere

A) PCR Reaktion zur Amplifizierung des 223 Basen (im wt Tier), bzw. 201 Basen langen Knockout-Lokus. **B)** Alignment des Knockout-Lokus zwischen Wildtyp und homozygotem Knockout. Der Knockout von 22 Basen führte zum Verlust von 7 Aminosäuren nach dem Tryptophan an Stelle 14. Durch den Verlust von 22 Basen verschob sich zusätzlich das Lesemuster, sodass ein verfrühtes Stoppcodon erzeugt wurde.

4.2.2 Expressionsanalyse von TorsinB und TorsinA

Um die Funktion des Anti-TorsinB-Antikörpers von Atlas Antibodies (Stockholm, S) für die Western Blot Analyse zu testen, wurden Proteinlysate verschiedener Organe und Gehirnregionen zwölf Monate alter wildtypischer Mäuse aufgetrennt und mit Anti-TorsinB-Antikörper detektiert (Abb. 4.2.2 A).

Dieser Antikörper wurde gewählt, da andere kommerziell erhältliche Anti-TorsinB-Antikörper nicht den einwandfrei funktionierten.

Hierbei konnte ein deutliches Signal bei der erwarteten molekularen Masse von ca. 37 kDa detektiert werden. Allerdings konnte eine auffallende Schwankung des Expressionslevels zwischen den einzelnen Proteinlysaten innerhalb eines Tieres beobachtet werden. Daraufhin wurden Proteinlysate von zwei weiteren Tieren analysiert und quantifiziert (Abb. 4.2.2 B). Das TorsinB Expressionslevel in nicht

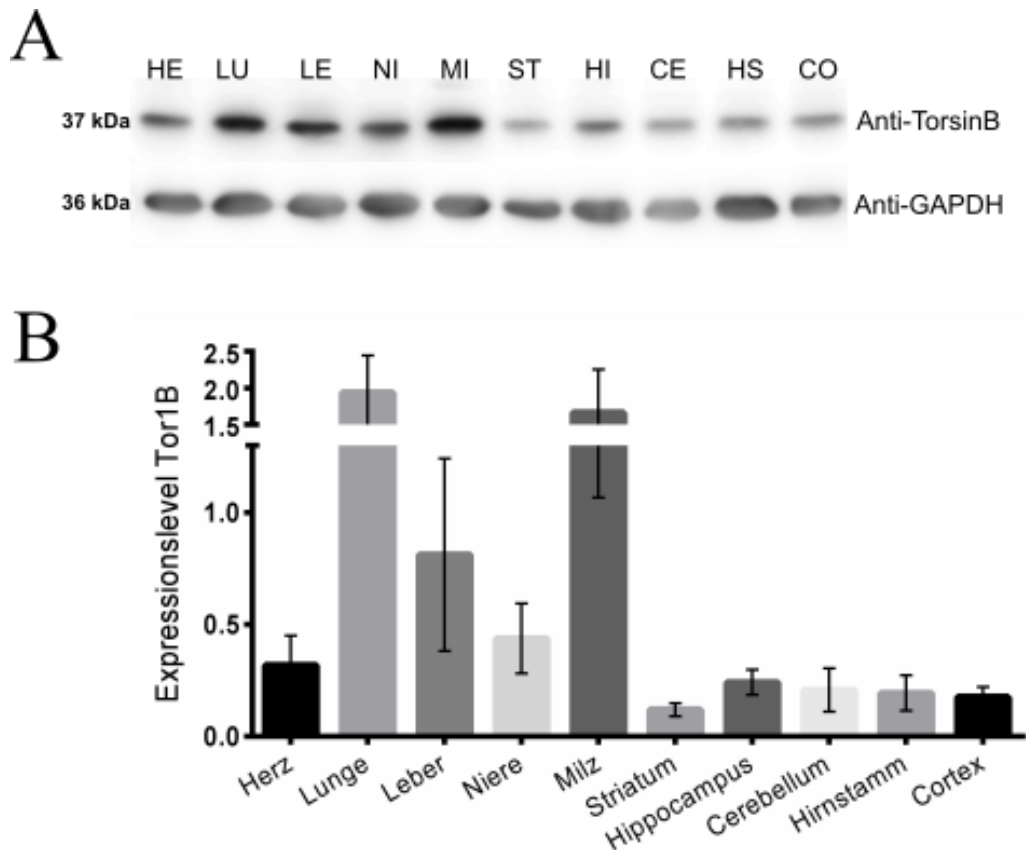


Abb. 4.2.2 TorsinB zeigt gewebespezifisch unterschiedliche Expressionslevel

A) Repräsentative Western Blot Analyse von verschiedenen Geweben aus 12 Monate alten wildtypischen Tieren. Die Homogenate wurden aufgetrennt und durch Anti-TorsinB-Antikörper detektiert. Nicht neuronales Gewebe zeigte ein deutlich stärkeres Signal als Gewebe aus verschiedenen Gehirnregionen, GAPDG diente als Ladekontrolle.

HE = Herz; LU = Lunge; LE = Leber; NI = Niere; MI = Milz; SI = Striatum;

HI = Hippocampus; CE = Cerebellum; HS = Hirnstamm; CO = Cortex.

B) Quantifizierung des TorsinB Expressionslevel ($n = 3$). Gewebe der einzelnen Gehirnregionen zeigten ein ähnliches schwaches Expressionslevel, nicht neuronales Gewebe, insbesondere Lunge und Milz, zeigte ein extrem hohes Expressionslevel.

neuronalem Gewebe von Herz, Lunge, Leber, Niere und Milz war deutlich höher, als das in den verschiedenen getesteten Gehirnregionen. So zeigten Lunge und Milz das höchste Expressionslevel, während das Expressionslevel im Herz ähnlich wie im Gehirn sehr niedrig ausfiel.

Um die Vollständigkeit des Knockouts von TorsinB zu untersuchen, wurden das TorsinB Proteinlevel von zwölf Monate alten KO-Tieren durch Western Blot analysiert (Abb. 4.2.3 A/B). So sollte durch die Deletion von 22 Basenpaaren und der damit verbundenen Verschiebung des Leserasters der mRNA ein Abbau dieser erfolgen, wodurch keine Translation erfolgen kann. So konnte in *Tor1b*^(-/-)-Tieren sowohl in den inneren Organen Herz, Lunge, Leber, Milz und Niere als auch in den Gehirnregionen Striatum,

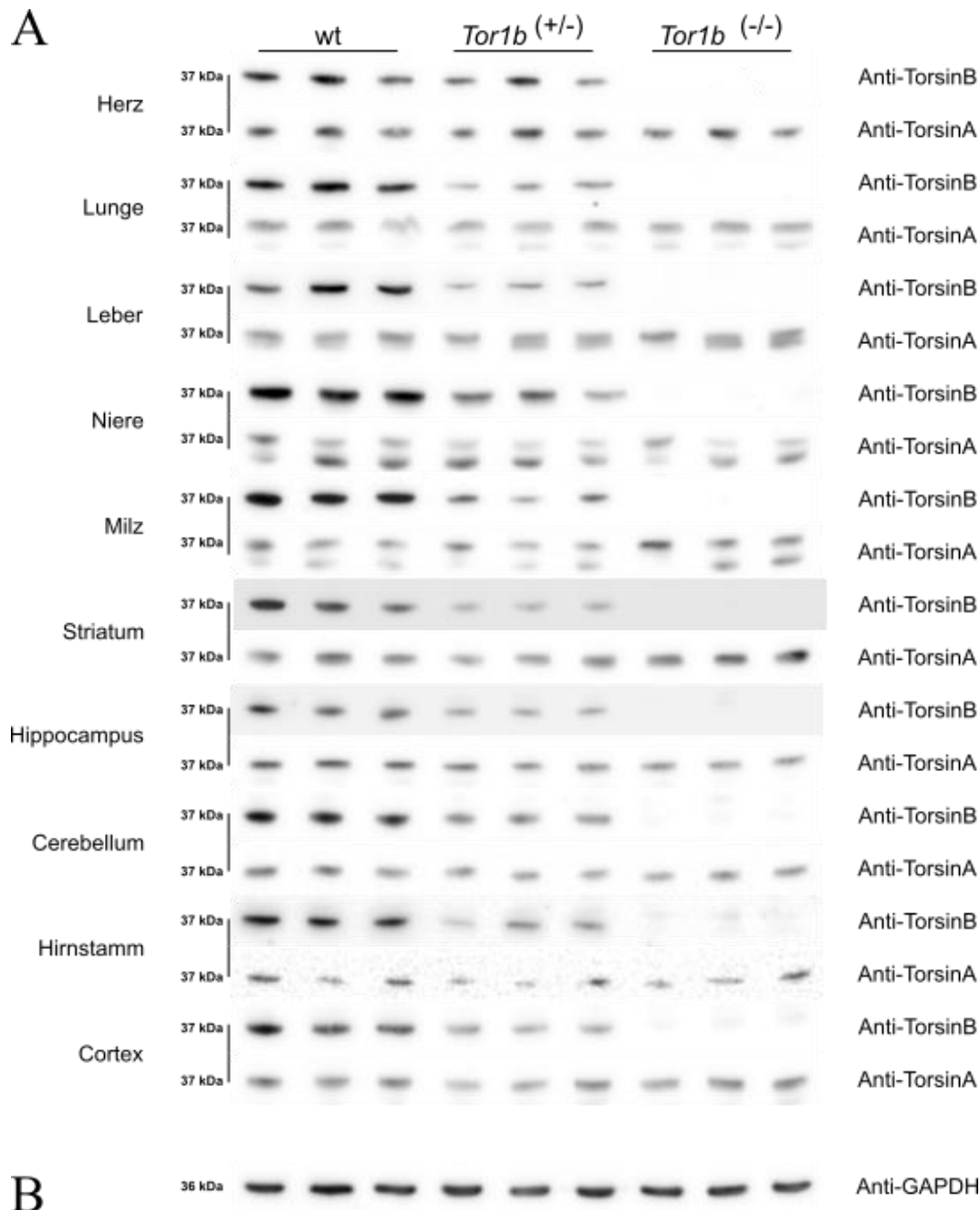


Abb. 4.2.3: Expressionsanalyse von TorsinB und TorsinA in *Tor1b* KO Mäusen

A-B) Repräsentative Western Blot Analyse von je drei wt-, *Tor1b*^(+/-)- und *Tor1b*^(-/-)-Tieren.

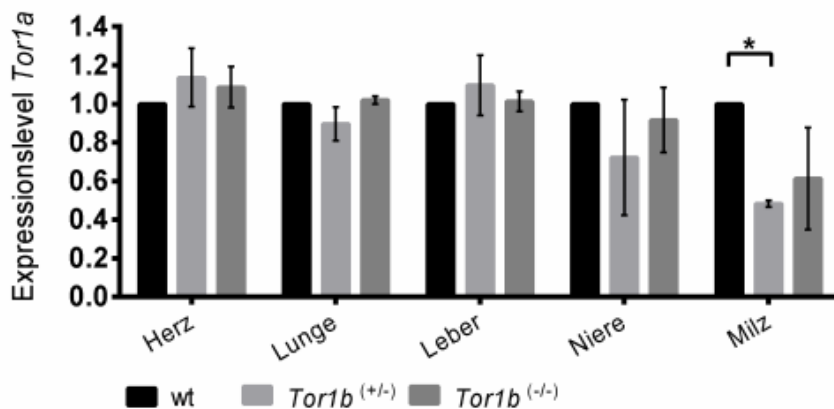
A) Homogenate wurden aufgetrennt und durch Anti-TorsinB und Anti-TorsinA-Antikörper detektiert. In *Tor1b*^(-/-) Tieren konnte kein TorsinB detektiert werden, während es in wildtypischen Tieren klar und bei *Tor1b*^(+/-) aufgrund des heterozygoten KO's deutlich schwächer erkennbar war. TorsinA konnte in allen Genotypen detektiert werden.

B) GAPDH diente als Ladekontrolle.

Hippocampus, Cerebellum, Hirnstamm und Cortex kein TorsinB nachgewiesen werden, während die Proteinlysate der Kontrolltiere wie erwartet eine deutliche Bande bei 37 kDa aufwiesen. Diese Bande konnte in *Tor1b*^(+/-)-Tieren ebenfalls detektiert werden, allerdings zeigte sie bei diesen Tieren ein deutlich geringeres Expressionslevel.

Um mögliche Kompensationseffekte für das Fehlen von TorsinB durch TorsinA zu untersuchen, wurde die Expression von TorsinA ebenfalls analysiert (Abb. 4.2.3 A). TorsinA konnte in allen untersuchten Geweben der drei verschiedenen Genotypen nachgewiesen werden, allerdings konnte bei den Proben

A



B

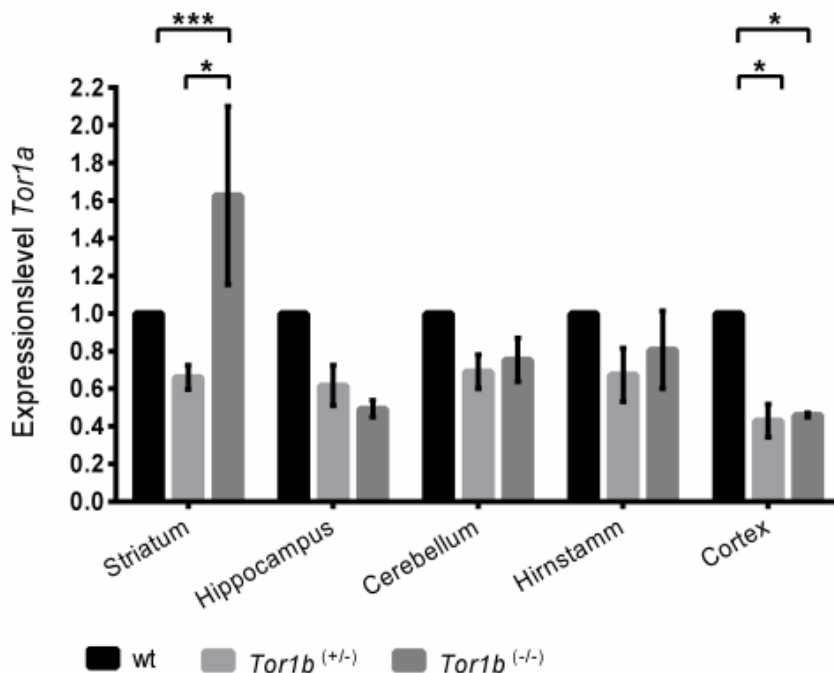


Abb. 4.2.4: Quantifizierung des TorsinA Expressionslevels in *Tor1b* KO Mäusen

A) Quantifizierung des Expressionslevels in den inneren Organen ($n = 3$) zeigte ein signifikant geringeres TorsinA Expressionslevel in *Tor1b*^(+/-)-Tieren im Vergleich zu den Kontrolltieren ($p = 0,024$).

B) Quantifizierung des Expressionslevels in verschiedenen Gehirnregionen ($n = 3$). Im Cortex konnte ein signifikant geringeres TorsinA Expressionslevel von *Tor1b*^(-/-)- im Vergleich zu *Tor1b*^(+/-)- und Kontrolltieren beobachtet werden ($p = 0,016$), während im Striatum *Tor1b*^(-/-)-Tiere ein signifikant höheres Expressionslevel als *Tor1b*^(+/-)- und Kontrolltiere aufwiesen ($p < 0,001$).

aus Lunge, Leber, Niere, Milz und Cortex eine weitere Bande mit geringerer molekularer Masse detektiert werden. Es könnte sich hierbei um eine weniger glykosilierte Form von TorsinA handeln, welche durch eine unspezifische Reaktion des Antikörpers detektiert wurde. Auch die Detektion von Torsin2 und 3 kann nicht ausgeschlossen werden, da diese Proteine eine geringere bzw. größere molekulare Masse aufweisen (Jungwirth *et al.*, 2010). Spezifische Antikörper für diese TorsinA-homologen Proteine sind kommerziell nicht erhältlich.

Durch die gleichzeitige Detektion von Proben aus je drei einzelnen Tieren konnte das Expressionslevel von TorsinA in *Tor1b*^(+/-)- und *Tor1b*^(-/-)-Tieren relativ zu wildtypischen Tieren quantifiziert und statistisch ausgewertet werden (Abb. 4.2.4 A/B). Die Expressionslevel von TorsinA in Herz, Lunge, Leber und Niere zeigten keine signifikanten Unterschiede zu den Kontrolltieren, auch eine Tendenz zu Schwankungen im Expressionslevel konnten nicht beobachtet werden.

4.2.3 Phänotypische Charakterisierung

Da die untersuchten KO-Tiere, bei welchem kein endogenes TorsinB nachgewiesen werden konnte, im Gegensatz zu *Tor1a* defizienten Mäusen keine Einschränkungen in ihrer Lebensfähigkeit aufwiesen, wurden verschiedene Verhaltensexperimente durchgeführt, um putative Einschränkungen der *Tor1b* defizienten Tiere zu untersuchen.

In allen Tests wurden Kohorten von je acht Tieren (beider Geschlechter) je Genotyp im Alter von drei bis sieben Monaten verwendet. Einen Monat vor den Experimenten wurden die Mäuse ca. 2-3 Mal pro Woche für 5 min von den Experimentatoren zur Gewöhnung an die menschliche Hand aus den Käfigen genommen. Dies sollte eine extreme Stressreaktion der Tiere während der Experimente und eine dadurch entstehende Verfälschung der Experimente verhindern. Alle Experimente wurden während der Nachtphase der Tierhaltung durchgeführt, als Beleuchtung dienten Rotlichtlampen.

4.2.3.1 Labmaster

Um die generelle Aktivität und das Verhalten der Tiere zu testen, wurden je acht *Tor1b*^(+/-), *Tor1b*^(-/-)- und Kontrolltiere im Alter von drei und sieben Monaten für 72 Stunden in automatisierten Verhaltenskäfigen, den sogenannten Labmaster-Käfigen, gehalten. Diese Käfige entsprachen den Heimkäfigen der Tiere, Futter und Wasser waren ad libitum verfügbar. Durch zwei Reihen von

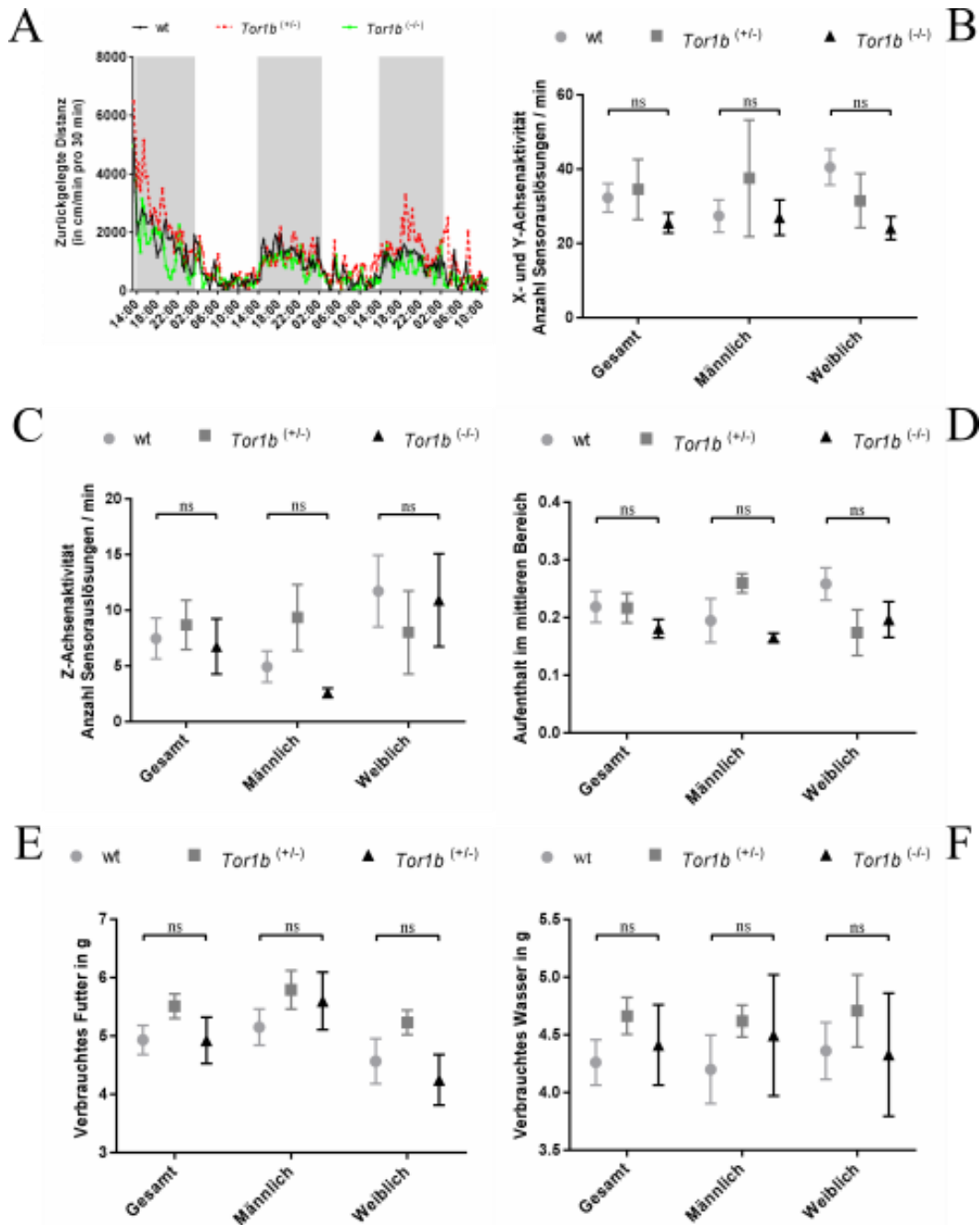


Abb. 4.2.5: Auswertung der Labmaster-Daten im Alter von drei Monaten

A) Zurückgelegte Distanz der Tiere während des gesamten Experimentes. Die aktive Phase der Tiere (Nacht) wurde durch graue Balken hervorgehoben. Nur die letzte aktive Phase der Tiere wurde ausgewertet. *Tor1b*^(+/-)- und *Tor1b*^(-/-)-Tiere zeigten keine signifikanten Unterschiede zu den Kontrolltieren in X- und Y-Achsenaktivität (**B**), Aufrichthäufigkeit (**C**) sowie keine Unterschiede in der Aufenthaltshäufigkeit in der Mitte des Käfigs (**D**). Auch bei konsumiertem Futter (**E**) sowie Wasser (**F**) konnten keine signifikanten Unterschiede beobachtet werden.

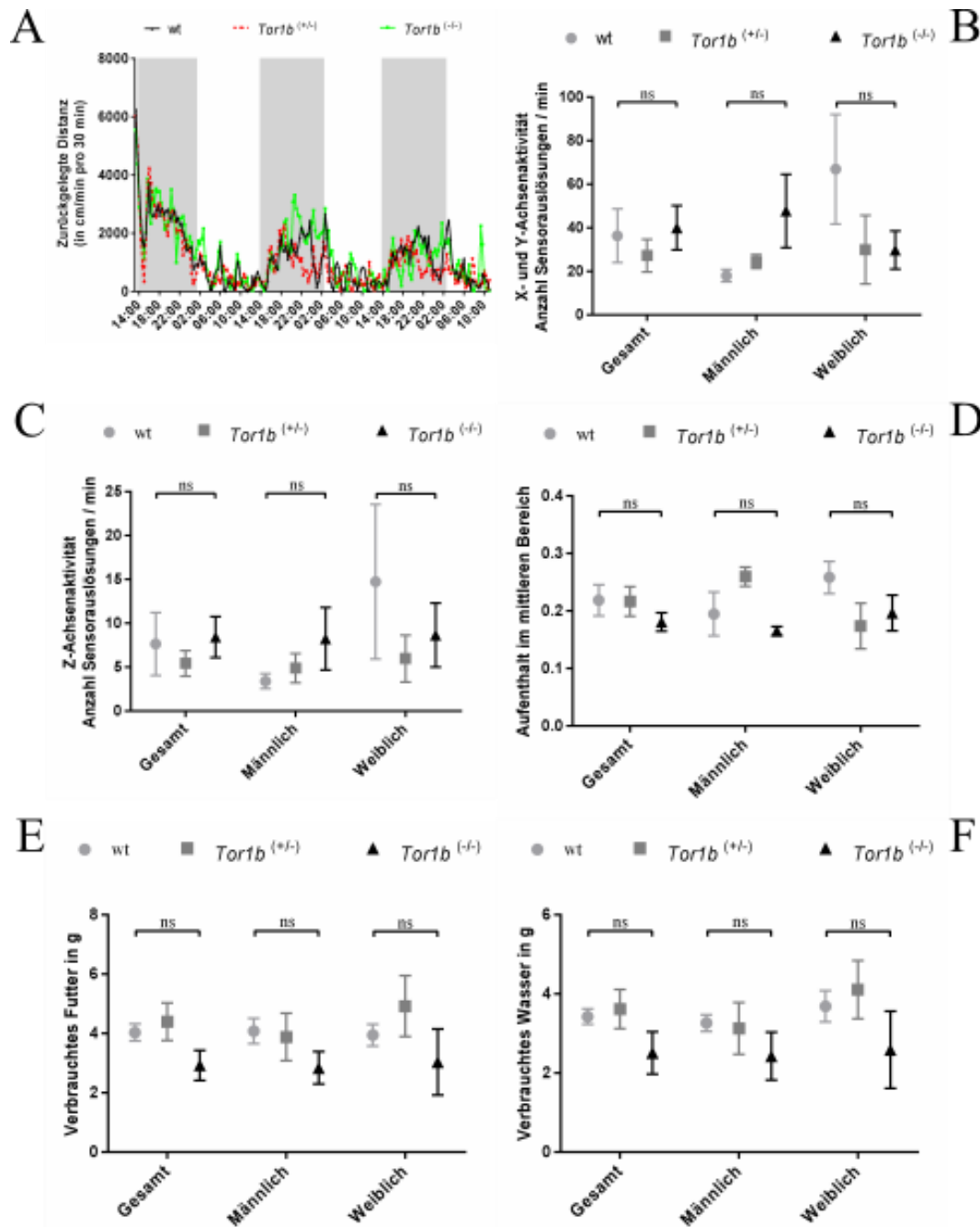


Abb. 4.2.6: Auswertung der Labmaster-Daten im Alter von sieben Monaten

A) Zurückgelegte Distanz der Tiere während des gesamten Experimentes. Die aktive Phase der Tiere (Nacht) wurde durch graue Balken hervorgehoben. Nur die letzte aktive Phase der Tiere wurde ausgewertet. *Tor1b*^(+/-)- und *Tor1b*^(-/-)-Tiere zeigten keine signifikanten Unterschiede zu den Kontrolltieren in X- und Y-Achsenaktivität (B), Aufrichthäufigkeit (C) sowie keine Unterschiede in der Aufenthaltshäufigkeit in der Mitte des Käfigs (D). Auch bei konsumiertem Futter (E) sowie Wasser (F) konnten keine signifikanten Unterschiede beobachtet werden.

Lichtschranken konnte so die Aktivität der Tiere in X-, Y- und Z-Achse (das Aufstellen auf die Hinterpfoten) gemessen werden. Durch diese Datenpunkte konnte die Software zusätzlich die zurückgelegte Strecke der Tiere berechnen. Auch das Verhältnis zwischen Aufenthalt am Rand oder in der Mitte des Käfigs, welches für eine Einschätzung der Ängstlichkeit der Tiere benutzt werden kann

(je ängstlicher die Tiere, desto weniger halten sie sich in der Mitte auf), wurde ermittelt. Zusätzlich wurde die verbrauchte Futter- und Wassermenge durch ein Waagensystem dokumentiert.

Zur Auswertung wurden die Daten der dritten Nacht in der aktivsten Phase der Tiere, in welcher die Tiere sich in den Labmasterkäfigen befanden, herangezogen. Dadurch konnte sichergestellt werden, dass sich die Tiere bereits möglichst gut an die ungewohnte Umgebung akklimatisieren konnten, um Stress als Faktor für abnormes Verhalten minimal zu halten.

Anhand der Abb. 4.2.5A und Abb. 4.2.6 A konnte dies nachvollzogen werden, da die zurückgelegte Strecke der Tiere in den aktiven Phasen (grau hinterlegt) zu Beginn des Versuches um ein Vielfaches höher war, als die Strecke, die die Tiere in der ausgewerteten Phase zurücklegten.

Nach Auswertung der Daten der drei Monate alten Mäuse konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen *Tor1b*^(-/-)-, *Tor1b*^(+/-)- und Kontrolltieren festgestellt werden. So zeigten sich *Tor1b*^(+/-)-Tiere zwar aktiver und *Tor1b*^(-/-)-Tiere phlegmatischer als die Kontrolltiere in ihrer Aktivität in X- und Y-Achsenrichtung (Abb. 4.2.5 B) wenn man die Gesamtanzahl zugrunde legte, allerdings war dies nicht statistisch belegbar. Die Aktivität in Z-Achsenrichtung (Abb. 4.2.5 C) würde diese Annahme unterstützen, allerdings konnte auch hier keine Signifikanz festgestellt werden. Dies traf auch auf die Ängstlichkeit der Tiere zu (Abb. 4.2.5 D). Zu Bemessung dieser wurde der Quotient zwischen der Aufenthaltshäufigkeit der Tiere am Rand des Käfigs mit der Aufenthaltshäufigkeit in dessen Mitte ermittelt. Tiere, welche sich öfters in der Mitte des Käfigs aufhielten, erhielten eine höhere Wertung und konnten dadurch als weniger ängstlich identifiziert werden.

Auch bei konsumiertem Futter (Abb. 4.2.5 E) und Wasser (Abb. 4.2.5 F) konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den verschiedenen Genotypen klassifiziert werden.

Eine Auftrennung der aufgezeichneten Daten zwischen den Geschlechtern konnte ebenfalls keine signifikanten Unterschiede erkennen lassen.

Mit einem zweiten Versuch mit der gleichen Kohorte im Alter von sieben Monaten konnten die Ergebnisse des ersten Versuches repliziert werden. Es konnten weder in der X- und Y-Achsenaktivität (Abb. 4.2.6 B), Z-Achsenaktivität (Abb. 4.2.6 C), Ängstlichkeit (Abb. 4.2.6 D) sowie bei Fress- und Trinkverhalten (Abb. 4.2.6 E und F) signifikante Unterschiede zwischen den Genotypen beobachtet werden. Auch die getrennte Betrachtung der Geschlechter konnte keine signifikanten Differenzen zwischen *Tor1b*^(+/-)-, *Tor1b*^(-/-)- und Kontrolltieren zu Tage fördern.

4.2.3.2 Rotarod

Zur Analyse der motorischen Lern- und Koordinationsfähigkeit wurden die KO- und Kontrolltiere im Alter von fünf Monaten auf dem Rotarod getestet. Die Testreihe bestand aus fünf aufeinanderfolgenden Testtagen mit jeweils zwei Läufen pro Tag. Hierbei wurden die Tiere auf das sich mit 4 rpm drehende Rotarod gesetzt und die Beschleunigung gestartet, wobei sich das Rotarod kontinuierlich über einen Zeitraum von 300 s auf 40 rpm beschleunigte. Es wurde die Latenz bis zum Fall der Tiere gemessen.

Die ersten drei Testtage dienten der Akklimation der Tiere und wurden nicht ausgewertet. Um die Koordinationsfähigkeit zu bestimmen, wurden lediglich die Läufe der letzten beiden Testtage statistisch ausgewertet.

Es zeigten sich bei hetero- und homozygoten Knockout Tieren und den wildtypischen Kontrolltieren eine normale Lernkurve, da alle Tiere sich mit steigender Erfahrung länger auf dem Rotarod halten konnten (Abb. 4.2.7 A).

Auch nach der Akklimation der Tiere traten keine signifikanten Unterschiede in der Zeit bis zum Fall vom Rotarod zwischen den getesteten Genotypen (Abb.4.2.7 B) auf. Weder hetero- noch homozygote KO-Tiere zeigen eine signifikant kürzere Verweildauer auf dem Rotarod, sowohl im Vergleich untereinander, als auch im Vergleich mit den Kontrolltieren. Auch bei einer getrennten Analyse der beiden Geschlechter konnten keine signifikanten Unterschiede beobachtet werden (Abb.

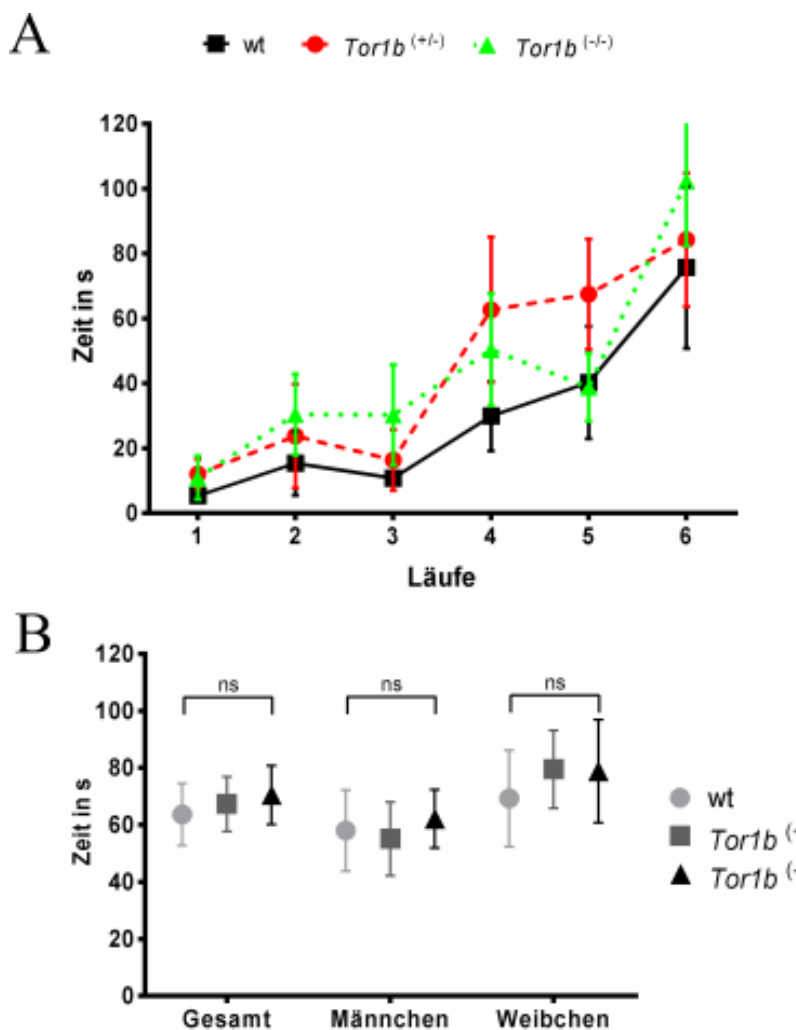


Abb. 4.2.7: Analyse der motorischen Koordination bei TorsinB Knockout Tieren durch das RotaRod

A) Mittelwerte der Verweildauer aller Tiere der verschiedenen Genotypen während der ersten drei Übungstage ergeben eine „Lernkurve“ der Tiere. Alle Genotypen zeigen die Fähigkeit durch Wiederholung ihre Verweildauer auf dem RotaRod zu steigern.

B) Mittlere Verweildauer der Tiere auf dem RotaRod während der zwei Testtage. Es zeigten sich keine signifikant unterschiedlichen Zeiten zwischen Genotypen sowie zwischen den männlichen und weiblichen Tieren.

4.2.7 B). Bei den weiblichen Tieren zeigt sich zwar generell eine größere Latenz bis zum Fall, allerdings ist auch dieses Phänomen nicht signifikant und von den Genotypen unabhängig. Vielmehr scheint es mit der deutlich geringeren Körpermasse der Tiere zusammenzuhängen.

4.2.3.3 CatWalk

Zur Kontrolle des Gangbildes der Tiere, wurde dieses im Alter von sechs Monaten durch das CatWalk-System analysiert. Ein unregelmäßiges Gangbild hätte hierbei auf motorische Defizite der Tiere hinweisen können.

Nach Eingabe der Parameter für die einzelnen Läufe wurden pro Tier mindestens zehn Läufe aufgezeichnet. Nach Analyse des Experimentes konnte eine sehr hohe Varianz in den Geschwindigkeiten der Läufe beobachtet werden (Abb. 4.2.8 A), was der Verwendung wenig

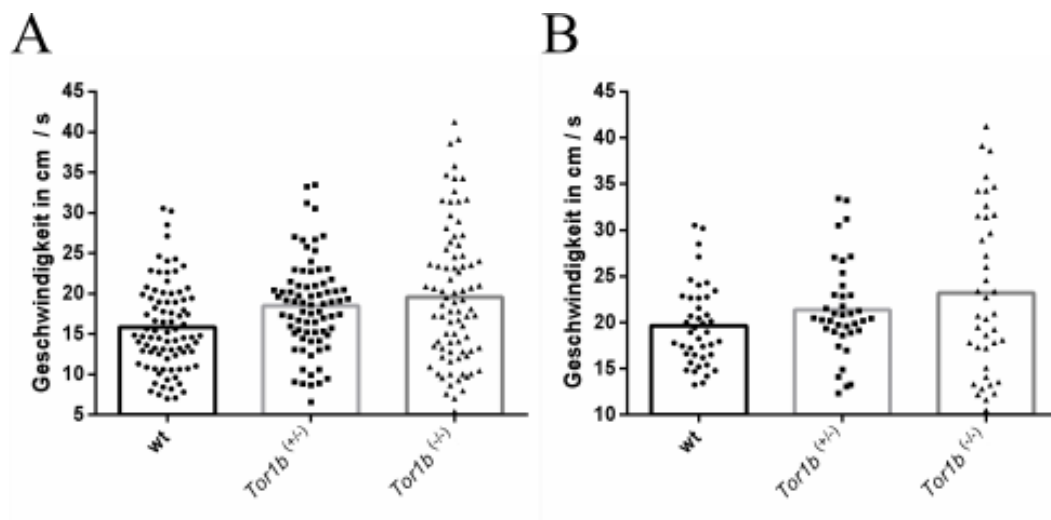


Abb. 4.2.8: Analyse der Laufgeschwindigkeiten

A) Durchschnittliche Laufgeschwindigkeit aller Läufe der jeweiligen Genotypen. Die Balken im Hintergrund repräsentieren den Mittelwert aller Läufe.

B) Durchschnittliche Laufgeschwindigkeit aller Läufe mit einer Geschwindigkeit größer dem Median des individuellen Tieres. Die Balken im Hintergrund repräsentieren den Mittelwert aller Läufe.

restriktiver Parameter geschuldet war. Da die Tiere für die Aufrechthaltung einer hohen Geschwindigkeit während der Durchquerung des CatWalks mehr Konzentration benötigten, wurden nur Läufe mit einer hohen Geschwindigkeit für die weitere Analyse ausgewählt. So konnten putative Beeinträchtigungen der Tiere einfacher erkannt werden. Als Schwellenwert wurde der Median-Wert jedes Tieres gewählt und für die erneute Analyse nur Läufe, welche schneller als der Median des einzelnen Tieres waren, berücksichtigt (Abb. 4.2.8 B). Erstaunlicherweise schien die Verteilung der Durchschnittsgeschwindigkeit bei beiden Analysen vergleichbar zu sein. So zeigten *Tor1b*^(-/-)-Tiere eine

höhere Durchschnittsgeschwindigkeit als *Tor1b*^(-/-)- und Kontrolltiere. Dies konnte auch anhand der Laufdauer (Abb. 4.2.9 A) für die Kontroll- und *Tor1b*^(-/-)-Tiere nachvollzogen werden.

Tor1b^(+/-)-Tiere zeigten jedoch eine deutlich geringere Laufdauer als *Tor1b*^(-/-)-Tiere (Abb. 4.2.9 A), was nicht mit ihrer Durchschnittsgeschwindigkeit übereinstimmte. Diese Abweichungen waren allerdings nicht statistisch signifikant, ebenso wie die Varianz der Laufgeschwindigkeit zwischen den einzelnen Genotypen (Abb. 4.2.9 B).

Auch das Gangbild der Tiere zeigte keinerlei signifikante Abweichungen zwischen *Tor1b*^(+/-)-, *Tor1b*^(-/-)- und Kontrolltieren. Weder in den Schrittlängen der Vorder- und Hinterpfoten (Abb. 4.2.9 C und D), noch in der Breite der Schritte sowohl der Vorder- als auch Hinterpfoten (Abb. 4.2.9 E und D) konnten nachweisbare Differenzen beobachtet werden.

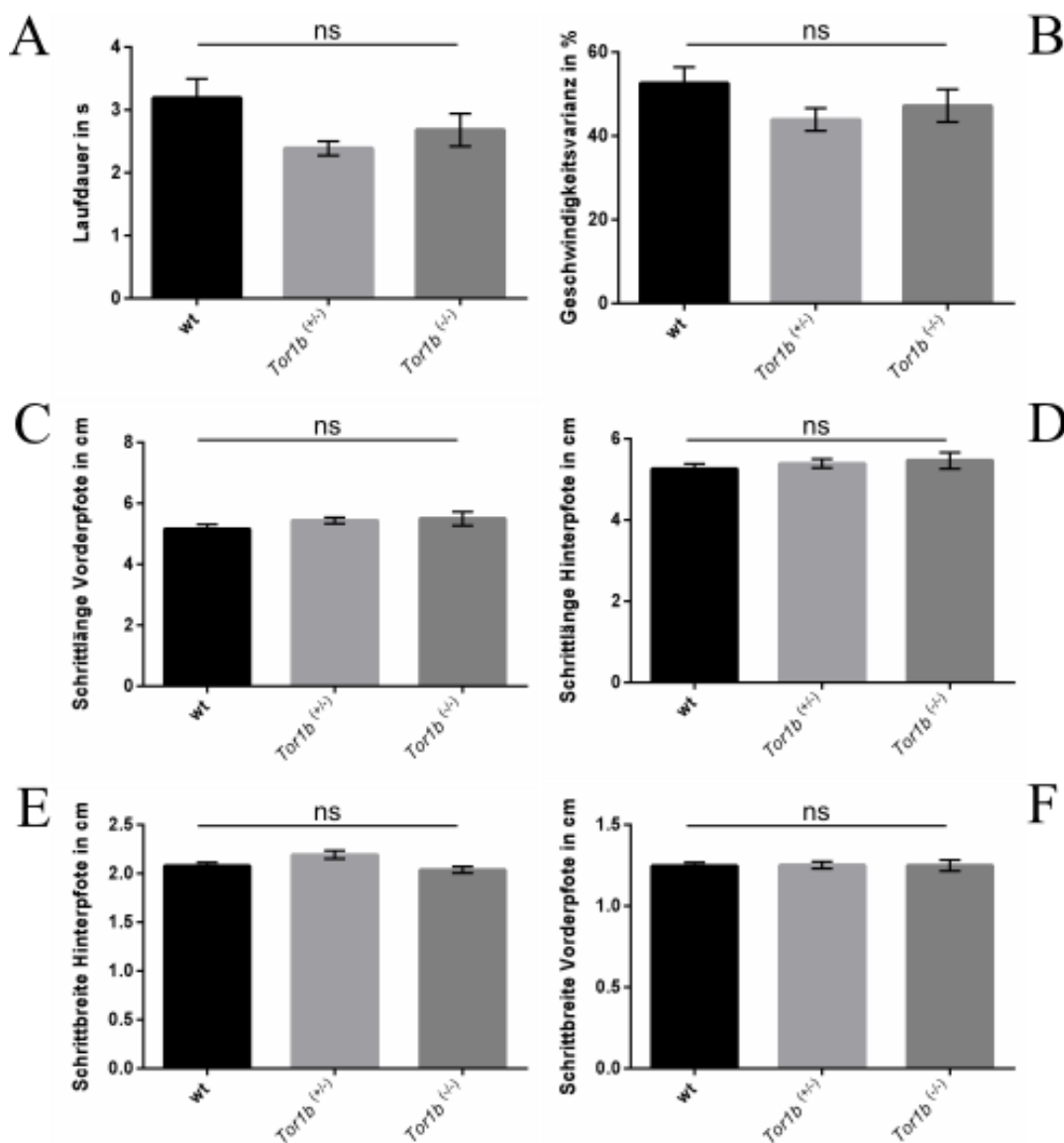


Abb. 4.2.9: Analyse des Gangbildes von Kontroll-, *Tor1b*^(+/-)- und *Tor1b*^(-/-)-Tieren
 Die Laufdauer der Tiere (A) zeigte eine relativ große Varianz, ebenso die Varianz der Geschwindigkeit einzelner Läufe (B), allerdings ohne statistische Signifikanz. Auch das Gangbild zeigte keinerlei statistisch signifikante Differenzen, weder bei der Schrittlänge (C) und Schrittbreite (E) der Vorderpfoten noch bei der Schrittlänge (D) und Schrittbreite (F) der Hinterpfoten.

4.2.4 Elektronenmikroskopische Analyse der TorsinB Knockout Tiere

Aufgrund der bereits bekannten Auffälligkeit der Kernmembran in TorsinA Knockout Mäusen wurde die Kernmembran der *Tor1b*-defizienten Mäusen einer elektronenmikroskopischen Analyse unterzogen. Als zu analysierendes Gewebe wurde Leber und Milz von drei Monate alten Tieren gewählt, da TorsinB in nicht neuronalem Gewebe, besonders in der Milz, mit einem sehr hohen Expressionslevel nachgewiesen werden konnte.

Die Leberzellen der Kontrolltiere zeigten keinerlei auffälligen Veränderungen der Kernmembran (Abb. 4.2.10 A), in den Vergrößerungen kann eine parallel verlaufende Kernmembran ohne Erweiterung des perinukleären Spaltes beobachtet werden (Abb. 4.2.10 B zeigt den weißen Kasten aus Abb. 4.2.10 A). Auch die Kernmembran von Zellen der *Tor1b*^(-/-)-Tiere zeigten auf Übersichtsaufnahmen (Abb. 4.2.10 C) keine offensichtlichen Veränderungen. Allerdings wurden bei Aufnahmen mit größerer Vergrößerung (Abb. 4.2.10 D zeigt den weißen Kasten aus Abb. 4.2.10 C) in einigen Zellen Ausstülpungen der Kernmembran beobachtet werden, welche aus einer Anhäufung einzelner Membranschichten bestanden (Abb. 4.2.10 D, roter Pfeil). Diese Anhäufungen von Membranen erwachsen aus der äußeren Kernmembran und zeigten eine, den aus der Fachliteratur bekannten, „whorls“ (Wirbel) oder „karmellae“ ähnliche Morphologie (Hewett *et al.*, 2000; Snapp *et al.*, 2003), welche bereits in TorsinA Knockout Tieren beobachtet werden konnte (Goodchild *et al.*, 2005b). Die Lokalisation dieser „whorls“ beschränkte sich allerdings nicht auf die Proximität der Kernmembran bzw. des ERs, sondern konnte des Weiteren auch im Golgi-Apparat (GA) (Abb. 4.2.10 E, rote Pfeile) sowie frei im Zytoplasma (Abb. 4.2.10 F, rote Pfeile) nachgewiesen werden. Eine abnorme Erweiterung des perinukleären Spaltes durch Ausstülpung der äußeren Kernmembran konnte nicht beobachtet werden.

Auch in Zellen der Milz konnte dieses Phänomen beobachtet werden. Wildtypische Zellen zeigten keinerlei Auffälligkeiten ihrer Kernmembran oder die Formation membranöser Körperchen (Abb. 4.2.11 A und B, Abb. 4.2.11 B zeigt den weißen Kasten aus Abb. 4.2.11 A), während in Zellen aus *Tor1b*^(-/-)-Tiere eine Bildung von „whorls“ beobachtet werden konnte (Abb. 4.2.11 C und D, Abb. 4.2.11 D zeigt den weißen Kasten aus Abb. 4.2.11 C). Als Ausgangspunkt der Bildung dieser „whorls“ konnte die äußere Kernmembran identifiziert werden (Abb. 4.2.11 E und F), wobei sich mehrere Membranen sehr eng aneinanderlagerten, was vermutlich der Beginn der „whorl“-Bildung darstellte. In den Zellen der Milz konnte allerdings keine Lokalisation dieser Strukturen im GA oder gar im Zytoplasma beobachtet werden.

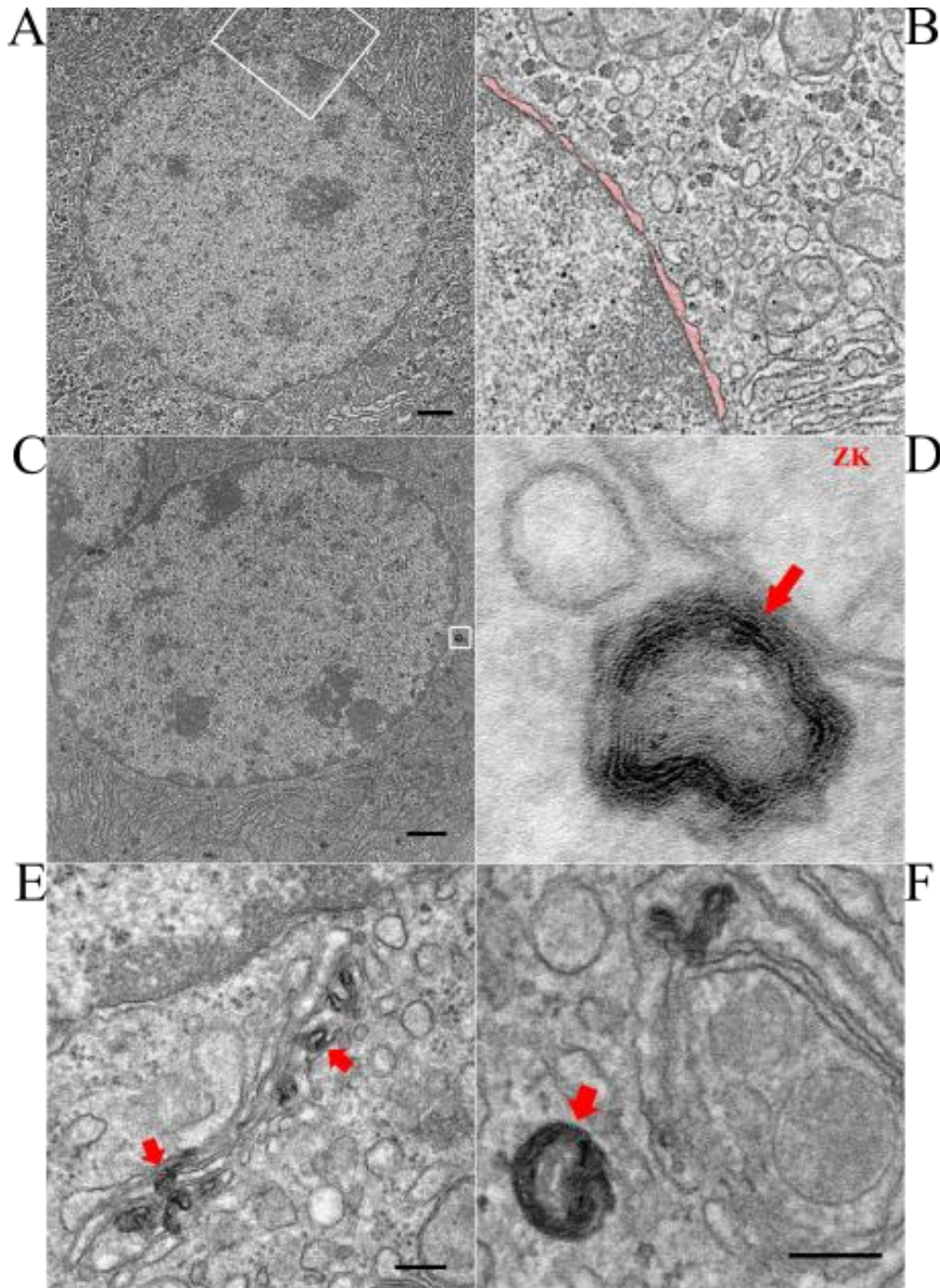


Abb. 4.2.10: Elektronenmikroskopische Analyse der Leber

A) Repräsentatives Übersichtsbild des Zellkerns einer Leberzelle aus einem Kontrolltier. Maßstabsbalken = 1 Åm.

B) Vergrößerung der Zellkernmembran aus Abb. A (weißer Kasten). Der perinukleäre Spalt zwischen den Zellkernmembranen wurde rosa eingefärbt.

C) Repräsentatives Übersichtsbild des Zellkerns einer Leberzelle aus einem *Tor1b*^(-/-)-Tier. Maßstabsbalken = 1 Åm.

D) Vergrößerung der Zellkernmembran aus Abb. C (weißer Kasten). Die Kernmembran zeigt eine Anhäufung mehrerer Membranschichten (roter Pfeil). ZK = Zellkern.

E) Repräsentatives Übersichtsbild des Golgiapparates einer Leberzelle aus einem *Tor1b*^(-/-)-Tier. Im GA konnten mehrere „whorls“ beobachtet werden (rote Pfeile). Maßstabsbalken = 0,2 Åm.

F) Repräsentatives Übersichtsbild des Zytoplasmas einer Leberzelle aus einem *Tor1b*^(-/-)-Tier. Im Zytoplasma konnten ebenfalls „whorls“ beobachtet werden (roter Pfeil). Maßstabsbalken = 0,2 Åm.

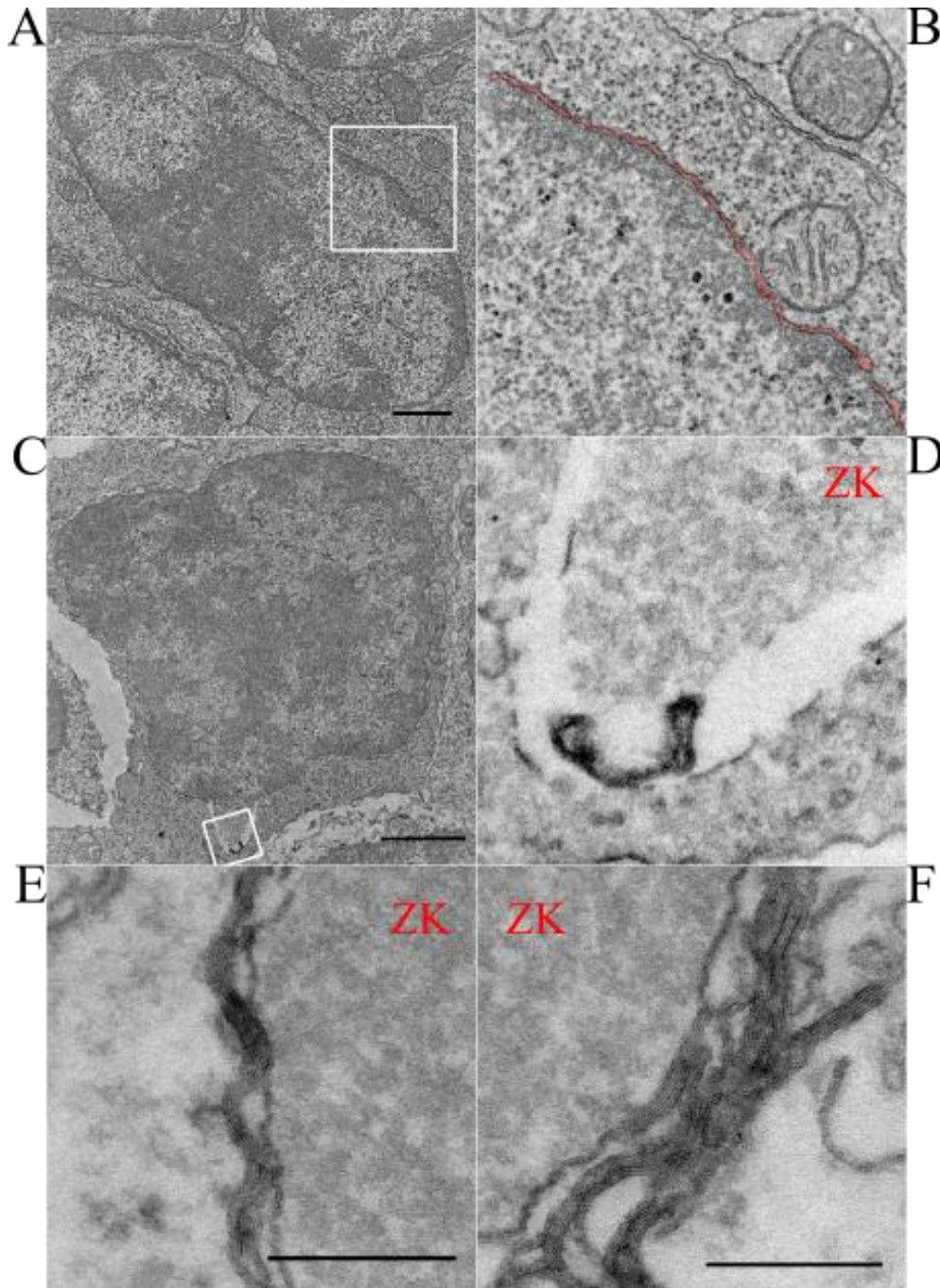


Abb. 4.2.11: Elektronenmikroskopische Analyse der Milz

A) Repräsentatives Übersichtsbild des Zellkerns einer Milzzelle aus einem Kontrolltier. Maßstabsbalken = 1 Åm.

B) Vergrößerung der Zellkernmembran aus Abb. A (weißer Kasten). Der perinukleäre Spalt zwischen den Zellkernmembranen wurde rosa eingefärbt.

C) Repräsentatives Übersichtsbild des Zellkerns einer Milzzelle eines *Tor1b*^(-/-)-Tieres. Maßstabsbalken = 1 Åm.

D) Vergrößerung der Zellkernmembran aus Abb. C (weißer Kasten). Die Kernmembran zeigt eine Anhäufung mehrerer Membranschichten und einen erweiterten perinukleären Spalt. ZK = Zellkern.

E) Vergrößerung der Zellkernmembran einer Milzzelle eines *Tor1b*^(-/-)-Tieres. Es konnte eine parallele Anhäufung mehrerer Membranen beobachtet werden. Maßstabsbalken = 0,2 Åm. ZK = Zellkern.

F) Vergrößerung der Zellkernmembran einer Milzzelle eines *Tor1b*^(-/-)-Tieres. Es konnte eine parallele Anhäufung mehrerer Membranen beobachtet werden. Maßstabsbalken = 0,2 Åm. ZK = Zellkern.

4.3 Funktion von TorsinA im sich entwickelnden Nervensystem

Die Funktion von TorsinA konnte auf Grund seiner strukturellen Zugehörigkeit zur Klasse der AAA+ ATPasen (ATPases Associated with different cellular Activities) noch nicht vollständig geklärt werden, da diese, wie der Name treffend beschreibt, in vielen verschiedenen Bereichen des Organismus eingreifen können. In dieser Arbeit wurde der Schwerpunkt auf den Einfluss von TorsinA auf das Wachstum neuronaler und Neuronen-ähnlicher Zellen gelegt. Bereits veröffentlichte Ergebnisse in verschiedenen untersuchten Zellsystemen zeigen einen Einfluss von TorsinA auf das Wachstum neuronaler Zellen, allerdings wurden in verschiedenen Arbeiten widersprüchliche Ergebnisse erlangt (Ferrari Toninelli *et al.*, 2003; Hewett *et al.*, 2006). Aufbauend auf diesen Ergebnissen sollte mit zwei verschiedenen Systemen die Rolle von TorsinA abschließend geklärt werden.

4.3.1 Überexpression von TorsinA in PC6-3 Zellen

PC6-3 Zellen sind eine Sublinie der PC12 Zellen, welche sehr gut auf NGF (Nerve Growth Factor) ansprechen und durch Behandlung mit diesem einen Neuronen-ähnlichen Phänotypen entwickeln (Pittman *et al.*, 1993). Die PC12 Zelllinie wurde aus einem Phäochromozytom, einem Tumor des Nebennierenmarkes, gewonnen. Dessen Abstammung aus Zellen der Neuralleiste ermöglicht die Differenzierung der Zellen mit NGF, welches unter anderem auch zum Auswachsen von Neuriten führt.

4.3.2 Funktionskontrolle der PC6-3 Zellen

Die in dieser Arbeit verwendeten Zellen wurden mit humanem TorsinA stabil transfiziert, welches unter Kontrolle eines Tetracyclin induzierbaren Promotors steht. Neben dem wildtypischen TorsinA wurde auch eine Zelllinie generiert, welche TorsinA ΔE konditional exprimiert (Gonzalez-Alegre *et al.*, 2004). Ursprünglich zur Analyse der Lokalisation von TorsinA innerhalb der Zellen generiert, wurde nun der Einfluss von TorsinA auf das Auswachsen der Neuriten in dieser Zelllinie untersucht.

Da die ursprüngliche Beobachtungen der Zellen eine Relokalisation des TorsinA ΔE zur Zellkernmembran beschreibt, wurden Immunfluoreszenzfärbungen gegen TorsinA in den PC6-3 Zellen durchgeführt um sicherzustellen, dass die verwendeten Zellen noch mit den zuvor beschriebenen Zellen identisch sind. Zusätzlich wurden die Zellen wie in der Originalpublikation mit 100 ng NGF pro ml Medium differenziert. Um das Auswachsen der Neuriten sichtbar zu machen, wurden die Zellen mit dem Neurite Outgrowth Stain behandelt, welches die Zellmembran färbt (Abb. 4.3.1 A). TorsinA findet sich wie beschrieben im Zytoplasma der induzierten PC6-3 Zellen, vergleichbar in den Kontrollen, wobei in diesen die Färbung aufgrund des fehlenden induzierten humanen TorsinA schwächer ist. In TorsinA ΔE exprimierenden Zellen zeigt sich ebenso eine schwache zytoplasmatische Färbung sowie

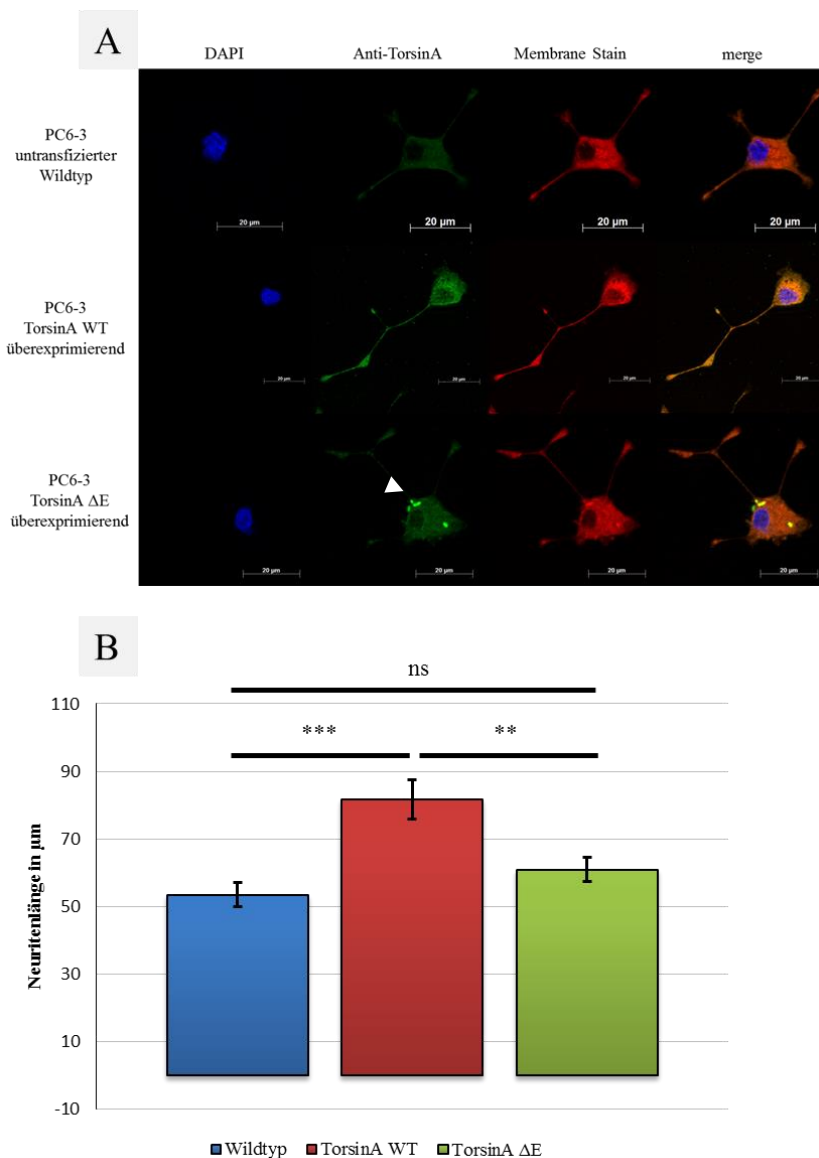


Abb. 4.3.1 Einfluss von TorsinA auf das Neuritenwachstum von PC6-3 Zellen

A) Immunfluoreszenzfärbung wildtypischer und TorsinA überexprimierender PC6-3 Zellen mit Anti-TorsinA Antikörper (grün) und dem Farbstoff Membrane stain, welcher die Zellmembran anfärbt (rot). Alle Zellen wurden 72h durch Zugabe von Doxycyclin und NGF differenziert. Die Überexpression von TorsinA WT führt zu einer stärkeren diffusen Färbung des Zytoplasmas, während es bei TorsinA ΔE zu einer Akkumulation an der Zellkernmembran führt (weißer Pfeil). Maßstabsbalken 20 μm .

B) Gemessene Neuritenlängen der PC6-3 Zellen, $n = 60$. Wildtyp gegen TorsinA WT: $p = 0,003$; Wildtyp gegen TorsinA ΔE : $p = 0,839$; TorsinA WT gegen TorsinA ΔE : $p = 0,006$.

die beschriebene auffällige Akkumulation von TorsinA an der Zellkernmembran. Zusätzlich zur funktionellen Bestätigung der TorsinA Expression konnte die Differenzierbarkeit der PC6-3 Zellen durch das Auswachsen der Neuriten beobachtet werden.

4.3.3 Einfluss von überexprimiertem TorsinA auf die Neuritenlänge

Um die Länge der auswachsenden Neuriten zu messen, wurden die Zellen auf 12 mm Deckgläschen, welche sich in 24-Well-Schalen befanden, ausgesät, differenziert, mit Membrane stain gefärbt und anschließend unter dem Mikroskop aufgenommen. Diese Bilder wurden mit dem ImageJ-Plug-In „NeuronJ“ ausgewertet. Dieses Plug-In ermöglicht eine genaue Messung der Neuritenlänge ausgehend vom Zellkern. Um die verschiedenen Zelllinien möglichst exakt untereinander vergleichen zu können, wurden strikte Rahmenbedingungen gewählt. So wurden in jedem Experiment 20.000 Zellen aller drei Linien in einer 24-Well-Schale ausplattiert und jeweils gleichzeitig das Medium, NGF und Doxycyclin erneuert. Nach der Durchführung der Experimente in drei Replikaten, wurden die Ergebnisse statistisch ausgewertet (Abb. 4.3.1 B). Es konnte beobachtet werden, dass in PC6-3 Zellen, welche humanes TorsinA überexprimieren, im Vergleich zu Zellen ohne Überexpression oder Zellen welche TorsinA ΔE überexprimieren, signifikant längere Neuriten auswachsen. Die Überexpression von TorsinA mit ΔE -Mutation hingegen führt zu keinen signifikant längeren Neuriten gegenüber den nicht exprimierenden Zellen.

Um die Beobachtung, dass die Expression von TorsinA einen Einfluss auf die Neuritenlänge ausübt weiter zu untersuchen, wurden die Flächen der Wachstumskegel an der Spitze der Neuriten verglichen, da ein größerer Wachstumskegel auf ein erhöhtes Wachstum von Neuriten schließen lässt. Die Zellen wurden erneut ausplattiert und differenziert und mit Phalloidin konjugiertem TexasRED-Farbstoff gefärbt (Abb. 4.3.2 A). Das Toxin Phalloidin bindet irreversibel an Actin, welches der Hauptbaustein des Wachstumskegels darstellt. Dies ermöglicht eine exakte Auswertung der Wachstumskegelfläche mit ImageJ (Abb. 4.3.2 B). Die Überexpression von TorsinA führt zu einer signifikant größeren Wachstumskegelfläche als in nicht überexprimierenden Zellen und Zellen, welche TorsinA ΔE überexprimieren. Im Gegensatz zur Neuritenlänge führt die Überexpression von TorsinA ΔE auch zu einer signifikant größeren Wachstumskegelfläche im Vergleich zu nicht überexprimierenden Zellen.

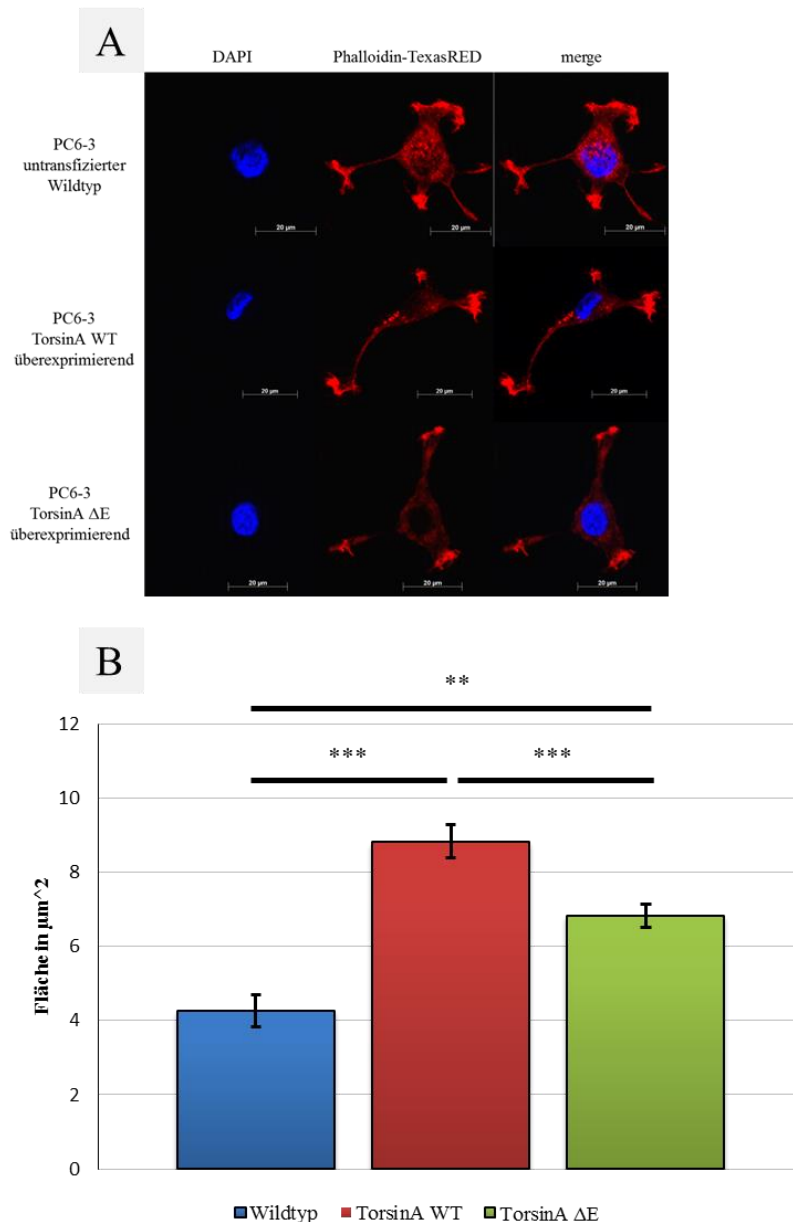


Abb. 4.3.2 Einfluss von TorsinA auf den Wachstumskegel von PC6-3 Zellen

A) Fluoreszenzfärbung der Wachstumskegel in wildtypischen und TorsinA überexprimierenden Zellen durch Phalloidin-TexasRED. Alle Zellen wurden 72h durch Zugabe von Doxycyclin und NGF differenziert.

Maßstabsbalken 20 μm .

B) Gemessene Fläche der Wachstumskegel in μm^2 , $n = 60$. Wildtyp gegen TorsinA WT: $p < 0,001$; Wildtyp gegen TorsinA: ΔE $p < 0,001$; TorsinA WT gegen TorsinA ΔE : $p = 0,001$.

4.3.4 Einfluss des TorsinA Knockout auf die Dendritenlänge

Als weiteres Modell zur Untersuchung des Einflusses von TorsinA auf die Neuritenlänge wurden Experimente mit primären Neuronenkulturen aus dem Hippocampus von TorsinA KO-Tieren durchgeführt. Dieses Modell erlaubte eine exaktere Untersuchung der Funktion von TorsinA *in vivo*.

Neben den generellen Schwierigkeiten der Zellkultur mit primären Neuronen waren in diesen Versuchen besonders die Anzahl der ausplattierten Zellen ein entscheidender Faktor. Eine zu hohe Konfluenz der Zellen führt zur Bildung von Synapsen, wodurch die involvierten Dendriten ihr Wachstum frühzeitig

einstellen. Um dies zu verhindern, wurden die Zellen vor dem Ausplattieren auf 12 mm Glasplättchen in einer Zählkammer gezählt und je 2.500 Zellen ausplattiert. Es wurde keine Unterscheidung zwischen Neuronen und Gliazellen durchgeführt, alle Experimente wurden in gemischten Kulturen durchgeführt. Nach fünf Tagen in Kultur wurden die Zellen fixiert, permeabilisiert und eine Immunfluoreszenzfärbung gegen MAP2 und TAU-Proteine durchgeführt. MAP2 diente hierbei zur Identifikation von Dendriten, während die Färbung gegen TAU-Proteine zur spezifischen Färbung von Axonen eingesetzt wurde. Am Mikroskop wurden die Neurone ausgewählt und aufgenommen, welche ohne Bildung von Synapsen mit benachbarten Zellen kultiviert wurden (Abb. 4.3.3 A). Die Dendritenlängen wurden durch das ImageJ-Plug-In NeuronJ gemessen und nach Durchführung von drei Replikaten statistisch ausgewertet (Abb. 4.3.3 B). In den kultivierten Neuronen, welche aus TorsinA KO-Tieren gewonnen wurden, wurden im Vergleich zu Neuronen aus Kontrolltieren signifikant kürzere Dendriten gemessen. Dieses Phänomen konnte sowohl in heterozygoten als auch homozygoten KO-Tieren beobachtet werden, bei einem Vergleich der Dendritenlängen der beiden Genotypen untereinander konnte allerdings kein signifikanter Unterschied gemessen werden.

Neben der Länge der Dendriten wurde zusätzlich noch die Anzahl der ausgewachsenen Dendriten erfasst, sodass die durchschnittliche Dendritenlänge eines Neurons gegen die Anzahl der ausgewachsenen Dendriten in einem Wolkendiagramm visualisiert werden konnte (Abb. 4.3.3 C). Dadurch konnte eine Korrelation der beiden Parameter sichtbar gemacht werden, da mit abnehmender Länge der Dendriten deren Anzahl ansteigt.

Um diese Hypothese noch weiter zu untersuchen und unter Umständen eine weitere Korrelation mit dem Genotyp sichtbar zu machen, wurde eine multivariante lineare Regressionsanalyse durchgeführt. Hierbei wurde die Länge der Dendriten (Zielvariable) als eine Funktion (im mathematischen Sinne) des Genotyps und der Anzahl der Dendriten (Einflussvariablen) als Grundlage. Nach dem Erstellen der Regressionsgerade konnten die Korrelationskoeffizienten der Einflussvariablen ermittelt werden. So zeigte sich eine negative Korrelation der Anzahl der Dendriten (Korrelationskoeffizient $r = -0,48$) und der Länge der Dendriten, sowie eine ebenfalls eine negative Korrelation des Genotyps mit der Länge der Dendriten ($r = -0,1232$). Diese Werte konnten durch einen t-Test in einem p -Wert ausgedrückt werden. Für die Abhängigkeit der Dendritenlänge von der Anzahl der Dendriten wurde ein p von 0,01 berechnet, für die Abhängigkeit der Dendritenlänge vom Genotyp ein p von 0,02. So konnte ein statistisch signifikanter Zusammenhang der Dendritenlänge zu der Anzahl der Dendriten und des Genotyps bewiesen werden.

Zusätzlich zeigte der Interaktionseffekt der beiden Einflussvariablen keine Signifikanz ($p = 0,34$) zueinander. Dies bestätigte die Annahme, dass die Dendritenlänge auch unabhängig des Genotyps mit der Anzahl der Dendriten korreliert. Somit könnte der Knockout von TorsinA einen verstärkenden Effekt auf ein konserviertes biologisches Phänomen darstellen.

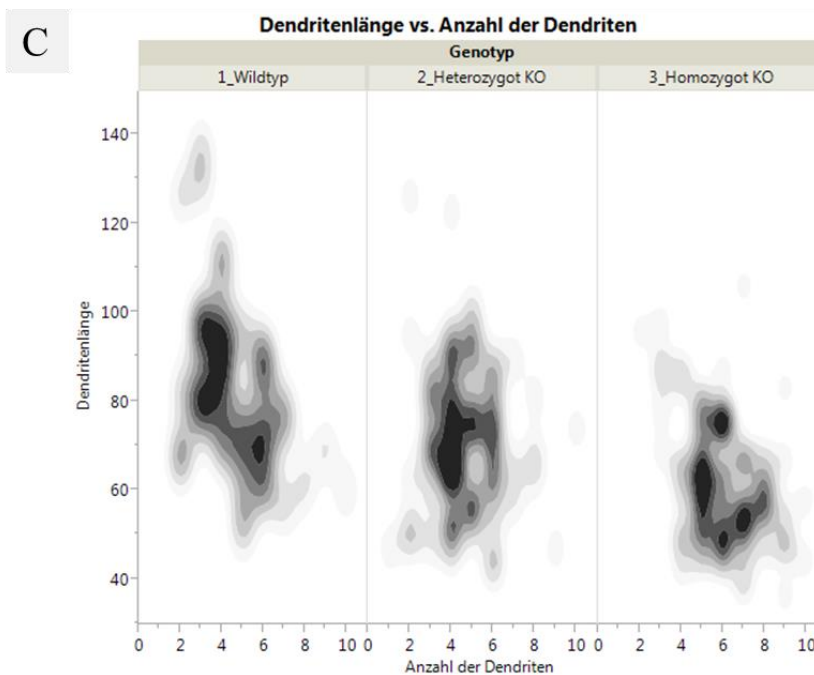
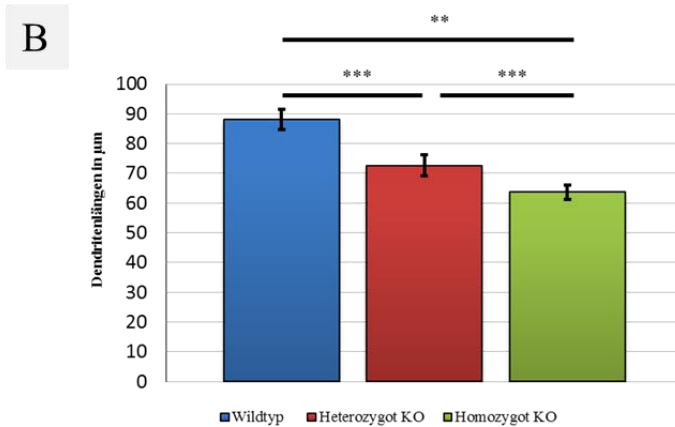
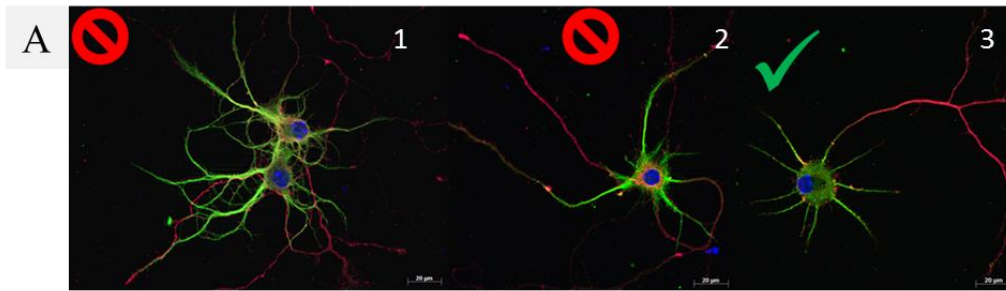


Abb. 4.3.3 Einfluss von TorsinA auf das Dendritenwachstum in hippocampalen Neuronenkulturen

A) Repräsentative Immunfluoreszenzfärbungen von hippocampalen Neuronen gegen MAP2 (grün), TAU (rot) und DAPI (blau). Nur Bild 3 könnte für die Messung der Dendritenlänge benutzt werden, da in sich Bild 1 Dendriten berühren oder in Bild 2 Dendriten mit dem eigenen Axon Autapsen bilden. Maßstabsbalken 20 μm.

B) Messung der Dendritenlängen bei 96h gewachsenen hippocampalen Neuronen, $n = 60$. Wildtyp gegen TorsinA^(+/-): $p = 0,0041$; Wildtyp gegen TorsinA^(-/-): $p < 0,001$; TorsinA^(+/-) gegen TorsinA^(-/-): $p = 0,0031$.

C) Darstellung der Dendritenlänge gegen die Anzahl der Dendriten pro Genotyp als Wolkendiagramm.

5 Diskussion

5.1 Generierung und Phänotypisierung eines Mausmodells zur Rettung des TorsinA Knockout Phänotyps

5.1.1 Generierung des Mausmodells

Dystonien gehören zu den häufigsten neurologischen Bewegungsstörungen, darunter auch die DYT1-Dystonie, welche als eine schwer verlaufende Form gilt. Bereits 1997 konnte die Deletion einer Glutaminsäure im Gen *TOR1A* als Auslöser der Krankheit identifiziert werden (Ozelius *et al.*, 1997). Allerdings konnte bis zum heutigen Tage keine exakte Korrelation zwischen dieser Mutation und dem Phänotypen der Krankheit gefunden werden. Um Erkenntnisse zur Pathogenese zu erhalten dienen hierbei, verschiedene Mausmodelle als wichtige Forschungsgrundlagen. Daher wurden schon zahlreiche Modelle für verschiedene Fragestellungen generiert, zunächst mit dem Ziel den Krankheitsverlauf zu replizieren. Dies ist bisher für die meisten Modelle nicht gelungen. Dennoch weisen viele Modelle wichtige pathologische Charakteristika auf, die es erlauben, Teilaspekte der Erkrankungen an Ihnen zu untersuchen (Dang *et al.*, 2005a; Goodchild *et al.*, 2005b; Grundmann *et al.*, 2012b; Grundmann *et al.*, 2007; Liang *et al.*, 2014; Pappas *et al.*, 2015; Shashidharan *et al.*, 2005; Tanabe *et al.*, 2012; Yokoi *et al.*, 2011; Yokoi *et al.*, 2008).

In mehreren Modellen teils starke pathologische Effekte gefunden werden. So führte der Knockout eines *Tor1a*-Allels zu keinen Auffälligkeiten in den Mäusen, während der Knockout beider Allele zum Tod der Tiere spätestens 24 h nach ihrer Geburt führte. Des Weiteren konnten verschiedene Auffälligkeiten der Kernmembran beobachtet werden. Diese zeigten einen erweiterten perinukleären Spalt sowie eine große Anzahl von Vesikeln, welche vermutlich von der inneren Kernmembran abgeschnürt wurden. Das ER wiederum zeigte keine Auffälligkeiten, genau wie alle untersuchten *Tor1a*^(+/-)-Tiere. Die Veränderungen der Kernmembran wurden als mögliche Ursache für das frühe Versterben der Tiere und als putativer pathogener Mechanismus für die DYT1-Dystonie verantwortlich gemacht (Goodchild *et al.*, 2005b).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde nun ein weiteres Modell durch Einkreuzung des humanen TorsinA-Proteins in den murinen Knockout-Hintergrund generiert. Hierbei spricht man von einem sog. Humanisierten Modell. Diese Modelle entsprechen normalerweise der Situation im Menschen, indem kein murines Homolog des Zielproteins mehr exprimiert wird, sondern nur noch das menschliche Protein, meist mit seinen krankheitsverursachenden Mutationen. Diese Modelle gibt es bereits für eine Reihe unterschiedlicher Krankheiten, z. B. Chorea Huntington. Hier wurde ein möglichst menschliches Modell für präklinische Studien zur Abschaltung des mutanten *HTT*-Gens benötigt. Da *HTT* in seiner wildtypischen Form essentiell für die Gesundheit der Neuronen ist, wäre eine Abschaltung des ganzen

Gens keine befriedigende Lösung. Daher wird versucht spezielle Sequenzen außerhalb der CAG/CAA-Wiederholungen, z.B. im *HTT*-Promotor als Ziel zu wählen, was eine komplette Substitution von *Hdh* notwendig macht. In diesem Modell wurde daher durch Kreuzungen verschiedener Ratten das murine Huntingtin-Gen *Hdh* durch eine Kopie des kompletten *HTT*-Gens, sowie einer Kopie von *HTT* mit 97 CAG/CAA-Wiederholungen ersetzt. So wurde ein heterozygoter Hintergrund, wie er in Patienten vorkommt, generiert (Southwell *et al.*, 2013; Yu-Taeger *et al.*, 2012). Auch für die spinocerebelläre Ataxie Typ 3 wurde ein humanisiertes Modell generiert, wobei hier die Untersuchung der Pathogenese sowie die Möglichkeit zur Patienten-nahen Testung von Therapien um Vordergrund standen (Switonski *et al.*, 2015).

Dass in dieser Arbeit generierte Modell basiert zwar auf der gleichen Methodik, allerdings unterscheiden sich die Zielsetzung der Arbeit von den genannten Beispielen, der Schwerpunkt lag hierbei mehr auf der Funktion des TorsinA-Proteins. So sollte die starke Homologie des humanen zum murinen TorsinA ausgenutzt werden um eine putative Kompensation der Funktion zu untersuchen. Durch die Verwendung des mPrP-Promotors unterscheidet sich dieses Modell von den zitierten Modellen, da diese neben dem humanen Protein zusätzlich auch den passenden humanen Promotor besitzen. Dies schafft allerdings eine interessante Ausgangssituation, da dadurch TorsinA ein anderes zeitliches und räumliches Expressionsmuster bekommt. Dadurch ergibt sich folgende Zielsetzung für die Untersuchung dieses Mausmodells:

1. Kann die Expression von *TORIA* die *Tor1a*^(-/-)-Mäuse vor einem frühen Versterben retten?
2. Reicht diese Expression aus um phänotypisch gesunde Tiere zu generieren?
3. Können durch die Benutzung des mPrP-Promotors spezifische Gehirnregionen identifiziert werden, in denen die Expression von TorsinA besonders wichtig ist?
4. Können durch die Expression von *TORIA* die in *Tor1a*^(-/-)-Tieren beobachteten Kernmembran-auffälligkeiten verhindert werden?

Zur Generierung dieser „Rescue-Tiere“ wurden heterozygote TorsinA Knockout Mäuse mit Tieren, die das humane TorsinA als Transgen exprimieren, gekreuzt (Abb. 4.1.1). Da die *Tor1a*^(-/-) / *TORIA*-Tiere 24 h und länger überlebten, kann von einer Rettung des letalen *Tor1a*^(-/-) Phänotyps ausgegangen werden. Des Weiteren zeigten die Tiere keinen auffälligen Phänotyp, Schwierigkeiten bei der Fortpflanzung, erhöhte Anfälligkeit für Krankheiten oder eine verkürzte Lebensspanne.

Die zeitlich und räumlich begrenzte Expression von humanem TorsinA durch den mPrP Promotor reicht aus, um eine Überlebensfähigkeit der Tiere sicherzustellen. Dies deckt sich mit bisherigen Ergebnissen in Nagern, wonach die Expression von TorsinA vor der Geburt stark ansteigt, und TorsinA demnach

eine wichtige Funktion während dieses Zeitraumes übernimmt (siehe Kap. 1.3.3.2) (Vasudevan *et al.*, 2006; Xiao *et al.*, 2004). Dieser Expressionszeitraum konnte durch die Verwendung des mPrP-Promotors imitiert werden, da dieser ab Tag 12,5 der Embryonalentwicklung aktiv wird (Asante *et al.*, 2002).

Neben den Kontrolltieren wurden in allen Experimenten auch *Tor1a*^(+/-) / *TORIA*-Tiere einbezogen, um einen Einfluss der Überexpression von humanem TorsinA auf die phänotypisch normalen heterozygoten Knockout Tiere zu untersuchen.

5.1.2 Kontrolle der TorsinA Expression

Neben der Kontrolle des Genotyps der „Rescue-Mäuse“ durch PCR wurde die Expression von TorsinA in verschiedenen Gehirnregionen durch Western Blot analysiert. Da bei der Generierung der transgenen TorsinA Tiere das humane TorsinA mit einem V5-Tag kombiniert wurde, konnte die Expression des transgenen TorsinA in den „Rescue-Tieren“ getrennt von der Expression des endogenen TorsinA detektiert werden. Interessanterweise konnte der zur Detektion des endogenen TorsinA eingesetzte Antikörper von Abcam im Western Blot nur murines TorsinA detektieren (Abb. 4.1.3 A). Die Detektion des humanen TorsinA mit dem Anti-V5-Tag-Antikörper hingegen zeigte in *Tor1a*^(+/-) / *TORIA*- und *Tor1a*^(-/-) / *TORIA*-Tieren eine deutlich sichtbare Bande bei 40 kDa, während in wildtypischen Tieren kein humanes TorsinA detektiert werden konnte. Die erhöhte molekulare Masse des humanen TorsinA ist durch den V5-Tag bedingt.

Das Signal des humanen TorsinAs zeigte in *Tor1a*^(-/-) / *TORIA*-Tieren ein deutlich schwächeres Signal als in den *Tor1a*^(+/-) / *TORIA*-Tieren. Hieraus ergibt sich die Frage nach dem Einfluss des endogenen TorsinA auf das Expressionslevel des transgenen TorsinA. Es konnte ein Zusammenhang zwischen der Anzahl der Allele murinen TorsinAs mit dem Expressionslevel des humanen TorsinA Proteins unter Kontrolle des exogenen mPrP Promotors beobachtet werden. So zeigte sich in transgenen Tiere (zwei endogene Allele) eine stärkere Expression des humanen TorsinA als in *Tor1a*^(+/-) / *TORIA*-Tieren, in welchen wiederum eine Expression stärkere als in *Tor1a*^(-/-) / *TORIA*-Tiere beobachtet werden konnte (Abb. 4.1.4). Diese Beobachtung konnte auch in Proteinlysaten innerer Organe erneut gezeigt werden (Abb. 4.1.5 A).

Dieses Phänomen wurde bisher noch nicht beschrieben und erlaubt Raum für verschiedene Erklärungen. So könnte murines TorsinA einen stabilisierenden Einfluss auf das exogene humane TorsinA ausüben. Auch könnte die höhere Expression des murinen TorsinAs durch 2 aktive Allele zu einer höheren Anzahl muriner TorsinA-Proteine im Vergleich zu humaner TorsinA-Proteine in TorsinA Hexameren führen. TorsinA Hexamere wurden bereits in verschiedenen Quellen beschrieben (Jungwirth *et al.*, 2010; Vander Heyden *et al.*, 2009; Zhao *et al.*, 2013). Proteine der AAA+-Familie, zu welcher auch die Torsine gezählt werden, benötigen für eine funktionierende ATPase-Fähigkeit eine Homohexamerformation (Barnett *et al.*, 2000; Hanson *et al.*, 2005). Auch konnte bereits ein Zusammenhang zwischen der ΔE

Mutation und einer verringerten Stabilität der TorsinA Hexamere nachgewiesen werden (Jungwirth *et al.*, 2010; Li *et al.*, 2014). Diese Instabilität könnte nicht nur den Homohexamerkomplex aus TorsinA betreffen, sondern auch weitere Proteine, die an diesen Komplex binden um mit ihm zu interagieren (Li *et al.*, 2014; Zhao *et al.*, 2013).

Es wäre vorstellbar, dass durch die Inkorporation des humanen TorsinA in die murinen Homohexamere diese, ähnlich wie bei TorsinA-ΔE, an Stabilität verlieren. Durch die abnehmende Menge an endogenem TorsinA in *Tor1a*^(+/-) / *TORIA*- und *Tor1a*^(-/-) / *TORIA*-Tieren könnte die dadurch erhöhte Menge an humane TorsinA in den Hexameren zu einer größeren Instabilität und so zum Zerfall der Hexamere führen.

Dies könnte die Degradation des monomeren humanen TorsinA nach sich ziehen, wodurch das niedrigere Expressionslevel erklärt werden könnte. So konnte gezeigt werden, dass die ΔE Mutation von TorsinA zu einer Aktivierung des proteasomalen Abbauwegs, neben der Makroautophagie, führt (siehe Kap. 1.3.3.4) (Giles *et al.*, 2008; Giles *et al.*, 2009; Gordon *et al.*, 2008). Um zu untersuchen ob dieser effektiveren Abbau von TorsinA ΔE könnte ebenfalls auf das transgene humane TorsinA zutreffen könnte wären weitere Experimente nötig. Um herauszufinden, ob der proteasomale Abbauweg oder Autophagie in *Tor1a*^(+/-) / *TORIA*- und *Tor1a*^(-/-) / *TORIA*-Tieren aktiviert sind könnten durch Western Blot Analysen von Proteinlysaten dieser Tiere die Expressionslevel der Proteasomuntereinheit 20S (Saeki *et al.*, 2012) sowie LC3-II (einem Marker für Autophagie (Tanida *et al.*, 2008)) untersucht werden.

5.1.3 Phänotypische Charakterisierung der „Rescue-Tiere“

. Zum besseren Verständnis der DYT1-Dystonie wurden bereits mehrere Tiermodelle generiert, darunter auch die TorsinA Knockout Mäuse und Mäuse, welche das humane TorsinA überexprimieren. Diese Tiermodelle bildeten die Grundlagen der für diese Arbeit generierten „Rescue-Mäuse“. Im Gegensatz zu den Patienten zeigte keines der ursprünglichen Modelle einen dystonen Phänotyp. Humanes TorsinA überexprimierende Mäuse zeigten Hypoaktivität und verminderte motorische Kontrolle (Grundmann *et al.*, 2007). Da homozygote TorsinA Knockout Tiere schon kurz nach der Geburt verstarben konnte keine phänotypische Charakterisierung durchgeführt werden (Goodchild *et al.*, 2005b). Ein konditionaler KO des murinen *Tor1a* im ganzen ZNS durch Verwendung der Cre-Rekombinase unter Kontrolle des Nestin Promotors führte ebenfalls zu einem frühen Versterben der *Nestin-Cre Tor1a*^(flox/flox)-Tiere. allerdings konnte diese ein Alter bis zu zwei Wochen erreichen. Erst durch die Kombination von *Nestin-Cre Tor1a*^(+flox)- mit *Tor1a*^(+ΔE)-Knockin Tieren konnte ein unbegrenzt lebensfähiges Modell generiert werden (Liang *et al.*, 2014). Diese *Nestin-Cre Tor1a*^(flox/ΔE)-Tiere zeigten ab einem Alter von 14 Tagen auffällige, abnorme Bewegungen und Posen sowie ein abnorme Streckung von Schwanz und Extremitäten, Clasping der Vorderpfoten und abnormen Kreuzungen der Zehen.

Um die Expression der Cre-Rekombinase nur in neuronalen Vorläuferzellen des Mittel- und Hinterhirn sowie Cerebellum zu aktivieren wurde die Cre-Rekombinase unter die Kontrolle des Engrailed1 (EN1)-

Promotors gestellt. So konnten konditionaler *En1-Cre Tor1a^(flox/flox)*-Tiere (*En1* CKO) sowie *En1-Cre Tor1a^(flox/ΔE)*-Tiere (*En1* SKI) generiert werden. Beide Linien zeigten ab einem Alter von vierzehn Tagen Clasping der Hinterpfoten sowie ein Clenching der Vorderpfoten, was mit zunehmendem Alter rückläufig wurde. Beide Genotypen zeigten eine erhöhte Anzahl von Schrittfehlern beim Beamwalking-Test. In *En1* SKI Tieren konnte eine Verbesserung der Griffstärke im Alter beobachtet werden, in *En1* CKO jedoch nicht. Durch diese Ergebnisse konnte die Wichtigkeit einer funktionierenden TorsinA Expression während der Embryogenese erneut unterstrichen werden, wie auch die Stärke der Expression, selbst der mutanten Form von TorsinA. So zeigten die Mäuse, welche noch TorsinA ΔE exprimieren konnten einen schwächeren Phänotyp als solche mit einem kompletten KO.

Durch das Überleben der „Rescue-Mäuse“ wurde von einem positiven Einfluss des zusätzlich exprimierten humanen TorsinAs ausgegangen, bevor allerdings von einer „Rettung“ des Phänotyps gesprochen werden konnte, musste der Phänotyp der Tiere mit mehrere Tests analysiert werden um eventuelle Auffälligkeiten der Tiere (SHIRPA Protokoll), deren Motorik (Rotarod) und des Gangbildes (CatWalk) aufzuspüren. Hierbei konnte mit einer Ausnahme keinerlei signifikante Unterschiede zwischen *Tor1a^(+/-) / TORIA-* und *Tor1a^(-/-) / TORIA-*Tieren sowie den Kontrolltieren festgestellt werden. Allein bei der Schrittbreite der Hinterpfoten (Abb. 4.1.11 F) konnte eine signifikante Reduktion der Schrittbreite sowohl in *Tor1a^(+/-) / TORIA-* als auch in *Tor1a^(-/-) / TORIA-*Tieren gegenüber den Kontrolltieren festgestellt werden.

Diese Beobachtung konnte beim ursprünglichen Footprint-Test der *Tor1a^(+/+) / TORIA-*Mäuse nicht gemacht werden, allerdings zeigten dieser Tiere eine signifikant kleinere Schrittlänge, was in *Tor1a^(+/-) / TORIA-* und *Tor1a^(-/-) / TORIA-*Tieren jedoch nicht beobachtet werden konnte (Grundmann *et al.*, 2007). Die Verkürzung der Schrittbreite spricht auch gegen Probleme der Tiere bei der Fortbewegung, da hier eine größere Schrittbreite einen Vorteil z.B. durch Absenken des Schwerpunktes und somit einen Vorteil beim Halten des Gleichgewichts mit sich bringen würde. Auch erscheint diese Abweichung unter Einbezug der weiteren getesteten nicht signifikanten Parameter jedoch keine überproportionalen Einfluss auf die motorischen Fähigkeiten der „Rescue-Mäuse“ zu haben.

Die hohe Varianz innerhalb jeden Genotyps verhinderte allerdings eine genauere Aussage für die motorischen Fähigkeiten der Tiere. Eine größere, sowie nur aus einem Geschlecht zusammengesetzte Kohorte könnte hierbei einen optimierten Ansatz für weitere Experimente darstellen.

Zur detaillierteren motorischen Charakterisierung könnten weitere Experimente durchgeführt werden. Zur Kontrolle der Balance und der motorischen Fähigkeiten könnte z.B. der Beam Walk-Test durchgeführt werden, welcher die Mäuse vor die Herausforderung stellt möglichst schnell einen Stab mit vergebendem Durchmesser zu überqueren (Luong *et al.*, 2011). Dieser Test wurde bereits mit *Tor1a^(+/+) / TORIA-*Tieren durchgeführt, wobei sie signifikant bessere Ergebnisse als die Kontrolltiere erzielten (Grundmann *et al.*, 2007).

Eine Analyse der „Rescue-Tiere“ durch einen Aufenthalt in einem automatisierten Verhaltenskäfig (Labmaster-Käfig) könnte ebenfalls weitere Erkenntnisse über das Verhalten der Tiere erbringen. Durch

diesen Test kann neben allgemeiner Aktivität und Futter- und Wasserverbrauch auch Unterschiede im Verhalten der Tiere zu unterschiedlichen Tageszeiten analysiert werden.

5.1.4 Neuropathologie der „Rescue-Tiere“

Durch die Verwendung des mPrP-Promotors wurde ein ubiquitäres Expressionsmuster des humanen TorsinA-Proteins gewählt, da dieser Promotor laut der Originalpublikation neben dem Bulbus olfactorius, Frontallappen, Cortex, Hippocampus, Thalamus, den Purkinjezellen eine „diffuse Expression“ im Rest des Gehirnes aufweist (Asante *et al.*, 2002).

Um die Expression des humanen TorsinAs in den „Rescue-Mäuse“ zu untersuchen und mit den Kontrollen zu vergleichen, wurden immunhistologische Färbungen mit Anti-TorsinA-Antikörper von Abcam durchgeführt (Abb. 4.1.6). Hierbei zeigte sich, dass der Antikörper im Gegensatz zu den durchgeführten Western Blot Analysen, humanes TorsinA detektieren konnte. Dies ist insofern interessant, als dass dieses Phänomen normalerweise umgekehrt auftritt, da die Proteine bei der Vorbereitung der immunhistochemischen Färbung meist einen Teil ihrer ursprünglichen Konformation beibehalten und so Teile der Antigensequenz verborgen bleiben können.

Es konnten zwischen den verschiedenen Genotypen keine quantitativen Unterschiede in den gefärbten Gehirnregionen festgestellt werden. Es konnte eine gleichmäßige Färbung in allen untersuchten Gehirnregionen beobachtet werden, wobei die Purkinjezellen des Cerebellums, die äußere und innere Pyramidenzellschicht des Cortex, Zellen des Corpus callosum, die Pyramidenzellschicht des Hippocampus und Zellen des Hirnstamms eine deutlichere Färbung aufwiesen. Auch hier konnten keine Differenzen zwischen *Tor1a*^(+/-) / *TORIA*- und *Tor1a*^(-/-) / *TORIA*-Tieren und den parallel ausgewerteten Kontrolltieren beobachtet werden. Eine Quantifizierung der Intensität der Färbung wurde nicht durchgeführt, da durch die Färbung mit Hilfe einer Peroxidase schon auf kleinste zeitliche Abweichungen während der Durchführung des Färbeprotokolls zu empfindlich reagiert.

Die beobachtete Färbung zeigte in den *Tor1a*^(+/-) / *TORIA*- und *Tor1a*^(-/-) / *TORIA*-Tieren eine relativ gute Übereinstimmung mit dem bereits bekannten Expressionsmuster des mPrP Promotors. Überraschenderweise stimmte dieses Expressionsmuster genau mit dem Expressionsmuster der Kontrolltiere überein, sodass aufgrund der durch die Färbung mit dem Anti-TorsinA-Antikörper gewonnenen Ergebnisse von einer hohen Übereinstimmung der Expressionsmuster des murinen TorsinA Promotors sowie des mPrP Promotors ausgegangen werden konnte.

TorsinA zeigt normalerweise in neuronalem Gewebe eine zytoplasmatische sowie teilweise axonale Lokalisation, welche durch die pathogene Mutation ΔE oder der Überexpression des wildtypischen TorsinAs zur Kernmembran hin verschoben wird (Goodchild *et al.*, 2004). Diese Relokalisation konnte auch durch Überexpression des humanen TorsinA-Proteins in *Tor1a*^(+/+) / *TORIA*-Tieren, welche die Grundlage der „Rescue-Mäuse“ darstellen beobachtet werden (Grundmann *et al.*, 2007). Darüber hinaus konnte bei diesen Tieren die Bildung von Einschlusskörperchen in der nahen Umgebung der

Zellkernmembran beobachtet werden. Um die zelluläre Lokalisation von TorsinA in *Tor1a*^(+/-)/*TORIA*- und *Tor1a*^(-/-)/*TORIA*-Tieren zu untersuchen, wurden Färbungen mit dem Anti-TorsinA-Antikörper analysiert (Abb. 4.1.7), wobei weder bei *Tor1a*^(+/-)/*TORIA*- noch bei *Tor1a*^(-/-)/*TORIA*-Tieren eine Veränderung in der intrazellulären Lokalisation beobachtet werden konnte. Alle untersuchten Zellen zeigten wie die Zellen der Kontrolltiere eine homogene zytoplasmatische Lokalisation.

Da bereits gezeigt werden konnte, dass das Auftreten der Einschlusskörperchen und die gleichzeitige Relokalisation von TorsinA zur Zellkernmembran in Abhängigkeit des TorsinA Expressionslevels auftritt, scheint durch das Fehlen eines Allels murinen TorsinAs bei *Tor1a*^(+/-)/*TORIA*-Tieren bzw. zwei Allelen bei *Tor1a*^(-/-)/*TORIA*-Tieren die kritische Schwelle unterschritten, was wiederum zu keiner Änderung in der zellulären Lokalisation führte (Naismith *et al.*, 2004b).

Durch die funktionierende immunhistochemische Färbung des Anti-TorsinA-Antikörpers und des auffälligen, nahezu identischen Expressionsmusters der *Tor1a*^(+/-)/*TORIA*- und *Tor1a*^(-/-)/*TORIA*-Tieren verglichen mit den Kontrolltieren konnte eine unbeabsichtigte Färbung weiterer Mitglieder der Torsin Proteinfamilie nicht ausgeschlossen werden. Da der Hersteller die Sequenz des zur Antikörperherstellung verwendeten Peptides nicht zur Verfügung stellte, konnte kein Abgleich der Sequenz mit den Sequenzen von Torsin1B, Torsin2 und Torsin3 durchgeführt werden. Eine hohe Homologie des Peptides mit den weiteren Mitgliedern der Torsin Proteinfamilie hätte eine Kreuzreaktion des Antikörpers erklären können. Des Weiteren bestand die Möglichkeit, dass der Antikörper unspezifisch an weitere Proteine binden konnte. Beide Erklärungen würden die Aussagekraft dieser Experimente schmälern.

Zur Kontrolle des Expressionmusters des humanen TorsinAs wurden immunhistochemische Färbungen mit den Anti-V5-Tag-Antikörper durchgeführt (Abb. 4.1.8 A). Wie bei den Färbungen mit Anti-TorsinA-Antikörper wurde das gesamte Gehirn analysiert. Hierbei wurden nur *Tor1a*^(+/-)/*TORIA*- und *Tor1a*^(-/-)/*TORIA*-Tieren verwendet, da das endogene TorsinA der Kontrolltiere keinen V5-Tag aufweist und somit kein Signal detektiert werden konnte. Das humane TorsinA zeigte eine deutlich zytoplasmatische Lokalisation, die Färbung war homogen in der ganzen Zelle sichtbar. Unterschiede zwischen *Tor1a*^(+/-)/*TORIA*- und *Tor1a*^(-/-)/*TORIA*-Tieren konnten nicht festgestellt werden.

Die durch den Anti-V5-Tag-Antikörper gefärbten Gehirnregionen unterschieden sich mit einer Ausnahme nicht von den bereits untersuchten Färbungen. Besonders deutlich Färbung konnte im Hirnstamm sowie im Cerebellum beobachtet werden, sowie in der äußeren Pyramidenzellschicht des Hippocampus.

Interessanterweise konnte weder im Striatum zwei Monate alter *Tor1a*^(+/-)/*TORIA*- noch von *Tor1a*^(-/-)/*TORIA*-Tieren eine Färbung nachgewiesen werden (Abb. 4.1.8 B). In den umliegenden Geweben, wie dem Corpus callosum oder auch Teilen des Cortex, konnte bei kleinen Vergrößerungen (40x) deutlich die bereits beschriebene Färbung beobachtet werden, während in den Zellen des Striatums keine Färbung beobachtet werden konnte. Dies widerspricht deutlich den durch den Anti-TorsinA-Antikörper beobachteten Expressionsmustern. Hier konnte eine deutliche Lokalisation in Neuronen des Striatums

beobachtet werden. Dies spricht für eine unspezifische Reaktion des Anti-TorsinA-Antikörpers in immunhistochemischen Färbungen

Auch widerspricht diese Beobachtung den Ergebnissen der Western Blot Analysen der „Rescue-Tiere“ (Abb. 4.1.3 und 4.1.4), bei welchen ein deutliches TorsinA-Signal in den Proteinlysaten der Striata von *Tor1a*^(+/-) / *TORIA*- und *Tor1a*^(-/-) / *TORIA*-Tieren detektiert werden konnte. Dies könnte ein Artefakt der Präparation darstellen, wobei nicht striatales Gewebe herauspräpariert und lysiert wurde. Des Weiteren könnte das Signal des Anti-V5-Tag-Antikörpers in diesem Experiment zwar präsent, aber zu schwach für eine ausreichende Detektion gewesen sein. Eine Beeinträchtigung der Faltung des TorsinA-Proteins durch den V5-Tag sowie ein anschließender Abbau scheint hierbei unwahrscheinlich, da in den untersuchten Gehirnregionen der *Tor1a*^(+/-) / *TORIA*- und *Tor1a*^(-/-) / *TORIA*-Tiere eine deutliche Färbung detektierbar war.

Aufgrund dieser Ergebnisse stellten sich nun die Fragen: Zu welchem Zeitpunkt und in welcher Stärke ist die Expression von TorsinA im Striatum für die normale Entwicklung des Organismus notwendig? Oder könnte dieser Prozess auch ohne eine Expression im Striatum ablaufen?

Aufgrund des frühen postnatalen Versterbens der TorsinA Knockout Tiere und dem Überleben der hier untersuchten „Rescue-Mäuse“ kann geschlussfolgert werden, dass eine Expression von TorsinA durch den mPrP Promotor ausreichend für eine normale Entwicklung und Verhalten der Maus schien. Dies schließt die fehlende oder sehr schwache Expression von humane TorsinA im Striatum ein. Im Gegensatz dazu zeigten Mäuse, welche einen ausschließlich im Striatum lokalisierten und durch Cre-Rekombinase vermittelten Knockout des TorsinA aufwiesen, deutliche Defizite bei Verhaltenstests (Yokoi *et al.*, 2011). Auch diese Mäuse zeigen eine normale Entwicklung und verstarben nicht direkt nach der Geburt. Allerdings wurde bei diesem Modell erst im Alter von acht Tagen die durch Cre-Rekombinase vermittelte Exzision des TorsinA-Lokus im Genom der Mäuse durchgeführt. So konnten auch in diesem Modell keine Rückschlüsse über die Rolle der Expression von TorsinA während der Entwicklung des ZNS gezogen werden, ebenso wie in den hier untersuchten „Rescue-Mäuse“, da der verwendete mPrP Promotor ab dem Tag 12,5 der Embryonalentwicklung eine Expression zeigt.

In verschiedenen Experimenten zum zeitlichen Expressionsmuster von TorsinA in wildtypischen Mäusen und Ratten konnte eine starke Hochregulation des TorsinA Expressionslevels kurz vor, sowie ein rasches Absinken ca. 14 Tage nach der Geburt beobachtet werden (Vasudevan *et al.*, 2006; Xiao *et al.*, 2004). So könnte eine mögliche schwache Expression von humanem TorsinA in *Tor1a*^(+/-) / *TORIA*- und *Tor1a*^(-/-) / *TORIA*-Tieren für eine normale Entwicklung der Tiere ausreichend gewesen sein, wenn sie zu diesem Zeitpunkt stattfand. Ein weiteres Absinken des TorsinA Expressionslevels zu einem späteren Zeitpunkt könnte die nicht erfolgte Detektion von humanem TorsinA in den „Rescue-Mäusen“ erklären, da die immunhistochemischen Färbungen in einem Alter von zwei Monaten durchgeführt wurden.

Für das Vorhandensein von TorsinA in nicht detektierbaren, aber für die Funktion der striatalen Neuronen ausreichenden, Mengen spricht auch das Fehlen von Einschränkungen der motorischen Fähigkeiten, welche im striatalen Knockout Modell beobachtet werden konnten.

Diese Einschätzung kann durch ein weiteres Mausmodell unterstützt werden. In einer Veröffentlichung von Pappas *et al.*, 2015, wurde das TorsinA der Maus durch Verwendung einer Cre-Rekombinase in Vorderhirn ab Tag 10 der Embryonalentwicklung ausgeknockt. Dies umfasste die Regionen Striatum, Cortex, den Globus pallidus, das basale Vorderhirn und den Nucleus reticularis. Dieses Modell zeigte nicht nur einen auffälligen dystonen Phänotypen sondern auch einen Verlust von „large cholinergic interneurons“ (großer cholinergischer Interneuronen), einer Neuronenpopulation im Striatum. Die Degeneration dieser Neuronen begann zum gleichen Zeitpunkt wie das Einsetzen der Bewegungsstörungen (Pappas *et al.*, 2015). Auch in diesem Modell konnte ein Zusammenhang zwischen der fehlenden Expression von TorsinA im Striatum und motorischen Störungen beobachtet werden, ebenso in ein konditionaler Knockout durch Cre-Rekombinase von TorsinA in den cholinergen Neuronen der Maus, welcher ab dem siebten Tag nach der Geburt aktiv wurde. Diese Tiere zeigten ebenfalls motorische Defizite auf dem Rotarod, allerdings konnte keine Degeneration der cholinergen Zellen beobachtet werden (Sciamanna *et al.*, 2012).

In beiden Modellen konnte gezeigt werden, dass die Expression von TorsinA im Striatum, bzw. in der im Striatum auftretenden Neuronenpopulation, nach Erreichen des Tages 10 der Embryonalentwicklung notwendig für die Entwicklung einer gesunden Maus benötigt wird. Dies wäre wiederum ein weiteres Indiz gegen ein komplettes Fehlen der TorsinA Expression im Striatum der „Rescue-Mäuse“.

Es konnte in diesen Experimenten auch gezeigt werden, dass der Zeitpunkt des Knockouts von TorsinA im Striatum eine entscheidende Rolle spielte. So zeigten die Tiere mit einem Knockout von TorsinA im Alter von sieben Tagen zwar Auffälligkeiten bei Tests der Motorik, allerdings konnte erst der Knockout ca. 11 Tage vor der Geburt einen wirklich dystonen Phänotyp erzeugen (Pappas *et al.*, 2015). Hierbei sollten weitere Analysen der Expression von humanem TorsinA Protein in den „Rescue-Mäusen“ zu verschiedenen Zeitpunkten der Embryonalentwicklung sowie im frühen postnatalen Alter folgen. Nur so kann sichergestellt werden ob es tatsächlich zu keiner detektierbaren Expression von humanem TorsinA kommt, oder ob die Expression zeitlich begrenzt stattfindet.

Ein weiterer zu untersuchender Punkt stellt die Neurodegeneration im Striatum dar. Liang *et al.* konnten in konditionalen *Nestin-Cre Tor1a^(flox/flox)*-Tiere eine starke Akkumulation des sauren Gliafaserproteins GFAP (Glial fibrillary acidic protein) beobachten, was auf Neurodegeneration schließen ließ (Liang *et al.*, 2014). Um die Lücken, welche durch tote Neuronen entstehen, zu füllen wachsen Gliazellen, wobei GFAP als ein Intermediärfilament eine wichtige Rolle spielt (Fawcett *et al.*, 1999). Diese Akkumulation konnte allerdings nur in Gehirnregionen beobachtet werden, in denen tatsächlich kein TorsinA-Protein exprimiert wurde, was durch die Benutzung verschiedener Promotoren gezeigt werden konnte (Liang *et al.*, 2014). Diese Hinweise auf Neurodegeneration wurde bisher in keinem anderen DYT1-Modell gezeigt. Könnte im Striatum der „Rescue-Mäuse“ ebenfalls eine Akkumulation von GFAP gezeigt

werden, wäre dies ein Hinweis auf eine nicht stattfindende Expression von humanem TorsinA im Striatum. Um den Zusammenhang zwischen Neurodegeneration und der fehlenden Expression von TorsinA zu bestätigen, wäre eine zusätzliche Untersuchung der *Tor1a*^(-/-)-Tiere auf GFAP Akkumulation hilfreich. Auch sollte diese Untersuchung ebenfalls in *To1a*^(+/ Δ E)- und *To1a*^(Δ E/ Δ E)-Tieren durchgeführt werden um einen möglichen Einfluss der pathogenen Mutation Δ E auf die Neurodegeneration zu untersuchen.

Da der Knockout von TorsinA mit der pathogenen Mutation Δ E nicht komplett zu vergleichen ist, gestaltet sich eine Übertragung dieser Ergebnisse auf den Patienten als recht diffizil. Allerdings konnte die Wichtigkeit des Striatums, sowie die Expression von TorsinA in dieser Gehirnregion, als Ansatzpunkt für die Pathogenese der DYT1-Dystonie erneut herausgearbeitet werden.

5.1.4.1 Analyse der Zellkernmembran der „Rescue-Tiere“

Die Untersuchung der Zellkernmembran der „Rescue-Tiere“ wurde aufgrund bereits gezeigter Auffälligkeiten von Tiermodellen der DYT1-Dystonie, welche in dieser Arbeit als Grundlagen für die Generierung der „Rescue-Mäuse“ dienten, durchgeführt. So führte der Knockout von TorsinA Mäusen in Zellen des Rückenmarks und des Cortex zu einer deutlichen Weitung des perinukleären Spaltes, sowie zu einer Anhäufung von membranösen Strukturen, welche sich von der inneren Kernmembran abschnürten (Goodchild *et al.*, 2005b). Diese Beobachtungen konnten auch bei einer Überexpression von humanem TorsinA gemacht werden, allerdings zeigte sich hier keine Abschnürung von Membranen der inneren Kernmembran (Grundmann *et al.*, 2007).

Auch in weiteren Modellen konnten eine veränderte Integrität der Kernmembran beobachtet werden. So zeigte die Überexpression von TorsinA Δ E in Ratten das genaue Gegenteil, an Teilen der Kernmembran lagerten sich die beiden Membrane so eng aneinander, sodass der Eindruck einer einzigen Membran entstand (Grundmann *et al.*, 2012b).

Um die Integrität der Zellkernmembran von Neuronen im Striatum der „Rescue-Tiere“ zu überprüfen, wurde eine Immunfluoreszenzfärbung gegen die Proteine Lamin A und C durchgeführt (Abb. 4.1.9). Die Lamine dieser Familie sind der Hauptbestandteil der Lamina des Zellkerns, welche sich auf der Innenseite der inneren Kernmembran befindet und unter Anderem für die Stabilität des Zellkernes sorgt (Gerace, 2004; Goldman *et al.*, 2002).

Die Immunfluoreszenzfärbungen zeigten eine durchgängige Kernlamina in allen untersuchten Genotypen. Lücken in der Lamina, erkennbar durch ein Fehlen des Signals, konnten weder in *Tor1a*^(+/-) / *TORIA*- und *Tor1a*^(-/-) / *TORIA*-Tieren noch in den Kontrolltieren festgestellt werden. Eine teilweise ungleichmäßige Verteilung des Signals konnte in allen drei Genotypen festgestellt werden, was ein natürliches Verhalten der Lamine darstellen könnte. Die Form der Kernlamina der *Tor1a*^(+/-) / *TORIA*- und *Tor1a*^(-/-) / *TORIA*-Tiere unterschied sich von der glatten, ovalen Form des Wildtyps. Die Kernlamina der „Rescue-Tiere“ hingegen zeigte teilweise eine eckige, fast rechtwinklige Form.

Zur genaueren Untersuchung dieser Beobachtung wurden elektronenmikroskopische Bilder striataler Zellen von *Tor1a*^(+/-) / *TORIA*- und *Tor1a*^(-/-) / *TORIA*-Tieren, sowie Kontrolltieren und *Tor1a*^(+/+) / *TORIA*-Tieren angefertigt (Abb. 4.1.10 A und B). Hierbei konnte die auffällige Form der Kernlamina in *Tor1a*^(+/-) / *TORIA*- und *Tor1a*^(-/-) / *TORIA*-Tieren nicht beobachtet werden, was teilweise für eine Artefakt der Immunfluoreszenzfärbung sprechen könnte. So könnten sich die in Paraffin eingebetteten Gehirne nach dem Schneiden nicht vollständig geglättet haben. Da die Lamina des Zellkerns nicht auf elektronenmikroskopischen Bildern nicht zu erkennen ist, könnte sie trotz einer normal erscheinenden Kernmembran Auffälligkeiten zeigen.

Allerdings konnte eine Weitung des perinukleären Spaltes bei Neuronen im Striatum der „Rescue-Tiere“ festgestellt werden. Während in den Kontrolltieren die beiden Membranen der Zellkernmembran parallel zueinander verliefen konnte bei *Tor1a*^(+/-) / *TORIA*-Tieren eine teilweise Weitung des perinukleären Spaltes beobachtet werden, während bei *Tor1a*^(-/-) / *TORIA*-Tieren dieser fast dauerhaft erweitert war. Des Weiteren wurden mit abnehmender Anzahl endogener TorsinA Allele die Abstände zwischen den beiden Membranen größer. Die wildtypische Anzahl endogener TorsinA Allele in *Tor1a*^(+/+) / *TORIA*-Tieren führte ebenfalls zu einer geweiteten Kernmembran, welche in Abstand der Membranen und Häufigkeit der Erweiterungen des perinukleären Spaltes zwischen *Tor1a*^(+/-) / *TORIA*- und *Tor1a*^(-/-) / *TORIA*-Tieren lagen.

Die lässt die Vermutung entstehen, dass nicht nur der KO von TorsinA zu einer Änderung in der Morphologie des perinukleären Spaltes führen kann, sondern auch die Überexpression von humanem TorsinA. Durch das nicht detektierbare Signal des humanen TorsinA im Striatum stellt sich auch hier die Frage, ob es in *Tor1a*^(+/+) / *TORIA*-Tieren tatsächlich zu einer Überexpression des humanen TorsinA-Proteins kommt, oder ob der Einfluss von TorsinA in umliegenden Geweben so stark ist, dass der Effekt auch im Striatum auftritt. Da in den Purkinjezellen, welche das humane TorsinA stark exprimieren, identische Beobachtungen gemacht werden konnten deutet es darauf hin, dass schon geringe Verschiebungen der TorsinA Homöostase zu einer Änderung der Kernmembranintegrität führen können.

Einen ähnlichen Phänotyp der Zellkernmembran konnte in Mäusen, welche einen Knockout des LAP1 Proteins aufwiesen, beobachtet werden (Kim *et al.*, 2010). Dies könnte, neben seiner Lokalisation an der inneren Kernmembran und der Möglichkeit zu einer direkten Interaktion mit TorsinA, auf eine wichtige Rolle von LAP1 für das Entstehen dieses Phänotyps hindeutete. Hierbei könnte eine Koimmunfluoreszenzfärbung von TorsinA und LAP1 zu wichtigen Erkenntnissen über die tatsächliche Interaktion dieser Proteine in den „Rescue-Tieren“ führen. Die ursprüngliche Theorie, dass LAP1 als ein Substrat von TorsinA fungieren könnte, konnte durch neue Erkenntnisse weiterentwickelt werden (Goodchild *et al.*, 2005a). Es konnte gezeigt werden, dass TorsinA *in vitro* keine eigenständige ATPase-Aktivität besitzt, erst durch die Ko-Expression von LAP1 konnte die Fähigkeit des TorsinA-Proteins zur Hydrolyse von ATP nachgewiesen werden, was für die Rolle LAP1s als regulierende Kofaktor hindeutete (Zhao *et al.*, 2013). Auch konnte gezeigt werden, dass eine direkte Interaktion von TorsinA

und LAP1 in einer Hexamerstruktur für die Aktivierung von TorsinA notwendig war (Sosa *et al.*, 2014). Auch hier könnte eine nicht komplett identische Aminosäuresequenz des humanen TorsinA Proteins mit der des murinen TorsinAs zu einer instabilen Hexamerstruktur führen, was zu einer nicht ausreichenden Aktivierung der ATPase-Aktivität von TorsinA führt. So könnte auch das Auftreten der geweiteten Kernmembran in *Tor1a^(+/+) / TOR1A* erklärt werden, da der Effekt nicht auf einer verringert Menge von murinem TorsinA-Protein basiert, sondern vielmehr auf der Expression eines nicht kompatiblen TorsinAs.

Wie es von einer Störung der TorsinA-LAP1-Interaktion zum Auftreten einer geweiteten perinukleären Spaltes kommt konnte noch nicht vollständig geklärt werden. Da es sich bei LAP1 um ein Typ 2 Transmembranprotein handelt konnten weitere Interaktionen von LAP1 mit der Lamina des Zellkerns beobachtet werden. So konnte LAP1 mit dem Aufbau der mitotischen Spindel und der Aufbau der Kernmembran in Verbindung gebracht werden (Santos *et al.*, 2015). Des Weiteren konnte LAP1 als Aktivator von TorsinA in der inneren Kernmembran an der Abschnürung von megaRNPs von der inneren Kernmembran beteiligt sein (Jokhi *et al.*, 2013; Rose *et al.*, 2012; Speese *et al.*, 2012). Dies könnte die bei TorsinA Knockout Mäusen beobachteten membranösen Strukturen erklären, da hier durch den Verlust von TorsinA keine Abschnürung mehr stattfinden könnte. Der in *Tor1a^(+/-) / TOR1A-*, *Tor1a^(-/-) / TOR1A-* und in *Tor1a^(+/+) / TOR1A*-Tieren geweitete perinukleäre Spalt könnte eine Vorstufe dieses Phänotyps darstellen, welcher durch eine nicht vollständig funktionierenden ATPase-Aktivität hervorgerufen werden könnte. So wurde zwar die Freisetzung von Phosphat bei der Interaktion von TorsinA oder TorsinA ΔE mit LAP1 bereits untersucht, allerdings wurden hierbei nur homogene Proteingemische untersucht (Zhao *et al.*, 2013). Eine Untersuchung der ATPase-Aktivität mit verschiedenen Verhältnissen von TorsinA WT und TorsinA ΔE im Beisein von LAP1 könnte die Funktion dieser Heterohexamere messen, wie sie auch im Patienten vorkommt. Ebenfalls könnten Proteingemische zwischen *Tor1a* und *TOR1A* untersucht werden, um eine Aussage über die ATPase-Aktivität der Hexamere in den „Rescue-Tieren“ treffen zu können. Auch weitere Versuche mit Gemischen von TorsinA und TorsinB wären denkbar um die Aktivität dieser sehr ähnlichen Proteine nachzuvollziehen. Eine Einschränkung bleibt allerdings, da diese Ergebnisse auf *in vitro* Versuchen basieren würden und somit nicht immer die tatsächlichen Verhältnisse im Organismus widerspiegeln.

Im Lumen der Zellkernmembranen konnten neben LAP1 noch weitere Interaktionspartner von TorsinA identifiziert werden. So konnte eine Interaktion von TorsinA mit der KASH (Klarsicht, Anc-1, Syne Homology)-Domäne von Proteinen der Nesprin-Familie beobachtet werden (Nery *et al.*, 2008). Nesprine sind Typ 2 Transmembranproteine, welche in der äußeren Kernmembran verankert sind und durch direkte Interaktionen mit Mikrotubuli und Actinfilamenten in Verbindung mit dem Zytoplasma stehen (Starr, 2007). Sie sind Bestandteil des LINC (linker of the nucleoskeleton and cytoskeleton)-Komplexes, welcher zusammen mit Proteinen der SUN-Familie, welche in der inneren Kernmembran lokalisiert sind, die Verbindung des Zellkerns mit dem Zytoskelett darstellen (siehe Abb. 5.1.1) (Crisp

et al., 2006). Nicht vollständig funktionsfähige TorsinA Hexamere der *Tor1a*^(+/-)/*TOR1A*-, *Tor1a*^(-/-)/*TOR1A*- und in *Tor1a*^(+/-)/*TOR1A*-Tieren könnte durch die Interaktion mit dem LINC-Komplex eine Destabilisierung der Verbindung zwischen den Kernmembranen verursachen und die so beobachtete Morphologie der Kernmembran verursachen.

Auch in den Purkinjezellen des Cerebellums konnte ein geweiteter perinukleärer Spalt bei *Tor1a*^(+/-)/*TOR1A*-, *Tor1a*^(-/-)/*TOR1A*- und in *Tor1a*^(+/-)/*TOR1A*-Tieren beobachtet werden, während dieser in den Kontrolltiere keine Auffälligkeiten zeigte (Abb. 4.1.10 C und D). Da die Purkinjezellen ein sehr hohes Expressionslevel von TorsinA zeigten, dienten sie als Kontrolle der striatalen Neuronen, welche möglicherweise durch eine nicht vorhandene Expression des humanen TorsinAs Unterschiede in der Struktur der Kernmembran aufweisen könnten. Durch die morphologische Ähnlichkeit der Zellkernmembran in verschiedenen Neuronenpopulation konnte allerdings ausgegangen werden, dass diese Strukturveränderungen in den striatalen Neuronen nicht durch ein komplettes Fehlen von TorsinA verursacht wurde, sondern vielmehr durch eine inkompatible Interaktion zwischen verschiedenen endogenen Proteinen der Maus und dem menschlichen TorsinA entstanden.

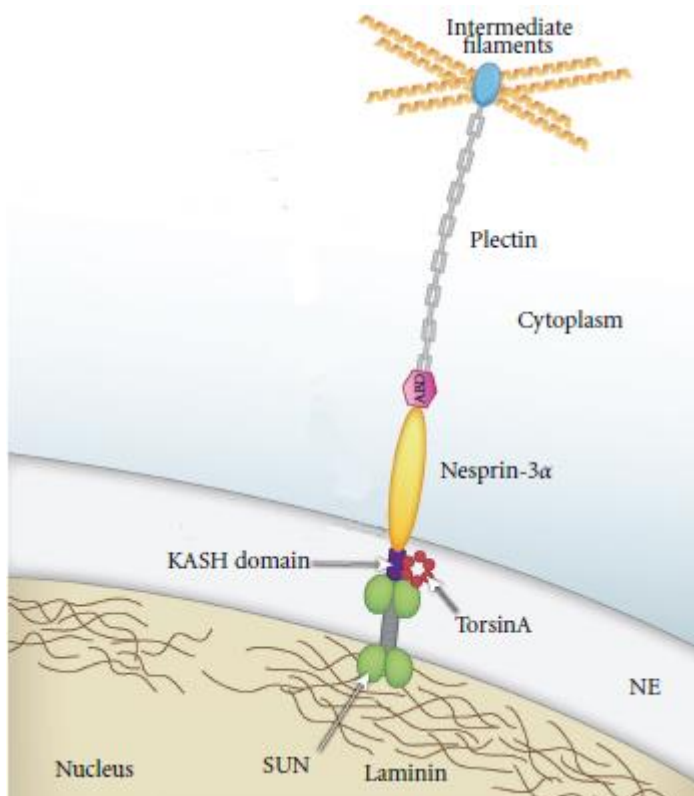


Abb. 5.1.1 Aufbau des LINC Komplexes

Nach Atai et al., 2012

5.1.4.2 Zusammenfassung und Ausblick

Durch die erfolgreiche Zucht von *Tor1a*^(-/-)/*TOR1A*-Mäusen konnte der Phänotyp der TorsinA-Knockout Tiere, ein Versterben der Tiere nach spätestens 24 h, erfolgreich gerettet werden.

Die Tiere zeigten keine Tendenz für ein frühes Versterben, Anfälligkeit für Krankheiten oder Probleme bei der Fortpflanzung.

Es konnten keine auffälligen Verhaltensweisen oder ein dystoner Phänotyp festgestellt werden. Bei der Charakterisierung motorischer Fähigkeiten zeigten die *Tor1a*^(-/-) / *TORIA*-Mäuse keine signifikanten Unterschiede Vergleich zu den Kontrolltieren.

Bei der Kontrolle der Expression des humanen TorsinAs im Gehirn von *Tor1a*^(+/-) / *TORIA*- und *Tor1a*^(-/-) / *TORIA*-Mäusen konnte eine Differenz der Expressionsstärke beobachtet werden, welche eine Korrelation mit der Anzahl der vorhandenen murinen TorsinA Allele zeigt.

Ob es sich hierbei um eine protektive Funktion des endogenen TorsinA-Proteins auf das zusätzlich exprimierte menschliche TorsinA handelte und auf welchen Mechanismen diese Funktion basiert wäre Gegenstand zukünftiger Experimente.

Die zur Kontrolle des Expressionsmusters des mPrP Promotors durchgeführten immunhistochemischen Färbungen zeigten in *Tor1a*^(-/-) / *TORIA*-Tieren eine homogene zytoplasmatische Lokalisation des humanen TorsinA-Proteins und somit keine auffällige Relokalisation zur Zellkernmembran. Allerdings konnte im Striatum der *Tor1a*^(+/-) / *TORIA*- und *Tor1a*^(-/-) / *TORIA*-Mäuse im Alter von 2 Monaten keine detektierbare Expression von humanem TorsinA beobachtet werden. Eine weitere Untersuchung dieser Beobachtung zu verschiedenen Zeitpunkten könnte weitere Aufschlüsse über das Expressionslevel und das Zeitfenster, in welchem eine Expression von TorsinA zur normalen Entwicklung der Maus benötigt wird, liefern.

Um die nicht detektierbare Expression von humanem TorsinA im Striatum weiter zu untersuchen, wurde eine Immunfluoreszenzfärbung gegen Lamin A und C durchgeführt, welche eine Abweichung in der Form der Lamina des Zellkerns von *Tor1a*^(+/-) / *TORIA*- und *Tor1a*^(-/-) / *TORIA*-Tieren im Vergleich zu Kontrolltieren aufzeigte. Um diese Beobachtung zu bestätigen wurden elektronenmikroskopische Aufnahmen striataler Neuronen sowie von Purkinjezellen aus dem Cerebellum angefertigt. Hierbei konnte eine Weitung des perinukleären Spaltes von *Tor1a*^(+/-) / *TORIA*-, *Tor1a*^(-/-) / *TORIA*- sowie *Tor1a*^(+/+) / *TORIA*-Tieren beobachtet werden. Dies deutete erneut auf eine Inkompatibilität von murinem und humanem TorsinA hin, da durch die Beobachtung der gleichen morphologischen Auffälligkeit in *Tor1a*^(+/+) / *TORIA*-Tieren ein Effekt durch ein zu geringes Level von TorsinA-Protein vernachlässigt werden konnte.

Eine Analyse der Interaktion von humanem TorsinA mit murinen Proteinen des LINC-Komplex sowie des murinen Homologs von LAP1 könnte hierbei neue Erkenntnisse für den Zusammenhang zwischen TorsinA und der Kernmembranpathologie bringen. Auch eine nähere Untersuchung zwischen TorsinA und der Abschnürung von megaRNPs aus der Zellkernmembran könnte neue Hinweise auf mögliche Interaktionsmechanismen von TorsinA und integralen Zellkernmembranproteinen erbringen.

5.2 Charakterisierung des ersten TorsinB Knockout Mausmodells

5.2.1 Genotypisierung der TorsinB Knockout Tiere

Die Sequenzierung der Ohrbiopsien zeigte eine Deletion von 22 Basenpaaren in *Tor1b*, was zu einer Verkürzung des Proteins auf 14 Aminosäuren führte. In diesen 14 Aminosäuren keine funktionelle Domäne, da die ersten 20 N-terminalen Aminosäuren von TorsinB (ebenso TorsinA) nur für eine Signalsequenz für die Lokalisation zum ER kodieren (Hewett *et al.*, 2003). Sollte die verkürzte TorsinB mRNA nicht durch die Mechanismen des „nonsense mediated mRNA decay“ entdeckt und abgebaut worden sein, bestand im Versuchsaufbau eine sehr geringe Chance, dass das Peptid einen Einfluss auf den Organismus nehmen konnte (Chang *et al.*, 2007).

5.2.2 Expressionsanalyse von TorsinB und TorsinA

Zur Kontrolle des Anti-TorsinB-Antikörpers, wurden Proteinlysate der inneren Organe und verschiedener Gehirnregionen wildtypischer Tiere durch Western Blot analysiert (Abb. 4.2.2 A). Um die Signalstärke zu quantifizieren, wurden Proteinlysate von jeweils drei Tieren analysiert (Abb. 4.2.2 B). Hierbei konnte ein deutlich höheres TorsinB Expressionslevel in nicht neuronalem Gewebe von Lunge, Leber, Milz und Niere im Vergleich zu den ebenfalls analysierten Gehirnregionen beobachtet werden. Allein das Expressionslevel des TorsinB Proteins im Herz schien deutlich geringer und bewegte sich auf einem Niveau wie dem der Gehirnregionen. Während das Expressionslevel von TorsinB im nicht neuronalen Gewebe deutliche Unterschiede aufwies, war das Expressionslevel in allen untersuchten Gehirnregionen relativ konstant. Diese neuen Ergebnisse ergänzen die in der Literatur bereits beschriebene Lokalisation und Expressionslevel von TorsinB. So konnte die Verteilung des TorsinB Proteins in allen Organen von Mäusen mit den hier durchgeführten Experimenten erneut bestätigt werden (Jungwirth *et al.*, 2010). Auch die bereits beobachteten Unterschiede des TorsinB Expressionslevels zwischen neuronalem und nicht neuronalem Gewebe konnten in diese Experimenten erneut bestätigt werden (Kim *et al.*, 2010). Dies unterstreicht die Hypothese, dass TorsinB und TorsinA sich gegenseitig in verschiedenen Gewebetypen komplementieren, was auch aufgrund ihrer stark ähnlichen Struktur und Funktion ein naheliegender Zusammenhang wäre (Abb. 1.5.1) (Hewett *et al.*, 2004; Ozelius *et al.*, 1997; Vasudevan *et al.*, 2006; Zhao *et al.*, 2013).

Um den Knockout von TorsinB auf Proteinebene nachzuweisen, wurden durch Western Blot die Proteinlysate verschiedener innerer Organe und Gehirnregionen von *Tor1b*^(+/-)- und *Tor1b*^(-/-)- sowie Kontrolltieren (Abb. 4.2.3 A). In allen Proben der *Tor1b*^(-/-)-Tiere konnte kein Signal durch den Anti-TorsinB-Antikörper detektiert werden, während in den Kontrolltieren eine Bande mit der erwarteten molekularen Masse von 37 kDa detektiert werden konnte. Diese Bande konnte auch in *Tor1b*^(+/-)-Tieren detektiert werden, die Signalstärke war jedoch deutlich niedriger als in den Kontrolltieren, was für eine

verringertes Expressionslevel durch Knockout eines TorsinB Allels spricht. Die unterschiedlichen Expressionslevel in *Tor1b*^(+/-)- und *Tor1b*^(-/-)-Tieren unterstützen die durch die Sequenzierung gewonnenen Ergebnisse, dass der Knockout von TorsinB die Expression eines funktionellen TorsinB Proteins verhindern konnte. Ebenso konnte die Spezifität des Anti-TorsinB-Antikörpers nachgewiesen werden, sodass dieser Antikörper auch in weiteren Experimenten eingesetzt werden kann.

Durch die Analyse des TorsinA Proteinlevels konnte der Einfluss des TorsinB Proteins auf die Expression TorsinA untersucht werden. In diesem Kontext wurden ebenfalls innere Organe (Abb. 4.2.24 A) sowie verschiedene Gehirnregionen (Abb. 4.2.4 B) untersucht. So zeigte die Milz eine signifikant schwächere Expression des TorsinA-Proteins in *Tor1b*^(+/-)-Tieren im Vergleich zum Wildtyp, im Gegensatz dazu konnte in den Proteinlysaten des Cortex ein signifikant schwächeres TorsinA Expressionslevel sowohl in *Tor1b*^(+/-)-, als auch in *Tor1b*^(-/-)-Tieren im Vergleich zum Wildtyp detektiert werden. Im Striatum konnte ein signifikant höheres Expressionslevel des TorsinA-Proteins in *Tor1b*^(-/-)-Tieren im Vergleich zu *Tor1b*^(+/-)- und Kontrolltieren beobachtet werden. Eine gegenteilige Beobachtung konnte in den hier in dieser Arbeit vorgestellten „Rescue-Tieren“ (Kap. 4.1) gemacht werden. Hier zeigte sich, dass das Expressionslevel des transgen exprimierten humanen TorsinAs in direktem Zusammenhang mit der Expressionslevel des endogenen TorsinA-Proteins stand. Auch konnte der Einfluss des TorsinB Expressionslevels auf die beiden weiteren Mitglieder der Torsin-Proteinfamilie, Torsin2 und Torsin3 noch nicht untersucht werden.

Das Expressionslevel von TorsinA schien nur in speziellen Geweben einem Einfluss durch das TorsinB Expressionslevel ausgesetzt gewesen zu sein, wobei dies, mit der Ausnahme des Striatums, ebenfalls zu einer Abnahme des TorsinA Expressionslevels führte. Dies könnte, unter Einbezug der Annahme, dass die Proteine der Torsin-Proteinfamilie bei Knockout eines Mitglieds die Aufgabe dieses Proteins übernehmen (Kim *et al.*, 2010), eine zentrale Rolle des Striatums hervorheben. Das Striatum steht durch seine zwei Klassen von, bei DYT1-Dystonie beeinträchtigten, Dopaminrezeptoren im Fokus der Dystonieforschung. Durch seine zentrale Rolle in den Basalganglien und somit bei der Entscheidung für bewusste Bewegungen, erscheint es logisch, dass eine Störung in der Funktion des Striatums zum Ausbruch der Dystonie führen könnte (siehe Kapitel 1.3.5.1). Wie genau die Pathogenese ausgehend von der ΔE Mutation in TorsinA bis zu DYT1-Dystonie abläuft ist allerdings noch unbekannt.

Die durch den Knockout von TorsinB bedingte Hochregulation der TorsinA Expression könnte auf eine wichtige Funktion von TorsinB in dieser Gehirnregion hindeuten, welche durch die höhere Expression von TorsinA übernommen wird. Dies wird durch die Beobachtung, dass das Striatum in *Tor1a*^{flox/flox}-Tieren, welche in Kapitel 5.1.3 diskutiert wurden, weniger stark von der in diesen Tieren nachgewiesenen Gliose betroffen waren (Liang *et al.*, 2014). Liang *et al.* brachten diese Beobachtung mit der erhöhten Expression von TorsinB im Striatum wildtypischer Mäuse in Verbindung (Kim *et al.*, 2010). Eine deutliche höheres Expressionslevel von TorsinB konnte in unseren Experimenten allerdings nicht bestätigt werden, das Expressionslevel von TorsinB Protein im Striatum zeigte hier ein ähnliches Level wie das in anderen analysierten Gehirnteilen, dies spricht allerdings nicht gegen eine Erhöhung

des TorsinA Expressionslevels durch den KO von TorsinB. Bedingt durch die Methode bei dieser Form der Analyse, konnte keine Differenzierung des TorsinA Proteinlevels zwischen Neuronen sowie Gliazellen vorgenommen werden. So könnte sich das höhere Expressionslevel auch ausschließlich auf nicht neuronale Zellen der Gehirnregion bezogen haben, da in diesen Zellen ein höheres Expressionslevel von TorsinB vorherrscht.

Andererseits zeigte sich jedoch nur im Striatum eine Hochregulation von TorsinA als Reaktion auf den Verlust von TorsinB, in den meisten untersuchten Organen und Gehirnregionen blieb die Expression von TorsinA unverändert bzw. wurde schwächer. Aufgrund dieser Beobachtungen muss allerdings auch die Möglichkeit in Betracht gezogen werden, dass keine abhängige Regulation des TorsinA-Proteins durch die Menge des vorhandenen TorsinB Proteins besteht.

5.2.3 Phänotypische Charakterisierung

Zur Identifikation von Auffälligkeiten und motorischen Defiziten durch den Knockout von TorsinB in *Tor1b*^(+/-)- und *Tor1b*^(-/-)-Tieren, wurden mehrere Verhaltensexperimente durchgeführt.

Äußerlich erschienen die *Tor1b*^(+/-)- und *Tor1b*^(-/-)-Tiere normal und selbst als homozygoter Knockout überlebensfähig, zudem zeigten sie ein normales Fortpflanzungsverhalten. Auf einen SHIRPA-Test zur Phänotypisierung dieser neuen Mauslinie wurde verzichtet, da die *Tor1b*^(+/-)- und *Tor1b*^(-/-)-Tiere in Verhalten und Aussehen von den Experimentatoren nicht von den Kontrolltieren unterschieden werden konnten. Auch wurde durch persönliche Mitteilung von Dr. Thomas Ott bestätigt, dass *Tor1b*^(+/-)- und *Tor1b*^(-/-)-Tiere keine Auffälligkeiten in ihrem Gewicht zeigten.

Die Durchführung mehrerer, auf das motorische Verhalten zugeschnittenen, Verhaltensexperimente konnte allerdings die Folge haben, dass in weiteren Tests Differenzen im Verhalten der Tiere auftreten können.

5.2.3.1 Analyse der automatisierten Verhaltenskäfige

Die Analyse der letzten Aktivitätsphase der Tiere ergab weder im Alter von drei oder sieben Monaten signifikante Unterschiede in den Aktivitätsparametern zwischen *Tor1b*^(+/-)- und *Tor1b*^(-/-)-Tiere sowie den Kontrolltieren (Abb. 4.2.5/6). In einzelnen früheren Phasen während der Akklimatisierung der Tiere konnten zwar Unterschiede zwischen den Genotypen festgestellt werden, allerdings waren diese Ergebnisse nie konsistent und konnten nicht in mehreren Phasen nachgewiesen werden. Diese Abweichungen könnten aufgrund äußerer Einflüsse, wie Lärm in der Tierhaltung, ein unbefugtes Aufhalten im Raum des Experimentes oder auch die regelmäßigen Kontrollgänge der Experimentatoren begründet sein. Die *Tor1b*^(+/-)- und *Tor1b*^(-/-)-Tiere zeigten im Vergleich zu den Kontrolltieren kein auffällig häufiges Stehen auf den Hinterbeinen, keine grundsätzlich erhöhte Aktivität und auch keine Unterschiede in der zurückgelegten Distanz. Auch konnte keine erhöhte Tendenz zum Aufenthalt an

den Außenseiten der Käfige festgestellt werden, *Tor1b*^(+/-)- und *Tor1b*^(-/-)-Tiere zeigten demnach kein erhöhtes Angstlevel. Auch die Mengen an verbrauchtem Futter und Wasser wiesen keine Unterschiede zwischen *Tor1b*^(+/-)- und *Tor1b*^(-/-)-Tieren sowie den Kontrolltieren auf. Um Unterschiede des Geschlechts auf die Mittelwerte der einzelnen Genotypen herauszufiltern, wurden zusätzlich jeweils nur Männchen oder Weibchen eines Genotyps miteinander in Vergleich gesetzt. Auch hier zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen *Tor1b*^(+/-)- und *Tor1b*^(-/-)-Tieren sowie den Kontrolltieren. Die dargestellten Ergebnisse deuten bei den untersuchten Parametern auf keine Unterschiede im normalen, nicht gestressten Verhalten der *Tor1b*^(+/-)- und *Tor1b*^(-/-)-Tiere hin.

5.2.3.2 Analyse der motorischen Koordinations- und Lernfähigkeiten

Wie in Kapitel 5.1.3 beschrieben, wurde zur Analyse der Koordinations- und Lernfähigkeit von *Tor1b*^(+/-)- und *Tor1b*^(-/-)-Tieren sowie den Kontrolltieren ein Rotarod-Versuch durchgeführt. Hierbei zeigte sich bei *Tor1b*^(+/-)- und *Tor1b*^(-/-)-Tiere sowie den Kontrolltieren in den ersten sechs Läufen der Übungstage ein Lerneffekt, welcher zu einer von Tag zu Tag längeren Verweildauer auf dem Rotarod führte (Abb. 4.2.7 A). Dies deutet auf eine normale Lernfähigkeit der *Tor1b*^(+/-)- und *Tor1b*^(-/-)-Tiere hin. Während der Testtage konnte kein signifikanter Unterschied in der Verweildauer auf dem Rotarod zwischen *Tor1b*^(+/-)- und *Tor1b*^(-/-)-Tiere sowie den Kontrolltieren beobachtet werden (Abb. 4.2.7 B). Eine längere Verweildauer der Weibchen auf dem Rotarod könnte mit dem geringeren Gewicht der Weibchen im Vergleich zu gleichaltrigen Männchen einhergehen, da sie sich aufgrund dessen einfacher auf dem Rotarod halten können. Um diesen Effekt zu umgehen, wurde eine getrennte Analyse der Geschlechter durchgeführt, allerdings zeigten sich auch bei einzelner Betrachtung der Geschlechter während der Testtage keine signifikanten Unterschiede zwischen den Genotypen. Diese Ergebnisse lassen auf eine normale Lern- und Koordinationsfähigkeit von *Tor1b*^(+/-)- und *Tor1b*^(-/-)-Tiere schließen.

5.2.3.3 Analyse des Gangbildes

Um eine detaillierte Analyse des Gangbildes der *Tor1b*^(+/-)- und *Tor1b*^(-/-)-Tiere durchzuführen, wurden dieses durch das CatWalk-System analysiert. Wie in Kapitel 5.1.3 beschrieben, können durch dieses System selbst geringste Auffälligkeiten der Tiere identifiziert werden. Um die Anzahl der Läufe pro Tier einzuschränken, wurden ausschließlich Läufe, welche schneller als der Median-Wert jedes individuellen Tieres waren, in die Analyse einbezogen. Dies geschah unter der Annahme, dass die Tiere bei einem schnelleren Lauf mehr Konzentration benötigten und so weniger offensichtliche Probleme besser zu identifizieren waren. Des Weiteren entstanden viele der langsameren Läufe, weil die Tiere kurze Stopps einlegten, z.B. um sich auf die Hinterbeine aufzurichten oder zu schnüffeln, was den Lauf effektiv unterbrach, aber durch die Parametereinstellung nicht automatisch gelöscht wurde. Bei der

Analyse aller Werte über dem Median jedes Tieres konnte dennoch die grundlegende Verteilung der Durchschnittsgeschwindigkeiten der einzelnen Genotypen beibehalten werden. So zeigten *Tor1b*^(+/-)-Tiere im Durchschnitt schnellere Läufe als die Kontrolltiere, allerdings waren die *Tor1b*^(-/-)-Tiere noch schneller. Dennoch konnte keine Signifikanz berechnet werden.

Auch in den Parametern des Schrittbildes konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen *Tor1b*^(+/-)- und *Tor1b*^(-/-)-Tieren sowie den Kontrolltieren beobachtet werden. Weder die Schrittlänge noch die Schrittbreite der *Tor1b*^(+/-)- und *Tor1b*^(-/-)-Tiere unterschied sich von Werten der Kontrolltiere, was für ein nicht verändertes Gangbild der *Tor1b*^(+/-)- und *Tor1b*^(-/-)-Tiere spricht.

Generell konnte für alle Verhaltensexperimente ein sehr hoher Standardfehler beobachtet werden, welcher die statistische Auswertung erschwerte. Dies führt dazu, dass viele subtile Veränderungen in den *Tor1b*^(+/-)- und *Tor1b*^(-/-)-Tiere nicht zweifelsfrei identifiziert werden konnten. Die hier beobachteten Ergebnisse des Rotarod-Tests und der CatWalk-Analyse konnten zwar als sehr robust eingestuft werden, allerdings könnte durch eine erhöhte Gruppengröße bei der Untersuchung der Tiere in den automatischen Verhaltenskäfigen unter Umständen dennoch Unterschiede im Verhalten der *Tor1b*^(+/-)- und *Tor1b*^(-/-)-Tiere im Vergleich zu den Kontrolltieren identifiziert werden.

5.2.4 Elektronenmikroskopische Analyse der Kernmembran

Um die *Tor1b*^(-/-)-Tiere auf den in der Literatur beschriebene Kernmembranphänotyp der *Tor1a*^(-/-)-Tiere zu untersuchen (Goodchild *et al.*, 2005b), wurden elektronenmikroskopische Bilder von Semidünnschnitten der Leber und Milz von drei Monate alten *Tor1b*^(-/-)- und Kontrolltieren aufgenommen. Die Gewebe wurden aufgrund der höheren Expression in nicht neuronalem Gewebe ausgewählt, da aufgrund der hohen Expression des TorsinA-Proteins die Auffälligkeiten in der Kernmembran der *Tor1a*^(-/-)-Tiere nur in neuronalen Geweben wie Cortex und Rückenmark beobachtet werden konnten. Während in der Zellkernmembran der Kontrolltiere sowohl in Leber als auch in der Milz keine Auffälligkeiten wie ein geweiteter perinukleärer Spalt oder Einschlusskörperchen beobachtet werden konnten (Abb. 4.2.10/11 A/B), konnten in Leber und Milz der *Tor1b*^(-/-)-Tiere die Bildung abnormer membranöser Strukturen beobachtet werden. So zeigte die Zellkernmembran der Leberzellen eine Tendenz zur Bildung konzentrischer, aus mehreren Schichten bestehender Membranstrukturen. Die Entstehung ähnlicher Strukturen konnten bereits durch die Überexpression von TorsinA ΔE in CAD (mouse catecholaminergic neuronal tumor) sowie SH-SY5Y-Zellen beobachtet werden und wurden als „whorls“ bezeichnet (Hewett *et al.*, 2000; Misbahuddin *et al.*, 2005). Der Entstehung der „whorls“ in den verschiedenen Zelllinien schien allerdings eine andere Funktion zu Grunde zu liegen. So konnte gezeigt werden, dass in großen Mengen exprimierte Proteine, welche die Möglichkeit besaßen Komplexe zu bilden, zur Bildung von geometrischen Formen aus Zellkern-, bzw. ER-Membranen führen konnten (Snapp *et al.*, 2003).

Es konnte weiter beobachtet werden, dass die „whorls“ in den *Tor1b*^(-/-)-Tieren der äußeren Kernmembran entstanden, welche direkt in das ER übergeht (Abb. 4.2.10 D) und durch den GA (Abb. 4.2.10 E) ins Zytoplasma der Zelle transportiert wurden. Da auch „whorls“ im GA sowie im Zytoplasma nachgewiesen wurden könnten in den „whorls“ neben Lipidmembranen zusätzlich noch Proteine lokalisiert sein. Der GA empfängt Proteine aus dem rauen ER um sie zu modifizieren und für den Transport in die Zelle oder zur Exozytose vorzubereiten (Day *et al.*, 2013). Dies legt die Vermutung nach, dass in diesen „whorls“ Proteine lokalisiert sind, welche normalerweise modifiziert und anschließend an ihren Zielort transportiert werden muss. Alternativ könnte diese Beobachtung auch auf einen Abbau der „whorls“ hindeuten, da im GA neben der Modifikation der Proteine auch eine Selektion von Proteinen für den Abbau stattfindet. Diese Proteine werden für ihren Abbau anschließend in durch Clathrin beschichtete Vesikel in Endosomen oder Lysosomen transportiert (De Matteis *et al.*, 2008). Auch bleibt zu überprüfen ob die beobachteten „whorls“ tatsächlich von der äußeren Zellkernmembran bis zum GA und anschließend ins Zytoplasma gelangen, oder ob durch den KO von TorsinB, neben der Zellkernmembran, auch andere membranöse Organellen „whorls“ ausbilden können. Hierzu könnten Liveaufnahmen während der Abschnürung der „whorls“ in primären Zellkulturen der *Tor1b*^(-/-)-Tiere entscheidende Hinweise liefern. Ebenso wäre eine Immunfluoreszenzfärbung gegen Nesprine, Proteine welche an der äußeren Kernmembran binden, denkbar, um die Herkunft der „whorls“ zu untersuchen (Atai *et al.*, 2012).

In Zellen der Milz von *Tor1b*^(-/-)-Tieren zeigte die Morphologie der Zellkernmembran ebenfalls eine Anhäufung mehrerer Membranschichten, allerdings konnte keine Bildung von „whorls“ beobachtet werden, da die Anhäufung der Membranen immer parallel zur äußeren Zellkernmembran stattfand.

Weder in Leber-, noch in Milzzellen der *Tor1b*^(-/-)-Tiere konnte ein abnorm geweiteter perinukleärer Spalt beobachtet werden, wobei durch die Funktion der Milz beim Abbau von Erythrozyten bei vielen Zellen eine erweiterter perinukleärer Spalt beobachtet werden konnte, unabhängig des Genotyps.

Der hier beobachtete Phänotyp, der dem Phänotyp der *Tor1a*^(-/-)-Tiere in neuronalem Gewebe ähnelte, untermauerte die Hypothese, dass TorsinB eine komplementäre Funktion zu TorsinA in nicht neuronalem Gewebe ausüben könnte und so nicht neuronales Gewebe in *Tor1a*^(-/-)-Tieren vor der Bildung von membranösen Abschnürungen rettet. Diese war aufgrund der stark ähnlichen Struktur der beiden Proteine und des hohen Expressionslevels von TorsinB Protein in nicht neuronalem Gewebe aufgestellt wurde (Kim *et al.*, 2010). Die genaue Funktion von TorsinB im Organismus konnte noch nicht endgültig nachgewiesen werden, allerdings deuten die Ergebnisse aus bisher erschienen Publikationen auf eine Funktion von TorsinB in der Aufrechterhaltung der Zellkernmembran hin (Kim *et al.*, 2010).

Außerdem erscheint aufgrund der beobachteten Akkumulierung von Lipidmembranen an der äußeren Zellkernmembran, die Beteiligung von TorsinB an der Rekrutierung und Abschnürung von megaRNPs von der Zellkernmembran nicht ausgeschlossen (Jokhi *et al.*, 2013), da diese in einem TorsinA abhängigen Prozess von der inneren Kernmembran abgeschnürt wurden. Durch den Knockout von

Tor1b könnte es zu einer teilweisen Inhibierung dieses Prozesses gekommen sein, woraufhin eine unkontrollierte Akkumulation von Membranen stattfinden konnte. Durch die Beobachtung von einzelnen „whorls“ im Zytoplasma der Zelle konnte von einer weiterhin intakten Abschnürung der „whorls“ ausgegangen werden. Dies könnte gegen eine identische Funktion der TorsinA- und B-Proteine sprechen.

Die in *D. melanogaster* beobachteten megaRNPs zeigten eine vesikelartige Morphologie aus einer einzelnen Membran, wie sie auch durch den Knockout von TorsinA entstanden (Goodchild *et al.*, 2005b; Jokhi *et al.*, 2013), während in *Tor1b*^(-/-)-Tieren in allen beobachteten „whorls“ mehrere Lagen an Membranen beteiligt waren. So wäre ein Zusammenwirken von TorsinA- und B-Proteinen denkbar, um ein erfolgreiches Abschnüren der megaRNPs zu gewährleisten. Hierbei könnte der Knockout eines Proteins zu einem Verlust der jeweiligen Funktion führen. Dies könnte auf eine Funktion des TorsinB Proteins in der Regulation der Lipidmembranmenge an der äußeren Zellkernmembran hinweisen. Für das TorsinA Protein könnte diese Hypothese eine Funktion im Aufbau und der Abschnürung von megaRNPs hinweisen. Diese verschiedenen Funktionen von TorsinA und B könnte ebenfalls eine Antwort auf die Frage, warum es in vielen Zellen zu einer dualen Expression von TorsinA und B kommt, darstellen. Diese doppelte Expression eines fast identischen Proteins wäre für eine Zelle energetisch nicht sinnvoll. Dennoch überschneidet sich das Expressionsmuster von TorsinB mit dem von TorsinA, nur die Expressionsstärke unterscheidet sich. So ist TorsinA in neuronalen Geweben stärker als TorsinB exprimiert, in nicht neuronalen Geweben ist es genau umgekehrt (Bahn *et al.*, 2006; Jungwirth *et al.*, 2010; Kim *et al.*, 2010; Konakova *et al.*, 2001a). Auch innerhalb der Zellen überschneiden sich die Lokalisationen der beiden Proteine im ER sowie der angeschlossenen Zellkernmembran, was durch ihr fast identisches Signalpeptid geschuldet wird (Hewett *et al.*, 2004). In immunhistochemischen Färbungen kommt es hingegen eher zu einer homogenen zytoplasmatischen Verteilung (Bahn *et al.*, 2006).

Auch eine direkte Interaktion beider Torsin Proteine in einem Heterohexamer wäre denkbar, da die Sequenzen der aktiven Domänen in beiden Proteinen stark homolog sind. Da beide Proteine ebenfalls mit LAP1 interagieren, wäre die Integration auch dieses Proteins in die Hexamerstruktur vorstellbar (Pappas *et al.*, 2015; Zhao *et al.*, 2013), was im Falle des TorsinB Knockouts zu einer verringerten Menge an Hexameren führen könnte. Da in der Leber der *Tor1b*^(-/-)-Tieren keine Änderung des TorsinA Expressionslevels beobachtet werden konnte, bzw. eine signifikant niedrigere Expressionslevel von TorsinA-Protein in der Milz der *Tor1b*^(-/-)-Tiere detektiert werden konnte, könnte die Bildung der „whorls“ auch auf eine nicht ausreichende Menge an TorsinA- und B-Proteinen zurückzuführen sein.

5.2.5 Zusammenfassung und Ausblick

Durch Sequenzierung und Western Blot konnte die Generierung der einer *Tor1b*-defizienten Maus verifiziert werden. Eine Deletion von 22 Basen führte zu einer Verschiebung im Leseraster der TorsinA

mRNA, was zu einem Stoppcodon nach Aminosäure 20 führte. In Western Blot Analysen konnte in *Tor1b*^(-/-)-Tieren kein TorsinB Protein detektiert werden. Es konnte mit Ausnahme des Striatums in keiner Gehirnregion oder innerem Organ eine erhöhte Expression von TorsinA beobachtet werden, was eine wichtige Funktion des TorsinA-Proteins im Striatum hinweisen könnte und weitere Experimente zur zeitlichen Expression von TorsinA notwendig macht.

Die Charakterisierung der *Tor1b*^(+/-)- und *Tor1b*^(-/-)-Tiere zeigte keinen dystonen Phänotyp der Tiere, sowie keine Einschränkungen der motorischen Fähigkeiten. Diese Ergebnisse könnten durch weitere Analysen der Tiere zu einem späteren Zeitpunkt wiederholt werden, um mögliche Einflüsse im Alter auszuschließen. Eine größere Kohorte könnte zu einer Verbesserung der anschließenden Auswertung beitragen.

In der Leber der *Tor1b*^(-/-)-Tiere konnten konzentrische, aus mehreren Schichten bestehende Lipidmembranstrukturen beobachtet werden, während in der Milz eine Akkumulation mehrerer Lipidmembranen an der äußeren Zellkernmembran beobachtet werden konnten. Diese Beobachtungen deuten auf eine Funktion von des TorsinB-Proteins an der Zellkernmembran, z.B. beim Export von megaRNPs aus dem Zellkern hin. Um die Hypothese, dass TorsinB ähnliche Funktionen wie das TorsinA-Protein nur in den nicht neuronalen Gewebetypen übernimmt, zu untersuchen, sollten weitere elektronenmikroskopische Analysen von verschiedenen Gehirnregionen durchgeführt werden. Ein Auftreten der „whorls“ würde die Annahme unterstützen, dass die TorsinA- und B-Proteine unterschiedliche Funktionen im Organismus besitzen. Eine Analyse weiterer Gewebe ist hierbei unerlässlich um die Formation weiterer membranöser Strukturen zu identifizieren. Hierbei sollte das Hauptaugenmerk auf neuronales Gewebe gelegt werden. Sollten TorsinB und TorsinA tatsächlich die gleiche Funktion in verschiedenen Geweben ausüben, würde ein Fund von „whorls“ in neuronalem Gewebe nicht erwartet werden. Falls dennoch die Bildung von „whorls“ beobachtet werden könnte, wäre es interessant ob es nach der Generation eines *Tor1a/Tor1b* Doppelknockouts zu einer Verschlimmerung dieses Phänotyps kommt. Dies wäre bei einer gemeinsamen Funktion von TorsinA und B in der Zellkernmembran zu erwarten.

Auch sollten vergleichende Analysen zur Interaktion von TorsinA und B in den metabolisch aktiven Hexameren durchgeführt werden. Hierbei könnte mit native SDS-Gelelektrophorese oder Massenspektrometrie die Zusammensetzung der Hexamere in Proteinlysaten von *Tor1b*^(+/-)-, *Tor1b*^(-/-)- und Kontrolltieren untersucht werden. Durch das Fehlen eines für Immunfluoreszenzfärbungen tauglichen Anti-TorsinB-Antikörpers konnte bisher keine Koimmunofluoreszenzfärbungen durchgeführt werden, welche für eine Detektion einer direkten Interaktion von TorsinB sowie LAP1 in wildtypischen Mäusen notwendig wäre.

5.3 Funktion von TorsinA im sich entwickelnden Nervensystem

Seit der Entdeckung der Mutation des *TOR1A*-Gens als Auslöser der DYT1-Dystonie im Jahre 1997, konnten viele Funktionen des durch *TOR1A* kodierten Proteins TorsinA identifiziert werden.

Hierbei konnten neben Einflüssen von TorsinA auf das Recycling von Vesikeln an der Synapse (Kakazu *et al.*, 2012), der Aktivität von Dopaminrezeptoren (Yokoi *et al.*, 2011; Yokoi *et al.*, 2015), der synaptischen Plastizität (Martella *et al.*, 2014), auch direkte Änderungen der Morphologie von neuronalen Zellen beobachtet werden (Ferrari-Toninelli *et al.*, 2004; Hewett *et al.*, 2006). Die genannten Studien konnten allerdings keinen einheitlichen Einfluss von TorsinA auf das Neuritenwachstum beobachten.

Um nun grundlegende Erkenntnisse über den Einfluss von TorsinA auf die sich entwickelnden Neuronen und insbesondere auf das Auswachsen von Neuriten zu erlangen, wurde das Wachstum von Neuriten und Dendriten mit zwei unterschiedlichen Systemen untersucht.

5.3.1 Die Expression von TorsinA führt zu erhöhtem Neuritenwachstum in PC6-3 Zellen

Um den Einfluss von TorsinA auf das Neuritenwachstum zu untersuchen, wurde das PC6-3 Modell der Arbeitsgruppe um Dr. Gonzalez-Alegre verwendet (Gonzalez-Alegre *et al.*, 2004).

Eine Immunfluoreszenzfärbung gegen TorsinA zeigte die bereits beschriebene Verteilung von TorsinA WT und ΔE (Abb. 4.3.1) (Gonzalez-Alegre *et al.*, 2004). Überexprimiertes humanes TorsinA WT zeigte eine deutliche homogene zytoplasmatische Verteilung, während TorsinA ΔE neben einer schwachen zytoplasmatischen Verteilung hauptsächlich in Einschlusskörperchen an der Zellkernmembran beobachtet werden konnte. Nach der erfolgten Kontrolle der TorsinA Expression, wurden die Zellen durch Zugabe von Doxycyclin und NGF zur Expression von TorsinA sowie zur Differenzierung stimuliert. Die auswachsenden Neuriten wurden nach drei Tagen Wachstum gemessen und deren Länge verglichen. Zellen, welche humanes TorsinA WT überexprimierten, zeigten signifikant längere Neuriten wie die zwar ebenfalls mit Doxycyclin behandelten, aber nicht zur Expression von TorsinA WT fähigen Kontrollen. Auch gegenüber den TorsinA ΔE überexprimierenden Zellen zeigten die TorsinA WT überexprimierenden Zellen signifikant längere Neuriten, während bei TorsinA ΔE überexprimierenden Zellen gegenüber den Kontrollen keine signifikant längeren Neuriten beobachtet werden konnten.

Um diese Ergebnisse zu verifizieren, wurden die PC6-3-Zellen für einen weiteren Versuch mit NGF und Doxycyclin stimuliert, fixiert und mit Phalloidin-TexasRED gefärbt, um die Fläche des Wachstumskegels zu messen (Abb. 4.3.2). Bei einem Wachstumskegel handelt es sich um eine dynamische Struktur am Ende jedes Neuriten, durch welche extrazelluläre richtungsweisende Signale wahrgenommen werden (Lowery *et al.*, 2009). Der Wachstumskegel besteht aus einer peripheren Domäne, welche hauptsächlich aus Actinfilamenten aufgebaut ist, sowie einer zentralen Domäne,

welche durch einen hohen Anteil an Mikrotubuli gekennzeichnet ist (Dent *et al.*, 2003). Da ein aktiver Neurit eine große Menge an Mikrotubuli benötigt, muss der Wachstumskegel hoch dynamisch organisiert sein, was mit einer Vergrößerung seiner Fläche einhergeht. In einem Mausmodell der spinalen Muskelatrophie konnte dieser Zusammenhang bereits nachgewiesen werden. So zeigten Mäuse mit einem Knockout des murinen *Smn*-Gens sowie zwei Kopien des transgenen *SMN2* verkürzte Axone und gleichzeitig eine verkleinerte Wachstumskegelfläche (Monani *et al.*, 2000; Rossoll *et al.*, 2003). Die Wachstumskegelfläche der auswachsenden Neuriten von stimulierten PC6-3-Zellen zeigten ebenfalls Ähnlichkeiten mit der gemessenen Länge der Neuriten. So besaßen TorsinA WT überexprimierende Zellen eine signifikant größere Wachstumskegelfläche als TorsinA ΔE überexprimierende Zellen sowie die Kontrollzellen. Im Gegensatz zu der Neuritenlänge besaßen TorsinA ΔE überexprimierende Zellen eine signifikant größere Wachstumskegelfläche als Kontrollzellen.

Hieraus konnte ein positiver Effekt von TorsinA auf das Wachstum von Neuriten in PC6-3 Zellen abgeleitet werden, während Torsin ΔE zwar zu einer Vergrößerung des Wachstumskegels führte, aber letztendlich keinen Einfluss auf die Länge der auswachsenden Neuriten hatte. Dies könnte ein Hinweis auf eine Funktion des TorsinA-Proteins beim Aufbau der Neuriten darstellen. Da TorsinA als Mitglied der AAA+-Proteinfamilie ein potentiell sehr weit gefächertes Aufgabenfeld übernehmen kann, wäre eine Interaktion mit Proteinen, welche das Wachstum der Neuriten regulieren, denkbar. So konnte bereits gezeigt werden, dass die Phosphorylierung von MAP-1b (Microtubule associated protein 1b) zu einer Destabilisierung von Mikrotubuli führt. Diese instabile Form der Mikrotubuli wird für das Auswachsen des Axon benötigt (Goold *et al.*, 1999). Auch konnte eine Verlängerung der Halbwertszeit von Mikrotubuli sowie eine höhere Aktivität im Wachstumskegel nach der Aktivierung von Proteinase C beobachtet werden (Kabir *et al.*, 2001).

Eine Interaktion von TorsinA mit MAP-1b sowie den im Wachstumskegel wichtigen Zytoskelettproteinen Actin und Mikrotubuli konnte bisher noch nicht nachgewiesen werden. Es konnte allerdings eine Interaktion von TorsinA und Vimentin durch Koimmunopräzipitation nachgewiesen werden (Hewett *et al.*, 2006; Nery *et al.*, 2008). Bei Vimentin handelt es sich um ein Intermediärfilament, welches hauptsächlich um den Zellkern lokalisiert ist und dort Funktionen während der Mitose (Maison *et al.*, 1997) sowie Funktionen zur Aufrechterhaltung der Form des Zellkerns und dessen Bewegung übernimmt (Djabali, 1999). Interessanterweise konnte gezeigt werden, dass Vimentin eine wichtige Funktion während der Neurogenese ausübt, da es sogar vor Neurofilamenten exprimiert wird, von denen es graduell verdrängt wird. So konnte beobachtet werden, dass Neuronen aus primären hippocampalen Neuronenkulturen nach einer Behandlung mit Antisense Oligonukleotiden gegen Vimentin ein ca. 70%ige Reduktion von auswachsenden Neuriten zeigten (Boyne *et al.*, 1996). Auch konnte eine erneute Expression von Vimentin in differenzierten Neuroblastoma-Zellen einen erneuten Wachstumsschub auslösen (Dubey *et al.*, 2004).

Dies könnte für eine notwendige Aktivierung von Vimentin durch TorsinA sprechen, welche während des Auswuchses der Neuriten stattfindet. So könnte diese Aktivierung durch Phosphorylierung in Zellen, welche TorsinA ΔE überexprimieren durch eine weniger aktive Hexamerstruktur aus TorsinA ΔE begründet sein. Durch die Überexpression von TorsinA ΔE könnten zwar ausreichend aktive Hexamere gebildet werden, durch ihre geringere Aktivität könnte allerdings nicht genügend Vimentin aktiviert werden, um einen signifikanten Wachstumsschub auszulösen.

5.3.2 Verlust von TorsinA führt zur Bildung verkürzter Dendriten

Um die Beobachtung, dass TorsinA einen positiven Einfluss auf das Wachstum von Neuriten hat zu verifizieren, wurden primäre Neuronenkulturen von *Tor1a*^(+/-)-, *Tor1a*^(-/-)- und wildtypischen Mäusen angelegt. Hierzu wurden die Hippocampi von Tieren am Tag 19 der Embryonalentwicklung verwendet. Dieser Zeitpunkt wurde gewählt, um das Problem der verfrühten Geburt, gerade bei großen Wurfgrößen, zu umgehen. Der Hippocampus wurde, neben seiner für die Präparation idealen Struktur, aufgrund seines bereits vor der Geburt sehr hohen Expressionslevels an TorsinA ausgewählt (Vasudevan *et al.*, 2006). Nach dem Ausplattieren der Zellen konnten die Kulturen fünf Tage wachsen, bis sie fixiert und angefärbt wurden. Dieser Zeitpunkt wurde aufgrund der Polarisierung der Zellen nach dem Ausplattieren in Zellkultur gewählt. Hippocampale Neuronen zeigten erst nach fünf Tagen in Kultur ihre endgültige Polarisierung, davor konnte immer wieder ein Wechsel in der Identität der Neuriten sowie ein Zurückziehen der Fortsätze in den Zellkörper beobachtet werden (Dotti *et al.*, 1988). Durch die Färbung gegen MAP2 und TAU konnten die Dendriten identifiziert und von dem Axon der Zelle unterschieden werden (Abb. 4.3.3 A). Hierbei wurde auf die Lage des Axons geachtet, sodass keine Zellen mit Autapsen oder bereits ausgebildeten Synapsen mit anderen Zellen ausgewertet wurden.

Die abnehmenden Expressionslevel von TorsinA in *Tor1a*^(+/-)- und *Tor1a*^(-/-)-Tieren (siehe auch Abb. 4.1.2 B) spiegelten sich auch in der Länge der ausgewachsenen Dendriten wieder (Abb. 4.3.3 B). Dendriten aus Zellen der *Tor1a*^(-/-)-Tiere waren signifikant kürzer als Dendriten aus Neuronen der *Tor1a*^(+/-)- und wildtypischen Kontrolltiere. Die Dendriten aus Neuronen der *Tor1a*^(-/-)-Tieren waren ebenfalls signifikant kürzer als Dendriten aus Neuronen der Kontrolltiere. Durch den Knockout von *Tor1a* und die darauf folgenden schwächere bzw. fehlende Expression von TorsinA kam es zu einer Verkürzung der Dendriten. Dies komplementierte die Ergebnisse der Experimente mit PC6-3 Zellen, wodurch TorsinA einen positiven Einfluss auf das Wachstum von Neuriten ausübt. Durch die ΔE Mutation oder den Knockout von TorsinA kam es nicht zu einem kompletten Stopp des Wachstums, die Neuriten erreichten jedoch nicht die Länge der Kontrolltiere bzw. der TorsinA WT überexprimierenden Tiere. Diese Beobachtung deutet auf eine Funktion TorsinAs während der Kontrolle der Elongation der Neuriten hin, allerdings scheint TorsinA keinen direkten Einfluss auf die Fähigkeit der Zellen zum Auswuchs der Fortsätze zu haben.

Diese eindeutigen Ergebnisse widersprechen der in SH-SY5Y-Zellen beobachteten Steigerung des Neuritenwachstums nach Knockout von TorsinA durch shRNA (Ferrari-Toninelli *et al.*, 2004), allerdings könnte die in diesen Versuchen nachgewiesene Interaktion von TorsinA mit dem TAU-Protein ein wichtiger Hinweis auf eine Interaktion von TorsinA mit Mikrotubuli darstellen. Dies könnte einen Anhaltspunkt für den Mechanismus des hier beobachteten verstärkten Wachstums von Neuriten darstellen.

Neben der Länge der auswachsenden Dendriten wurde auch deren Anzahl protokolliert, sodass ein Wolkendiagramm aus der Länge und der Anzahl der Dendriten pro individueller Zelle erstellt werden konnte (Abb. 4.3.3 C). Hierbei konnte eine Korrelation der Anzahl der Dendriten mit der durchschnittlichen Länge der Dendriten beobachtet werden. Um diese Annahme zu überprüfen, wurde eine multivariante lineare Regressionsanalyse durchgeführt. So konnte eine negative Korrelation sowohl zwischen Länge und Anzahl der Dendriten, als auch zwischen Länge der Dendriten und dem Genotyp festgestellt werden. Daher konnte den Beobachtungen, dass die Dendritenlänge aufgrund des Genotyps kürzer wurde, sowie dem Anstieg der Anzahl der Dendriten bei verkürzten Dendriten eine statistische Signifikanz zugesprochen werden. Zusätzlich konnte kein statistisch signifikanter Einfluss des Genotyps auf die Korrelation Länge zu Anzahl der Dendriten gefunden werden, wodurch sie also in allen untersuchten Genotypen gültig ist. Dies erscheint im biologischen Kontext durchaus sinnvoll, da eine Zelle mit einem begrenzten Stoffwechsel nicht unbegrenzt viele und lange Dendriten bilden kann.

Ein möglicher Einfluss von TorsinA auf die Anzahl der auswachsenden Dendriten könnte durch die erst kürzlich entdeckte Interaktion von TorsinA und der Abschnürung von megaRNPs in *D. melanogaster* erklärt werden (Jokhi *et al.*, 2013). Diese megaRNPs dienen als lokale Translationsfabriken und enthalten neben mRNA auch inaktive Ribonukleotidproteine, welche erst nach Erreichen des Ziels der megaRNPs aktiviert werden. Eines dieser Ziele stellt bei *D. melanogaster* die Postsynapse von Motorneuronen dar. Die megaRNPs enthielten hierbei den Rezeptor DFz2C, einen *Drosophila*-Homolog der Rezeptoren des Wnt-Signalweges, welcher für die Formation der Synapse während der larvalen Entwicklung benötigt wird (Speese *et al.*, 2012). Eine ähnliche Funktionsweise wurde für den Rezeptor Ryk (related to receptor tyrosine kinase), ebenfalls einem Wnt-Rezeptor nach Experimenten in Mausembryonen vorgeschlagen (Lyu *et al.*, 2008). Ryk gehört zur Familie der transmembranen Rezeptor-Tyrosinkinasen und wurde erstmal in *Drosophila* als Wnt-Rezeptor entdeckt (Halford *et al.*, 2001). Neben einer Funktion bei der Führung von Axonen konnte durch Versuche mit siRNA (short interfering RNA) *Ryk* Knockdown Mäusen eine Funktion von Ryk beim Auswuchs von Neuriten beobachtet werden. Es zeigte sich, dass Ryk zusammen mit dem Liganden Wnt-3a unerlässlich für ein normales Auswachsen von Neuriten war (Lu *et al.*, 2004).

Da es durch den Knockout von TorsinA zu keiner Abschnürung der megaRNPs von der äußeren Zellkernmembran kommen konnte, wäre eine Unterbrechung des Wnt-Signalweges denkbar. Durch das Fehlen von Ryk-Rezeptoren könnte es zwar zu einem initialen Auswachsen der Neuriten kommen,

allerdings könnte durch ein eingeschränktes Wachstum nicht die Länge der wildtypischen Fortsätze erreicht werden.

5.3.3 Zusammenfassung und Ausblick

Eine Zusammenfassung dieser Experimente lässt den Schluss zu, dass das Expressionslevel von TorsinA einen Einfluss auf die Länge und die Anzahl der gebildeten Neuriten hat. So führt ein hohes Expressionslevel von TorsinA zum Wachstum längerer Neuriten bei verringerter Anzahl, während ein schwaches bzw. nicht vorhandenes TorsinA Expressionslevel zum Wachstum kürzerer, dafür mehrerer Neuriten führt. Die Expression von TorsinA ΔE führt im Gegenteil zu TorsinA WT zu keinem längeren Neuritenwachstum.

Um diese Hypothese zu testen, könnten die Dendritenlängen von den in dieser Arbeit vorgestellten „Rescue-Mäusen“ untersucht werden. Durch die Expression von *TOR1A* in *Tor1a*^(-/-)-Tieren wäre eine Dendritenlänge ähnlich der Kontrolltiere zu erwarten. Auch die Dendritenlänge der *TOR1A* überexprimierenden Tiere könnte von Interesse sein, da hier durch die zusätzliche Expression von humanem TorsinA ein deutlich höheres Expressionslevel von TorsinA-Protein vorliegt, ähnlich den PC6-3-Zellen. Auch bei diesen Experimenten sollte neben der Dendritenlänge die Anzahl der Dendriten protokolliert werden, um weitere Aussagen über die Korrelation zwischen Dendritenlänge und Anzahl treffen zu können.

Um die Aktivierung von Vimentin durch TorsinA als Mechanismus für eine erhöhte Elongation der Neuriten zu untersuchen, könnten in TorsinA WT und $-\Delta E$ überexprimierende PC6-3 Zellen vor der Differenzierung durch NGF Vimentin herabreguliert werden, um eine grundlegende Beteiligung von Vimentin am Neuritenwachstum zu bestätigen. Sollte dies gelingen, könnte eine *in silico* Untersuchung des Interaktionsmechanismus zwischen TorsinA und Vimentin folgen, um mögliche Interaktionspartner beider Proteine zu identifizieren.

Um verlässlich die molekulare Funktion hinter der beobachteten Verkürzung bzw. Verlängerung der Neuriten identifizieren zu können, müssen weitere Experimente folgen um weitere Hypothesen zu untersuchen. Zur Verifizierung des Einflusses von TorsinA auf die Abschnürung der megaRNPs sollten elektronenmikroskopische Aufnahmen des Zellkerns von Neuronen der *Tor1a*^(+/-)- und *Tor1a*^(-/-)-Tiere angefertigt werden, um eine potenzielle Retention der megaRNPs an der Zellkernmembran zu identifizieren.

Könnte nach der Transfektion von Neuronen aus *Tor1a*^(+/-)- und *Tor1a*^(-/-)-Tieren mit einem Ryk-exprimierenden Vektor eine den wildtypischen Neuronen entsprechende Dendritenlänge gemessen werden, wäre ein tatsächlicher Einfluss von Ryk denkbar. Diese Versuche könnten auch mit anderen Wnt-Rezeptoren durchgeführt werden, um weitere Proteine zu finden, welche in der Elongation der Dendriten eine Rolle spielen könnten.

6 Literaturverzeichnis

- Adams Jr, J., Chang, M. L., & Klaidman, L. (2001). Parkinsons Disease - Redox Mechanisms. *Current Medicinal Chemistry*, 8(7), 809-814. doi: 10.2174/0929867013372995
- Albanese, A. (2014). Deep brain stimulation for cervical dystonia. *Lancet Neurol*, 13(9), 856-857. doi: 10.1016/S1474-4422(14)70178-4
- Albanese, A., Bhatia, K., Bressman, S. B., DeLong, M. R., Fahn, S., Fung, V. S. C., Hallett, M., Jankovic, J., Jinnah, H. A., Klein, C., Lang, A. E., Mink, J. W., & Teller, J. K. (2013). Phenomenology and classification of dystonia: a consensus update. *Mov Disord*, 28(7), 863-873. doi: 10.1002/mds.25475
- Altman, J., & Bayer, S. A. (1990). Migration and distribution of two populations of hippocampal granule cell precursors during the perinatal and postnatal periods. *J Comp Neurol*, 301(3), 365-381. doi: 10.1002/cne.903010304
- Asante, E. A., Gowland, I., Linehan, J. M., Mahal, S. P., & Collinge, J. (2002). Expression Pattern of a Mini Human PrP Gene Promoter in Transgenic Mice. *Neurobiol Dis*, 10(1), 1-7. doi: <http://dx.doi.org/10.1006/nbdi.2002.0486>
- Asanuma, K., Ma, Y., Okulski, J., Dhawan, V., Chaly, T., Carbon, M., Bressman, S. B., & Eidelberg, D. (2005). Decreased striatal D2 receptor binding in non-manifesting carriers of the DYT1 dystonia mutation. *Neurology*, 64(2), 347-349. doi: 10.1212/01.WNL.0000149764.34953.BF
- 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*, 2012, 634214. doi: 10.1155/2012/634214
- Augood, S. J., Hollingsworth, Z., Albers, D. S., Yang, L., Leung, J. C., Muller, B., Klein, C., Breakefield, X. O., & Standaert, D. G. (2002). Dopamine transmission in DYT1 dystonia: a biochemical and autoradiographical study. *Neurology*, 59(3), 445-448.
- Augood, S. J., Keller-McGandy, C. E., Siriani, A., Hewett, J., Ramesh, V., Sapp, E., DiFiglia, M., Breakefield, X. O., & Standaert, D. G. (2003). Distribution and ultrastructural localization of torsinA immunoreactivity in the human brain. *Brain Res*, 986(1-2), 12-21.
- Augood, S. J., Martin, D. M., Ozelius, L. J., Breakefield, X. O., Penney, J. B., Jr., & Standaert, D. G. (1999). Distribution of the mRNAs encoding torsinA and torsinB in the normal adult human brain. *Ann Neurol*, 46(5), 761-769.
- Augood, S. J., Penney, J. B., Jr., Friberg, I. K., Breakefield, X. O., Young, A. B., Ozelius, L. J., & Standaert, D. G. (1998). Expression of the early-onset torsion dystonia gene (DYT1) in human brain. *Ann Neurol*, 43(5), 669-673. doi: 10.1002/ana.410430518
- Bahn, E., Siegert, S., Pfander, T., Kramer, M. L., Schulz-Schaeffer, W. J., Hewett, J. W., Breakefield, X. O., Hedreen, J. C., & Rostasy, K. M. (2006). TorsinB expression in the developing human brain. *Brain Res*, 1116(1), 112-119. doi: 10.1016/j.brainres.2006.07.102
- Balcioglu, A., Kim, M. O., Sharma, N., Cha, J. H., Breakefield, X. O., & Standaert, D. G. (2007). Dopamine release is impaired in a mouse model of DYT1 dystonia. *J Neurochem*, 102(3), 783-788. doi: 10.1111/j.1471-4159.2007.04590.x
- Barnea-Goraly, N., Menon, V., Eckert, M., Tamm, L., Bammer, R., Karchemskiy, A., Dant, C. C., & Reiss, A. L. (2005). White Matter Development During Childhood and Adolescence: A Cross-sectional Diffusion Tensor Imaging Study. *Cerebral Cortex*, 15(12), 1848-1854. doi: 10.1093/cercor/bhi062
- Barnett, M. E., Zolkiewska, A., & Zolkiewski, M. (2000). Structure and Activity of ClpB from Escherichia coli: Role of the Amino- and Carboxy-terminal Domains. *J Biol Chem*, 275(48), 37565-37571. doi: 10.1074/jbc.M005211200
- Basham, S. E., & Rose, L. S. (1999). Mutations in ooc-5 and ooc-3 disrupt oocyte formation and the reestablishment of asymmetric PAR protein localization in two-cell Caenorhabditis elegans embryos. *Dev Biol*, 215(2), 253-263. doi: 10.1006/dbio.1999.9447
- Basham, S. E., & Rose, L. S. (2001). The Caenorhabditis elegans polarity gene ooc-5 encodes a Torsin-related protein of the AAA ATPase superfamily. *Development*, 128(22), 4645-4656.

- Bayer, S. A. (1982). Changes in the total number of dentate granule cells in juvenile and adult rats: a correlated volumetric and 3H-thymidine autoradiographic study. *Exp Brain Res*, 46(3), 315-323.
- Berardelli, A., Rothwell, J. C., Hallett, M., Thompson, P. D., Manfredi, M., & Marsden, C. D. (1998). *The pathophysiology of primary dystonia* (Vol. 121).
- Boyne, L. J., Fischer, I., & Shea, T. B. (1996). Role of vimentin in early stages of neuritogenesis in cultured hippocampal neurons. *Int J Dev Neurosci*, 14(6), 739-748.
- Bragg, D. C., Armata, I. A., Nery, F. C., Breakefield, X. O., & Sharma, N. (2011). Molecular pathways in dystonia. *Neurobiol Dis*, 42(2), 136-147. doi: 10.1016/j.nbd.2010.11.015
- Bragg, D. C., Camp, S. M., Kaufman, C. A., Wilbur, J. D., Boston, H., Schuback, D. E., Hanson, P. I., Sena-Esteves, M., & Breakefield, X. O. (2004a). Perinuclear biogenesis of mutant torsin-A inclusions in cultured cells infected with tetracycline-regulated herpes simplex virus type 1 amplicon vectors. *Neuroscience*, 125(3), 651-661. doi: 10.1016/j.neuroscience.2004.01.053
- Bragg, D. C., Kaufman, C. A., Kock, N., & Breakefield, X. O. (2004b). Inhibition of N-linked glycosylation prevents inclusion formation by the dystonia-related mutant form of torsinA. *Mol Cell Neurosci*, 27(4), 417-426. doi: 10.1016/j.mcn.2004.07.009
- Breakefield, X. O., Kamm, C., & Hanson, P. I. (2001). TorsinA: movement at many levels. *Neuron*, 31(1), 9-12.
- Bressman, S. B. (2004). Dystonia genotypes, phenotypes, and classification. *Adv Neurol*, 94, 101-107.
- Bressman, S. B., de Leon, D., Kramer, P. L., Ozelius, L. J., Brin, M. F., Greene, P. E., Fahn, S., Breakefield, X. O., & Risch, N. J. (1994). Dystonia in Ashkenazi Jews: clinical characterization of a founder mutation. *Ann Neurol*, 36(5), 771-777. doi: 10.1002/ana.410360514
- Bressman, S. B., Raymond, D., Fuchs, T., Heiman, G. A., Ozelius, L. J., & Saunders-Pullman, R. (2009). THAP1 (DYT6) mutations in early-onset primary dystonia. *Lancet neurology*, 8(5), 441-446. doi: 10.1016/S1474-4422(09)70081-X
- Buchman, A. S., Goetz, C. G., & Klawans, H. L. (1988). Hemiparkinsonism with hemiatrophy. *Neurology*, 38(4), 527-530.
- Burdette, A. J., Churchill, P. F., Caldwell, G. A., & Caldwell, K. A. (2010). The early-onset torsion dystonia-associated protein, torsinA, displays molecular chaperone activity in vitro. *Cell Stress Chaperones*, 15(5), 605-617. doi: 10.1007/s12192-010-0173-2
- Calakos, N., Patel, V. D., Gottron, M., Wang, G., Tran-Viet, K.-N., Brewington, D., Beyer, J. L., Steffens, D. C., Krishnan, R. R., & Züchner, S. (2010). Functional evidence implicating a novel TOR1A mutation in idiopathic, late-onset focal dystonia. *Journal of Medical Genetics*, 47(9), 646-650. doi: 10.1136/jmg.2009.072082
- Caldwell, G. A., Cao, S., Sexton, E. G., Gelwix, C. C., Bevel, J. P., & Caldwell, K. A. (2003). Suppression of polyglutamine-induced protein aggregation in *Caenorhabditis elegans* by torsin proteins. *Hum Mol Genet*, 12(3), 307-319.
- Callan, A. C., Bunning, S., Jones, O. T., High, S., & Swanton, E. (2007). Biosynthesis of the dystonia-associated AAA+ ATPase torsinA at the endoplasmic reticulum. *Biochem J*, 401(2), 607-612. doi: 10.1042/BJ20061313
- Cameron, H. A., Woolley, C. S., McEwen, B. S., & Gould, E. (1993). Differentiation of newly born neurons and glia in the dentate gyrus of the adult rat. *Neuroscience*, 56(2), 337-344. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/0306-4522\(93\)90335-D](http://dx.doi.org/10.1016/0306-4522(93)90335-D)
- Cao, S., Gelwix, C. C., Caldwell, K. A., & Caldwell, G. A. (2005). Torsin-mediated protection from cellular stress in the dopaminergic neurons of *Caenorhabditis elegans*. *J Neurosci*, 25(15), 3801-3812. doi: 10.1523/JNEUROSCI.5157-04.2005
- Cao, S., Hewett, J. W., Yokoi, F., Lu, J., Buckley, A. C., Burdette, A. J., Chen, P., Nery, F. C., Li, Y., Breakefield, X. O., Caldwell, G. A., & Caldwell, K. A. (2010). Chemical enhancement of torsinA function in cell and animal models of torsion dystonia. *Dis Model Mech*, 3(5-6), 386-396. doi: 10.1242/dmm.003715
- Carbon, M., & Eidelberg, D. (2009). Abnormal structure-function relationships in hereditary dystonia. *Neuroscience*, 164(1), 220-229. doi: 10.1016/j.neuroscience.2008.12.041
- Carbon, M., Kingsley, P. B., Su, S., Smith, G. S., Spetsieris, P., Bressman, S., & Eidelberg, D. (2004). Microstructural white matter changes in carriers of the DYT1 gene mutation. *Ann Neurol*, 56(2), 283-286. doi: 10.1002/ana.20177

- Carbon, M., Kingsley, P. B., Tang, C., Bressman, S., & Eidelberg, D. (2008). Microstructural White Matter Changes in Primary Torsion Dystonia. *Mov Disord*, 23(2), 234-239. doi: 10.1002/mds.21806
- Chakrabarti, A., Chen, A. W., & Varner, J. D. (2011). A Review of the Mammalian Unfolded Protein Response. *Biotechnol Bioeng*, 108(12), 2777-2793. doi: 10.1002/bit.23282
- Chakravarthy, V. S., Joseph, D., & Bapi, R. S. (2010). What do the basal ganglia do? A modeling perspective. *Biological Cybernetics*, 103(3), 237-253. doi: 10.1007/s00422-010-0401-y
- Chang, Y. F., Imam, J. S., & Wilkinson, M. F. (2007). The nonsense-mediated decay RNA surveillance pathway. *Annu Rev Biochem*, 76, 51-74. doi: 10.1146/annurev.biochem.76.050106.093909
- Chen, P., Burdette, A. J., Porter, J. C., Ricketts, J. C., Fox, S. A., Nery, F. C., Hewett, J. W., Berkowitz, L. A., Breakefield, X. O., Caldwell, K. A., & Caldwell, G. A. (2010). The early-onset torsion dystonia-associated protein, torsinA, is a homeostatic regulator of endoplasmic reticulum stress response. *Hum Mol Genet*, 19(18), 3502-3515. doi: 10.1093/hmg/ddq266
- Cheng, F.-B., Feng, J.-C., Ma, L.-Y., Miao, J., Ott, T., Wan, X.-H., & Grundmann, K. (2014). Combined occurrence of a novel TOR1A and a THAP1 mutation in primary dystonia. *Movement Disorders*, 29(8), 1079-1083. doi: 10.1002/mds.25921
- Crisp, M., Liu, Q., Roux, K., Rattner, J. B., Shanahan, C., Burke, B., Stahl, P. D., & Hodzic, D. (2006). Coupling of the nucleus and cytoplasm: role of the LINC complex. *J Cell Biol*, 172(1), 41-53. doi: 10.1083/jcb.200509124
- Dang, M. T., Yokoi, F., McNaught, K. S., Jengelley, T. A., Jackson, T., Li, J., & Li, Y. (2005a). Generation and characterization of Dyt1 DeltaGAG knock-in mouse as a model for early-onset dystonia. *Exp Neurol*, 196(2), 452-463. doi: 10.1016/j.expneurol.2005.08.025
- Dang, M. T., Yokoi, F., McNaught, K. S. P., Jengelley, T.-A., Jackson, T., Li, J., & Li, Y. (2005b). Generation and characterization of Dyt1 ΔGAG knock-in mouse as a model for early-onset dystonia. *Exp Neurol*, 196(2), 452-463. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.expneurol.2005.08.025>
- Dang, M. T., Yokoi, F., Pence, M. A., & Li, Y. (2006). Motor deficits and hyperactivity in Dyt1 knockdown mice. *Neurosci Res*, 56(4), 470-474. doi: 10.1016/j.neures.2006.09.005
- Day, K. J., Staehelin, L. A., & Glick, B. S. (2013). A Three-Stage Model of Golgi Structure and Function. *Histochemistry and cell biology*, 140(3), 239-249. doi: 10.1007/s00418-013-1128-3
- De Matteis, M. A., & Luini, A. (2008). Exiting the Golgi complex. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 9(4), 273-284.
- Debanne, D., Guérineau, N. C., Gähwiler, B. H., & Thompson, S. M. (1996). Paired-pulse facilitation and depression at unitary synapses in rat hippocampus: quantal fluctuation affects subsequent release. *The Journal of Physiology*, 491(Pt 1), 163-176.
- Delmaire, C., Vidailhet, M., Wassermann, D., & et al. (2009). Diffusion abnormalities in the primary sensorimotor pathways in writer's cramp. *Archives of Neurology*, 66(4), 502-508. doi: 10.1001/archneurol.2009.8
- Dent, E. W., & Gertler, F. B. (2003). Cytoskeletal dynamics and transport in growth cone motility and axon guidance. *Neuron*, 40(2), 209-227.
- Djabali, K. (1999). Cytoskeletal proteins connecting intermediate filaments to cytoplasmic and nuclear periphery. *Histol Histopathol*, 14(2), 501-509.
- Dotti, C. G., Sullivan, C. A., & Banker, G. A. (1988). The establishment of polarity by hippocampal neurons in culture. *J Neurosci*, 8(4), 1454-1468.
- Dubey, M., Hoda, S., Chan, W. K., Pimenta, A., Ortiz, D. D., & Shea, T. B. (2004). Reexpression of vimentin in differentiated neuroblastoma cells enhances elongation of axonal neurites. *J Neurosci Res*, 78(2), 245-249. doi: 10.1002/jnr.20146
- Edwards, M. J., Huang, Y.-Z., Mir, P., Rothwell, J. C., & Bhatia, K. P. (2006). Abnormalities in motor cortical plasticity differentiate manifesting and nonmanifesting DYT1 carriers. *Movement Disorders*, 21(12), 2181-2186. doi: 10.1002/mds.21160
- Esapa, C. T., Waite, A., Locke, M., Benson, M. A., Kraus, M., McIlhinney, R. A., Sillitoe, R. V., Beesley, P. W., & Blake, D. J. (2007). SGCE missense mutations that cause myoclonus-dystonia syndrome impair epsilon-sarcoglycan trafficking to the plasma membrane: modulation by ubiquitination and torsinA. *Hum Mol Genet*, 16(3), 327-342. doi: 10.1093/hmg/ddl472
- Fahn, S. (1988). Concept and classification of dystonia. *Adv Neurol*, 50, 1-8.
- Fahn, S., Marsden, C. D., & Calne, D. B. (1987). Classification and investigation of dystonia. *Marsden CD, Fahn S, eds. Movement disorders 2. London: Butterworths*, 332-358.

- Fawcett, J. W., & Asher, R. A. (1999). The glial scar and central nervous system repair. *Brain Research Bulletin*, 49(6), 377-391. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S0361-9230\(99\)00072-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0361-9230(99)00072-6)
- Ferrari-Toninelli, G., Paccioretti, S., Francisconi, S., Uberti, D., & Memo, M. (2004). TorsinA negatively controls neurite outgrowth of SH-SY5Y human neuronal cell line. *Brain Res*, 1012(1-2), 75-81. doi: 10.1016/j.brainres.2004.02.080
- Ferrari Toninelli, G., Spano, P., & Memo, M. (2003). TorsinA, microtubules and cell polarity. *Funct Neurol*, 18(1), 7-10.
- Fox, M. D., & Alterman, R. L. (2015). Brain stimulation for torsion dystonia. *JAMA Neurology*, 72(6), 713-719. doi: 10.1001/jamaneurol.2015.51
- Gage, F. H., Kempermann, G., Palmer, T. D., Peterson, D. A., & Ray, J. (1998). Multipotent progenitor cells in the adult dentate gyrus. *J Neurobiol*, 36(2), 249-266. doi: 10.1002/(SICI)1097-4695(199808)36:2<249::AID-NEU11>3.0.CO;2-9
- Gasser, T., Windgassen, K., Bereznai, B., Kabus, C., & Ludolph, A. C. (1998). Phenotypic expression of the DYT1 mutation: a family with writer's cramp of juvenile onset. *Ann Neurol*, 44(1), 126-128. doi: 10.1002/ana.410440119
- 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(4), 549-553. doi: 10.1002/ana.22138
- Gerace, L. (2004). TorsinA and torsion dystonia: Unraveling the architecture of the nuclear envelope. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101(24), 8839-8840. doi: 10.1073/pnas.0402441101
- Geyer, H. L., & Bressman, S. B. (2006). The diagnosis of dystonia. *The Lancet Neurology*, 5(9), 780-790. doi: 10.1016/S1474-4422(06)70547-6
- Giles, L. M., Chen, J., Li, L., & Chin, L. S. (2008). Dystonia-associated mutations cause premature degradation of torsinA protein and cell-type-specific mislocalization to the nuclear envelope. *Hum Mol Genet*, 17(17), 2712-2722. doi: 10.1093/hmg/ddn173
- Giles, L. M., Li, L., & Chin, L. S. (2009). TorsinA protein degradation and autophagy in DYT1 dystonia. *Autophagy*, 5(1), 82-84.
- Gogtay, N., Giedd, J. N., Lusk, L., Hayashi, K. M., Greenstein, D., Vaituzis, A. C., Nugent, T. F., Herman, D. H., Clasen, L. S., Toga, A. W., Rapoport, J. L., & Thompson, P. M. (2004). Dynamic mapping of human cortical development during childhood through early adulthood. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101(21), 8174-8179. doi: 10.1073/pnas.0402680101
- Goldman, R. D., Gruenbaum, Y., Moir, R. D., Shumaker, D. K., & Spann, T. P. (2002). Nuclear lamins: building blocks of nuclear architecture. *Genes & Development*, 16(5), 533-547. doi: 10.1101/gad.960502
- Gonzalez-Alegre, P., & Paulson, H. L. (2004). Aberrant cellular behavior of mutant torsinA implicates nuclear envelope dysfunction in DYT1 dystonia. *J Neurosci*, 24(11), 2593-2601. doi: 10.1523/JNEUROSCI.4461-03.2004
- Goodchild, R. E., & Dauer, W. T. (2004). Mislocalization to the nuclear envelope: an effect of the dystonia-causing torsinA mutation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101(3), 847-852. doi: 10.1073/pnas.0304375101
- Goodchild, R. E., & Dauer, W. T. (2005a). The AAA+ protein torsinA interacts with a conserved domain present in LAP1 and a novel ER protein. *J Cell Biol*, 168(6), 855-862. doi: 10.1083/jcb.200411026
- Goodchild, R. E., Kim, C. E., & Dauer, W. T. (2005b). Loss of the dystonia-associated protein torsinA selectively disrupts the neuronal nuclear envelope. *Neuron*, 48(6), 923-932. doi: 10.1016/j.neuron.2005.11.010
- Goold, R. G., Owen, R., & Gordon-Weeks, P. R. (1999). Glycogen synthase kinase 3beta phosphorylation of microtubule-associated protein 1B regulates the stability of microtubules in growth cones. *J Cell Sci*, 112(19), 3373-3384.
- Gordon, K. L., & Gonzalez-Alegre, P. (2008). Consequences of the DYT1 mutation on torsinA oligomerization and degradation. *Neuroscience*, 157(3), 588-595. doi: 10.1016/j.neuroscience.2008.09.028
- Granata, A., Koo, S. J., Haucke, V., Schiavo, G., & Warner, T. T. (2011). CSN complex controls the stability of selected synaptic proteins via a torsinA-dependent process. *EMBO J*, 30(1), 181-193. doi: 10.1038/emboj.2010.285

- Granata, A., Schiavo, G., & Warner, T. T. (2009). TorsinA and dystonia: from nuclear envelope to synapse. *J Neurochem*, *109*(6), 1596-1609. doi: 10.1111/j.1471-4159.2009.06095.x
- Granata, A., Watson, R., Collinson, L. M., Schiavo, G., & Warner, T. T. (2008). The dystonia-associated protein torsinA modulates synaptic vesicle recycling. *J Biol Chem*, *283*(12), 7568-7579. doi: 10.1074/jbc.M704097200
- Grundmann, K., Glöckle, N., Martella, G., Sciamanna, G., Hauser, T.-K., Yu, L., Castaneda, S., Pichler, B., Fehrenbacher, B., Schaller, M., Nuscher, B., Haass, C., Hettich, J., Yue, Z., Nguyen, H. P., Pisani, A., Riess, O., & Ott, T. (2012a). Generation of a novel rodent model for DYT1 dystonia. *Neurobiol Dis*, *47*(1), 61-74. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.nbd.2012.03.024>
- Grundmann, K., Glöckle, N., Martella, G., Sciamanna, G., Hauser, T. K., Yu, L., Castaneda, S., Pichler, B., Fehrenbacher, B., Schaller, M., Nuscher, B., Haass, C., Hettich, J., Yue, Z., Nguyen, H. P., Pisani, A., Riess, O., & Ott, T. (2012b). Generation of a novel rodent model for DYT1 dystonia. *Neurobiol Dis*, *47*(1), 61-74. doi: 10.1016/j.nbd.2012.03.024
- Grundmann, K., Reischmann, B., Vanhoutte, G., Hubener, J., Teismann, P., Hauser, T. K., Bonin, M., Wilbertz, J., Horn, S., Nguyen, H. P., Kuhn, M., Chanarat, S., Wolburg, H., Van der Linden, A., & Riess, O. (2007). Overexpression of human wildtype torsinA and human DeltaGAG torsinA in a transgenic mouse model causes phenotypic abnormalities. *Neurobiol Dis*, *27*(2), 190-206. doi: 10.1016/j.nbd.2007.04.015
- Halford, M. M., & Stacker, S. A. (2001). Revelations of the RYK receptor. *BioEssays*, *23*(1), 34-45. doi: 10.1002/1521-1878(200101)23:1<34::AID-BIES1005>3.0.CO;2-D
- Hanson, P. I., & Whiteheart, S. W. (2005). AAA+ proteins: have engine, will work. *Nat Rev Mol Cell Biol*, *6*(7), 519-529. doi: http://www.nature.com/nrm/journal/v6/n7/supinfo/nrm1684_S1.html
- Hedreen, J. C., Zweig, R. M., DeLong, M. R., Whitehouse, P. J., & Price, D. L. (1988). Primary dystonias: a review of the pathology and suggestions for new directions of study. *Adv Neurol*, *50*, 123-132.
- Helfand, B. T., Chang, L., & Goldman, R. D. (2003). The dynamic and motile properties of intermediate filaments. *Annu Rev Cell Dev Biol*, *19*, 445-467. doi: 10.1146/annurev.cellbio.19.111401.092306
- Herrmann, H., Hesse, M., Reichenzeller, M., Aebi, U., & Magin, T. M. (2003). Functional complexity of intermediate filament cytoskeletons: from structure to assembly to gene ablation. *Int Rev Cytol*, *223*, 83-175.
- Hettich, J., Ryan, S. D., de Souza, O. N., Saraiva Macedo Timmers, L. F., Tsai, S., Atai, N. A., da Hora, C. C., Zhang, X., Kothary, R., Snapp, E., Ericsson, M., Grundmann, K., Breakefield, X. O., & Nery, F. C. (2014). Biochemical and cellular analysis of human variants of the DYT1 dystonia protein, TorsinA/TOR1A. *Hum Mutat*, *35*(9), 1101-1113. doi: 10.1002/humu.22602
- Hewett, J., Gonzalez-Agosti, C., Slater, D., Ziefer, P., Li, S., Bergeron, D., Jacoby, D. J., Ozelius, L. J., Ramesh, V., & Breakefield, X. O. (2000). Mutant torsinA, responsible for early-onset torsion dystonia, forms membrane inclusions in cultured neural cells. *Hum Mol Genet*, *9*(9), 1403-1413.
- Hewett, J., Johanson, P., Sharma, N., Standaert, D., & Balcioglu, A. (2010). Function of dopamine transporter is compromised in DYT1 transgenic animal model in vivo. *J Neurochem*, *113*(1), 228-235. doi: 10.1111/j.1471-4159.2010.06590.x
- Hewett, J., Ziefer, P., Bergeron, D., Naismith, T., Boston, H., Slater, D., Wilbur, J., Schuback, D., Kamm, C., Smith, N., Camp, S., Ozelius, L. J., Ramesh, V., Hanson, P. I., & Breakefield, X. O. (2003). TorsinA in PC12 cells: localization in the endoplasmic reticulum and response to stress. *J Neurosci Res*, *72*(2), 158-168. doi: 10.1002/jnr.10567
- Hewett, J. W., Kamm, C., Boston, H., Beauchamp, R., Naismith, T., Ozelius, L., Hanson, P. I., Breakefield, X. O., & Ramesh, V. (2004). TorsinB--perinuclear location and association with torsinA. *J Neurochem*, *89*(5), 1186-1194. doi: 10.1111/j.1471-4159.2004.02404.x
- Hewett, J. W., Nery, F. C., Niland, B., Ge, P., Tan, P., Hadwiger, P., Tannous, B. A., Sah, D. W., & Breakefield, X. O. (2008). siRNA knock-down of mutant torsinA restores processing through secretory pathway in DYT1 dystonia cells. *Hum Mol Genet*, *17*(10), 1436-1445. doi: 10.1093/hmg/ddn032
- 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. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *104*(17), 7271-7276. doi: 10.1073/pnas.0701185104

- 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. *Neurobiol Dis*, 22(1), 98-111. doi: 10.1016/j.nbd.2005.10.012
- Ichinose, H., Ohye, T., Takahashi, E., Seki, N., Hori, T., Segawa, M., Nomura, Y., Endo, K., Tanaka, H., Tsuji, S., & et al. (1994). Hereditary progressive dystonia with marked diurnal fluctuation caused by mutations in the GTP cyclohydrolase I gene. *Nat Genet*, 8(3), 236-242. doi: 10.1038/ng1194-236
- Im, J.-H., Ahn, T.-B., Kim, K. B., Ko, S.-B., & Jeon, B. S. (2004). DYT1 mutation in Korean primary dystonia patients. *Parkinsonism Relat Disord*, 10(7), 421-423. doi: 10.1016/j.parkreldis.2004.05.004
- Iyer, L. M., Leipe, D. D., Koonin, E. V., & Aravind, L. (2004). Evolutionary history and higher order classification of AAA+ ATPases. *J Struct Biol*, 146(1-2), 11-31. doi: 10.1016/j.jsb.2003.10.010
- Jinnah, H. A., & Hess, E. J. (2006). A new twist on the anatomy of dystonia: the basal ganglia and the cerebellum? *Neurology*, 67(10), 1740-1741. doi: 10.1212/01.wnl.0000246112.19504.61
- Jokhi, V., Ashley, J., Nunnari, J., Noma, A., Ito, N., Wakabayashi-Ito, N., Moore, M. J., & Budnik, V. (2013). Torsin mediates primary envelopment of large ribonucleoprotein granules at the nuclear envelope. *Cell Rep*, 3(4), 988-995. doi: 10.1016/j.celrep.2013.03.015
- Jungwirth, M., Dear, M. L., Brown, P., Holbrook, K., & Goodchild, R. (2010). Relative tissue expression of homologous torsinB correlates with the neuronal specific importance of DYT1 dystonia-associated torsinA. *Hum Mol Genet*, 19(5), 888-900. doi: 10.1093/hmg/ddp557
- Jungwirth, M. T., Kumar, D., Jeong, D. Y., & Goodchild, R. E. (2011). The nuclear envelope localization of DYT1 dystonia torsinA-DeltaE requires the SUN1 LINC complex component. *BMC Cell Biol*, 12, 24. doi: 10.1186/1471-2121-12-24
- Kabir, N., Schaefer, A. W., Nakhost, A., Sossin, W. S., & Forscher, P. (2001). Protein Kinase C Activation Promotes Microtubule Advance in Neuronal Growth Cones by Increasing Average Microtubule Growth Lifetimes. *J Cell Biol*, 152(5), 1033-1044.
- Kaiser, F. J., Osmanovic, A., Rakovic, A., Erogullari, A., Uflacker, N., Braunholz, D., Lohnau, T., Orolicki, S., Albrecht, M., Gillessen-Kaesbach, G., Klein, C., & Lohmann, K. (2010). The dystonia gene DYT1 is repressed by the transcription factor THAP1 (DYT6). *Ann Neurol*, 68(4), 554-559. doi: 10.1002/ana.22157
- Kakazu, Y., Koh, J. Y., Ho, K. W., Gonzalez-Alegre, P., & Harata, N. C. (2012). Synaptic vesicle recycling is enhanced by torsinA that harbors the DYT1 dystonia mutation. *Synapse*, 66(5), 453-464. doi: 10.1002/syn.21534
- Kamm, C., Boston, H., Hewett, J., Wilbur, J., Corey, D. P., Hanson, P. I., Ramesh, V., & Breakefield, X. O. (2004). The early onset dystonia protein torsinA interacts with kinesin light chain 1. *J Biol Chem*, 279(19), 19882-19892. doi: 10.1074/jbc.M401332200
- Kim, C. E., Perez, A., Perkins, G., Ellisman, M. H., & Dauer, W. T. (2010). A molecular mechanism underlying the neural-specific defect in torsinA mutant mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107(21), 9861-9866. doi: 10.1073/pnas.0912877107
- Klein, C., & Fahn, S. (2013). Translation of Oppenheim's 1911 paper on dystonia. *Movement Disorders*, 28(7), 851-862. doi: 10.1002/mds.25546
- Konakova, M., Huynh, D. P., Yong, W., & Pulst, S. M. (2001a). Cellular distribution of torsin A and torsin B in normal human brain. *Arch Neurol*, 58(6), 921-927.
- Konakova, M., Huynh, D. P., Yong, W., & Pulst, S. M. (2001b). Cellular distribution of torsin a and torsin b in normal human brain. *Archives of Neurology*, 58(6), 921-927. doi: 10.1001/archneur.58.6.921
- Konakova, M., & Pulst, S. M. (2001c). Immunocytochemical characterization of torsin proteins in mouse brain. *Brain Res*, 922(1), 1-8.
- Konakova, M., & Pulst, S. M. (2005). Dystonia-associated forms of torsinA are deficient in ATPase activity. *J Mol Neurosci*, 25(1), 105-117. doi: 10.1385/JMN:25:1:105
- Kuner, R., Teismann, P., Trutzel, A., Naim, J., Richter, A., Schmidt, N., von Ahnen, O., Bach, A., Ferger, B., & Schneider, A. (2003). TorsinA protects against oxidative stress in COS-1 and PC12 cells. *Neurosci Lett*, 350(3), 153-156.
- Kustedjo, K., Deechongkit, S., Kelly, J. W., & Cravatt, B. F. (2003). Recombinant expression, purification, and comparative characterization of torsinA and its torsion dystonia-associated variant Delta E-torsinA. *Biochemistry*, 42(51), 15333-15341. doi: 10.1021/bi0349569

- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259), 680-685.
- Leung, J. C., Klein, C., Friedman, J., Vieregge, P., Jacobs, H., Doheny, D., Kamm, C., DeLeon, D., Pramstaller, P. P., Penney, J. B., Eisengart, M., Jankovic, J., Gasser, T., Bressman, S. B., Corey, D. P., Kramer, P., Brin, M. F., Ozelius, L. J., & Breakefield, X. O. (2001). Novel mutation in the TOR1A (DYT1) gene in atypical early onset dystonia and polymorphisms in dystonia and early onset parkinsonism. *Neurogenetics*, 3(3), 133-143.
- Li, H., Wu, H. C., Liu, Z., Zacchi, L. F., Brodsky, J. L., & Zolkiewski, M. (2014). Intracellular complexes of the early-onset torsion dystonia-associated AAA+ ATPase TorsinA. *Springerplus*, 3, 743. doi: 10.1186/2193-1801-3-743
- Li, X., Lee, J., Parsons, D., Janaurajs, K., & Standaert, D. G. (2012). Evaluation of TorsinA as a target for Parkinson disease therapy in mouse models. *PLoS One*, 7(11), e50063. doi: 10.1371/journal.pone.0050063
- Liang, C. C., Tanabe, L. M., Jou, S., Chi, F., & Dauer, W. T. (2014). TorsinA hypofunction causes abnormal twisting movements and sensorimotor circuit neurodegeneration. *J Clin Invest*, 124(7), 3080-3092. doi: 10.1172/JCI72830
- Liu, Z., Zolkiewska, A., & Zolkiewski, M. (2003). Characterization of human torsinA and its dystonia-associated mutant form. *Biochem J*, 374(Pt 1), 117-122. doi: 10.1042/BJ20030258
- Lowery, L. A., & Van Vactor, D. (2009). The trip of the tip: understanding the growth cone machinery. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 10(5), 332-343. doi: 10.1038/nrm2679
- Lu, W., Yamamoto, V., Ortega, B., & Baltimore, D. (2004). Mammalian Ryk Is a Wnt Coreceptor Required for Stimulation of Neurite Outgrowth. *Cell*, 119(1), 97-108. doi: 10.1016/j.cell.2004.09.019
- Lüdecke, B., Dworniczak, B., & Bartholomé, K. (1995). A point mutation in the tyrosine hydroxylase gene associated with Segawa's syndrome. *Human Genetics*, 95(1), 123-125. doi: 10.1007/BF00225091
- Luong, T. N., Carlisle, H. J., Southwell, A. L., & Patterson, P. H. (2011). Assessment of Motor Balance and Coordination in Mice using the Balance Beam. *J Vis Exp*(49), 2376. doi: 10.3791/2376
- Lyu, J., Yamamoto, V., & Lu, W. (2008). Cleavage of the Wnt receptor Ryk regulates neuronal differentiation during cortical neurogenesis. *Dev Cell*, 15(5), 773-780. doi: 10.1016/j.devcel.2008.10.004
- Maison, C., Pырpasopoulou, A., Theodoropoulos, P. A., & Georgatos, S. D. (1997). The inner nuclear membrane protein LAP1 forms a native complex with B-type lamins and partitions with spindle-associated mitotic vesicles. *EMBO J*, 16(16), 4839-4850. doi: 10.1093/emboj/16.16.4839
- Maric, M., Shao, J., Ryan, R. J., Wong, C. S., Gonzalez-Alegre, P., & Roller, R. J. (2011). A functional role for TorsinA in herpes simplex virus 1 nuclear egress. *J Virol*, 85(19), 9667-9679. doi: 10.1128/JVI.05314-11
- Marras, C., Lohmann, K., Lang, A. E., & Klein, C. (2012). Fixing the broken system of genetic locus symbols: Parkinson disease and dystonia as examples. *Neurology*, 78(13), 1016-1024. doi: 10.1212/WNL.0b013e31824d58ab
- Martella, G., Maltese, M., Nistico, R., Schirinzi, T., Madeo, G., Sciamanna, G., Ponterio, G., Tassone, A., Mandolesi, G., Vanni, V., Pignatelli, M., Bonsi, P., & Pisani, A. (2014). Regional specificity of synaptic plasticity deficits in a knock-in mouse model of DYT1 dystonia. *Neurobiol Dis*, 65, 124-132. doi: 10.1016/j.nbd.2014.01.016
- Martella, G., Tassone, A., Sciamanna, G., Platania, P., Cuomo, D., Viscomi, M. T., Bonsi, P., Cacci, E., Biagioni, S., Usiello, A., Bernardi, G., Sharma, N., Standaert, D. G., & Pisani, A. (2009). Impairment of bidirectional synaptic plasticity in the striatum of a mouse model of DYT1 dystonia: role of endogenous acetylcholine. *Brain*, 132(Pt 9), 2336-2349. doi: 10.1093/brain/awp194
- Masuya, H., Inoue, M., Wada, Y., Shimizu, A., Nagano, J., Kawai, A., Inoue, A., Kagami, T., Hirayama, T., Yamaga, A., Kaneda, H., Kobayashi, K., Minowa, O., Miura, I., Gondo, Y., Noda, T., Wakana, S., & Shiroishi, T. (2005). Implementation of the modified-SHIRPA protocol for screening of dominant phenotypes in a large-scale ENU mutagenesis program. *Mammalian Genome*, 16(11), 829-837. doi: 10.1007/s00335-005-2430-8

- 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. *J Neurochem*, 83(4), 846-854.
- McNaught, K. S., Kapustin, A., Jackson, T., Jengelly, T. A., Jnobaptiste, R., Shashidharan, P., Perl, D. P., Pasik, P., & Olanow, C. W. (2004). Brainstem pathology in DYT1 primary torsion dystonia. *Ann Neurol*, 56(4), 540-547. doi: 10.1002/ana.20225
- 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(4), 432-440. doi: 10.1002/mds.20351
- Monani, U. R., Sendtner, M., Coovert, D. D., Parsons, D. W., Andreassi, C., Le, T. T., Jablonka, S., Schrank, B., Rossoll, W., Prior, T. W., Morris, G. E., & Burghes, A. H. (2000). The human centromeric survival motor neuron gene (SMN2) rescues embryonic lethality in *Smn(-/-)* mice and results in a mouse with spinal muscular atrophy. *Hum Mol Genet*, 9(3), 333-339.
- Moon Edley, S., & Herkenham, M. (1984). Comparative development of striatal opiate receptors and dopamine revealed by autoradiography and histofluorescence. *Brain Res*, 305(1), 27-42.
- Muraro, N. I., & Moffat, K. G. (2006). Down-regulation of *torp4a*, encoding the *Drosophila* homologue of torsinA, results in increased neuronal degeneration. *J Neurobiol*, 66(12), 1338-1353. doi: 10.1002/neu.20313
- Naismith, T. V., Dalal, S., & Hanson, P. I. (2009). Interaction of torsinA with its major binding partners is impaired by the dystonia-associated DeltaGAG deletion. *J Biol Chem*, 284(41), 27866-27874. doi: 10.1074/jbc.M109.020164
- Naismith, T. V., Heuser, J. E., Breakefield, X. O., & Hanson, P. I. (2004a). TorsinA in the nuclear envelope. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101(20), 7612-7617. doi: 10.1073/pnas.0308760101
- Naismith, T. V., Heuser, J. E., Breakefield, X. O., & Hanson, P. I. (2004b). TorsinA in the nuclear envelope. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101(20), 7612-7617. doi: 10.1073/pnas.0308760101
- Napolitano, F., Pasqualetti, M., Usiello, A., Santini, E., Pacini, G., Sciamanna, G., Errico, F., Tassone, A., Di Dato, V., Martella, G., Cuomo, D., Fisone, G., Bernardi, G., Mandolesi, G., Mercuri, N. B., Standaert, D. G., & Pisani, A. (2010). Dopamine D2 receptor dysfunction is rescued by adenosine A2A receptor antagonism in a model of DYT1 dystonia. *Neurobiol Dis*, 38(3), 434-445. doi: 10.1016/j.nbd.2010.03.003
- Nery, F. C., Armata, I. A., Farley, J. E., Cho, J. A., Yaqub, U., Chen, P., da Hora, C. C., Wang, Q., Tagaya, M., Klein, C., Tannous, B., Caldwell, K. A., Caldwell, G. A., Lencer, W. I., Ye, Y., & Breakefield, X. O. (2011). TorsinA participates in endoplasmic reticulum-associated degradation. *Nat Commun*, 2, 393-393. doi: 10.1038/ncomms1383
- 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. *J Cell Sci*, 121(Pt 20), 3476-3486. doi: 10.1242/jcs.029454
- Neuwald, A. F., Aravind, L., Spouge, J. L., & Koonin, E. V. (1999). AAA+: A class of chaperone-like ATPases associated with the assembly, operation, and disassembly of protein complexes. *Genome Res*, 9(1), 27-43.
- Neychev, V. K., Fan, X., Mitev, V. I., Hess, E. J., & Jinnah, H. A. (2008). The basal ganglia and cerebellum interact in the expression of dystonic movement. *Brain*, 131(9), 2499-2509. doi: 10.1093/brain/awn168
- Niethammer, M., Carbon, M., Argyelan, M., & Eidelberg, D. (2011). Hereditary dystonia as a neurodevelopmental circuit disorder: Evidence from neuroimaging. *Neurobiol Dis*, 42(2), 202-209. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.nbd.2010.10.010>
- NIH. (1990). Clinical use of botulinum toxin. . *NIH Consensus Statement*, 8.
- Nutt, J. G., & Nygaard, T. G. (2001). Response to levodopa treatment in dopa-responsive dystonia. *Archives of Neurology*, 58(6), 905-910. doi: 10.1001/archneur.58.6.905
- O'Farrell, C., Lockhart, P. J., Lincoln, S., De Lucia, M., Singleton, A. B., Dickson, D. W., & Cookson, M. R. (2004). Biochemical characterization of torsinB. *Brain Res Mol Brain Res*, 127(1-2), 1-9. doi: 10.1016/j.molbrainres.2004.05.005

- O'Farrell, C. A., Martin, K. L., Hutton, M., Delatycki, M. B., Cookson, M. R., & Lockhart, P. J. (2009). Mutant torsinA interacts with tyrosine hydroxylase in cultured cells. *Neuroscience*, *164*(3), 1127-1137. doi: 10.1016/j.neuroscience.2009.09.017
- Ogura, T., & Wilkinson, A. J. (2001). AAA+ superfamily ATPases: common structure--diverse function. *Genes Cells*, *6*(7), 575-597.
- Ohtani, N., Goto, T., Waeber, C., & Bhide, P. G. (2003). Dopamine Modulates Cell Cycle in the Lateral Ganglionic Eminence. *J Neurosci*, *23*(7), 2840-2850.
- Opal, P., Tintner, R., Jankovic, J., Leung, J., Breakefield, X. O., Friedman, J., & Ozelius, L. (2002). Intrafamilial phenotypic variability of the DYT1 dystonia: from asymptomatic TOR1A gene carrier status to dystonic storm. *Mov Disord*, *17*(2), 339-345.
- Ozelius, L., & Lubarr, N. (2014). DYT1 Early-Onset Primary Dystonia. *GeneReviews*®
- Ozelius, L. J., Hewett, J. W., Page, C. E., Bressman, S. B., Kramer, P. L., Shalish, C., de Leon, D., Brin, M. F., Raymond, D., Corey, D. P., Fahn, S., Risch, N. J., Buckler, A. J., Gusella, J. F., & Breakefield, X. O. (1997). The early-onset torsion dystonia gene (DYT1) encodes an ATP-binding protein. *Nat Genet*, *17*(1), 40-48. doi: 10.1038/ng0997-40
- Ozelius, L. J., Hewett, J. W., Page, C. E., Bressman, S. B., Kramer, P. L., Shalish, C., de Leon, D., Brin, M. F., Raymond, D., Jacoby, D., Penney, J., Risch, N. J., Fahn, S., Gusella, J. F., & Breakefield, X. O. (1998). The gene (DYT1) for early-onset torsion dystonia encodes a novel protein related to the Clp protease/heat shock family. *Adv Neurol*, *78*, 93-105.
- Ozelius, L. J., Page, C. E., Klein, C., Hewett, J. W., Mineta, M., Leung, J., Shalish, C., Bressman, S. B., de Leon, D., Brin, M. F., Fahn, S., Corey, D. P., & Breakefield, X. O. (1999). The TOR1A (DYT1) Gene Family and Its Role in Early Onset Torsion Dystonia. *Genomics*, *62*(3), 377-384. doi: <http://dx.doi.org/10.1006/geno.1999.6039>
- Page, M. E., Bao, L., Andre, P., Pelta-Heller, J., Sluzas, E., Gonzalez-Alegre, P., Bogush, A., Khan, L. E., Iacovitti, L., Rice, M. E., & Ehrlich, M. E. (2010). Cell-autonomous alteration of dopaminergic transmission by wild type and mutant (DeltaE) TorsinA in transgenic mice. *Neurobiol Dis*, *39*(3), 318-326. doi: 10.1016/j.nbd.2010.04.016
- Pappas, S. S., Darr, K., Holley, S. M., Cepeda, C., Mabrouk, O. S., Wong, J.-M. T., LeWitt, T. M., Paudel, R., Houlden, H., Kennedy, R. T., Levine, M. S., & Dauer, W. T. (2015). Forebrain deletion of the dystonia protein torsinA causes dystonic-like movements and loss of striatal cholinergic neurons. *Elife*, *4*, e08352. doi: 10.7554/eLife.08352
- Paudel, R., Hardy, J., Revesz, T., Holton, J. L., & Houlden, H. (2012). Review: genetics and neuropathology of primary pure dystonia. *Neuropathol Appl Neurobiol*, *38*(6), 520-534. doi: 10.1111/j.1365-2990.2012.01298.x
- Paudel, R., Kiely, A., Li, A., Lashley, T., Bandopadhyay, R., Hardy, J., Jinnah, H. A., Bhatia, K., Houlden, H., & Holton, J. L. (2014). Neuropathological features of genetically confirmed DYT1 dystonia: investigating disease-specific inclusions. *Acta Neuropathol Commun*, *2*(1), 159. doi: 10.1186/s40478-014-0159-x
- Paus, T. Mapping brain maturation and cognitive development during adolescence. *Trends in Cognitive Sciences*, *9*(2), 60-68. doi: 10.1016/j.tics.2004.12.008
- Pisani, A., Martella, G., Tscherter, A., Bonsi, P., Sharma, N., Bernardi, G., & Standaert, D. G. (2006). Altered responses to dopaminergic D2 receptor activation and N-type calcium currents in striatal cholinergic interneurons in a mouse model of DYT1 dystonia. *Neurobiol Dis*, *24*(2), 318-325. doi: 10.1016/j.nbd.2006.07.006
- Pittman, R. N., Wang, S., DiBenedetto, A. J., & Mills, J. C. (1993). A system for characterizing cellular and molecular events in programmed neuronal cell death. *J Neurosci*, *13*(9), 3669-3680.
- Popolo, M., McCarthy, D. M., & Bhide, P. G. (2004). Influence of Dopamine on Precursor Cell Proliferation and Differentiation in the Embryonic Mouse Telencephalon. *Dev Neurosci*, *26*(2-4), 229-244. doi: 10.1159/000082140
- Richter, J. D. (2001). Think globally, translate locally: what mitotic spindles and neuronal synapses have in common. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *98*(13), 7069-7071. doi: 10.1073/pnas.111146498
- Riddle, R., & Pollock, J. D. (2003). Making connections: the development of mesencephalic dopaminergic neurons. *Developmental Brain Research*, *147*(1-2), 3-21. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.devbrainres.2003.09.010>

- Risch, N. J., Bressman, S. B., deLeon, D., Brin, M. F., Burke, R. E., Greene, P. E., Shale, H., Claus, E. B., Cupples, L. A., & Fahn, S. (1990). Segregation analysis of idiopathic torsion dystonia in Ashkenazi Jews suggests autosomal dominant inheritance. *Am J Hum Genet*, *46*(3), 533-538.
- Risch, N. J., Bressman, S. B., Senthil, G., & Ozelius, L. J. (2007). Intragenic Cis and Trans Modification of Genetic Susceptibility in DYT1 Torsion Dystonia. *American Journal of Human Genetics*, *80*(6), 1188-1193.
- Rose, A., & Schlieker, C. (2012). Alternative nuclear transport for cellular protein quality control. *Trends in Cell Biology*, *22*(10), 509-514. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tcb.2012.07.003>
- Rossoll, W., Jablonka, S., Andreassi, C., Kroning, A. K., Karle, K., Monani, U. R., & Sendtner, M. (2003). Smn, the spinal muscular atrophy-determining gene product, modulates axon growth and localization of beta-actin mRNA in growth cones of motoneurons. *J Cell Biol*, *163*(4), 801-812. doi: 10.1083/jcb.200304128
- Rostasy, K., Augood, S. J., Hewett, J. W., Leung, J. C., Sasaki, H., Ozelius, L. J., Ramesh, V., Standaert, D. G., Breakefield, X. O., & Hedreen, J. C. (2003). TorsinA protein and neuropathology in early onset generalized dystonia with GAG deletion. *Neurobiol Dis*, *12*(1), 11-24.
- Rupniak, N. M., Jenner, P., & Marsden, C. D. (1986). Acute dystonia induced by neuroleptic drugs. *Psychopharmacology (Berl)*, *88*(4), 403-419.
- Saeki, Y., & Tanaka, K. (2012). Assembly and Function of the Proteasome. In R. J. Dohmen & M. Scheffner (Eds.), *Ubiquitin Family Modifiers and the Proteasome* (Vol. 832, pp. 315-337): Humana Press.
- Santos, M., Costa, P., Martins, F., da Cruz e Silva, E. F., da Cruz e Silva, O. B., & Rebelo, S. (2015). LAP1 is a crucial protein for the maintenance of the nuclear envelope structure and cell cycle progression. *Molecular and Cellular Biochemistry*, *399*(1-2), 143-153. doi: 10.1007/s11010-014-2241-x
- Sciamanna, G., Bonsi, P., Tassone, A., Cuomo, D., Tschertner, A., Viscomi, M. T., Martella, G., Sharma, N., Bernardi, G., Standaert, D. G., & Pisani, A. (2009). Impaired striatal D2 receptor function leads to enhanced GABA transmission in a mouse model of DYT1 dystonia. *Neurobiol Dis*, *34*(1), 133-145. doi: 10.1016/j.nbd.2009.01.001
- Sciamanna, G., Hollis, R., Ball, C., Martella, G., Tassone, A., Marshall, A., Parsons, D., Li, X., Yokoi, F., Zhang, L., Li, Y., Pisani, A., & Standaert, D. G. (2012). Cholinergic dysregulation produced by selective inactivation of the dystonia-associated protein torsinA. *Neurobiol Dis*, *47*(3), 416-427. doi: 10.1016/j.nbd.2012.04.015
- Segawa, M. (2000). Hereditary progressive dystonia with marked diurnal fluctuation. *Brain and Development*, *22*, 65-80. doi: 10.1016/S0387-7604(00)00148-0
- Sharma, N., Hewett, J., Ozelius, L. J., Ramesh, V., McLean, P. J., Breakefield, X. O., & Hyman, B. T. (2001). A close association of torsinA and alpha-synuclein in Lewy bodies: a fluorescence resonance energy transfer study. *Am J Pathol*, *159*(1), 339-344.
- Shashidharan, P., Good, P. F., Hsu, A., Perl, D. P., Brin, M. F., & Olanow, C. W. (2000a). TorsinA accumulation in Lewy bodies in sporadic Parkinson's disease. *Brain Res*, *877*(2), 379-381.
- Shashidharan, P., Kramer, B. C., Walker, R. H., Olanow, C. W., & Brin, M. F. (2000b). Immunohistochemical localization and distribution of torsinA in normal human and rat brain. *Brain Res*, *853*(2), 197-206.
- 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. *J Neurochem*, *88*(4), 1019-1025.
- Shashidharan, P., Sandu, D., Potla, U., Armata, I. A., Walker, R. H., McNaught, K. S., Weisz, D., Sreenath, T., Brin, M. F., & Olanow, C. W. (2005). Transgenic mouse model of early-onset DYT1 dystonia. *Hum Mol Genet*, *14*(1), 125-133. doi: 10.1093/hmg/ddi012
- Sheth, A. N., McKee, M. L., & Bhide, P. G. (1998). The sequence of formation and development of corticostriate connections in mice. *Dev Neurosci*, *20*(2-3), 98-112.
- Siebert, S., Bahn, E., Kramer, M. L., Schulz-Schaeffer, W. J., Hewett, J. W., Breakefield, X. O., Hedreen, J. C., & Rostasy, K. M. (2005). TorsinA expression is detectable in human infants as young as 4 weeks old. *Brain Res Dev Brain Res*, *157*(1), 19-26. doi: 10.1016/j.devbrainres.2005.02.019
- Slominsky, P. A., Markova, E. D., Shadrina, M. I., Illarioshkin, S. N., Miklina, N. I., Limborska, S. A., & Ivanova-Smolenskaya, I. A. (1999). A common 3-bp deletion in the DYT1 gene in Russian

- families with early-onset torsion dystonia. *Hum Mutat*, 14(3), 269. doi: 10.1002/(SICI)1098-1004(1999)14:3<269::AID-HUMU12>3.0.CO;2-9
- Smith, P. K., Krohn, R. I., Hermanson, G. T., Mallia, A. K., Gartner, F. H., Provenzano, M. D., Fujimoto, E. K., Goeke, N. M., Olson, B. J., & Klenk, D. C. (1985). Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Analytical Biochemistry*, 150(1), 76-85. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/0003-2697\(85\)90442-7](http://dx.doi.org/10.1016/0003-2697(85)90442-7)
- Snapp, E. L., Hegde, R. S., Francolini, M., Lombardo, F., Colombo, S., Pedrazzini, E., Borgese, N., & Lippincott-Schwartz, J. (2003). Formation of stacked ER cisternae by low affinity protein interactions. *J Cell Biol*, 163(2), 257-269. doi: 10.1083/jcb.200306020
- Snider, J., Thibault, G., & Houry, W. A. (2008). The AAA+ superfamily of functionally diverse proteins. *Genome Biol*, 9(4), 216. doi: 10.1186/gb-2008-9-4-216
- Song, C. H., Bernhard, D., Bolarinwa, C., Hess, E. J., Smith, Y., & Jinnah, H. A. (2013). Subtle microstructural changes of the striatum in a DYT1 knock-in mouse model of dystonia. *Neurobiol Dis*, 54, 362-371. doi: 10.1016/j.nbd.2013.01.008
- Song, C. H., Bernhard, D., Hess, E. J., & Jinnah, H. A. (2014). Subtle microstructural changes of the cerebellum in a knock-in mouse model of DYT1 dystonia. *Neurobiol Dis*, 62, 372-380. doi: 10.1016/j.nbd.2013.10.003
- Song, C. H., Fan, X., Exeter, C. J., Hess, E. J., & Jinnah, H. A. (2012). Functional analysis of dopaminergic systems in a DYT1 knock-in mouse model of dystonia. *Neurobiol Dis*, 48(1), 66-78. doi: 10.1016/j.nbd.2012.05.009
- Sosa, B. A., Demircioglu, F. E., Chen, J. Z., Ingram, J., Ploegh, H. L., & Schwartz, T. U. (2014). How lamina-associated polypeptide 1 (LAP1) activates Torsin. *Elife*, 3, e03239. doi: 10.7554/eLife.03239
- Southwell, A. L., Warby, S. C., Carroll, J. B., Doty, C. N., Skotte, N. H., Zhang, W., Villanueva, E. B., Kovalik, V., Xie, Y., Pouladi, M. A., Collins, J. A., Yang, X. W., Franciosi, S., & Hayden, M. R. (2013). A fully humanized transgenic mouse model of Huntington disease. *Hum Mol Genet*, 22(1), 18-34. doi: 10.1093/hmg/ddc397
- Specht, L. A., Pickel, V. M., Joh, T. H., & Reis, D. J. (1981). Light-microscopic immunocytochemical localization of tyrosine hydroxylase in prenatal rat brain. I. Early ontogeny. *J Comp Neurol*, 199(2), 233-253. doi: 10.1002/cne.901990207
- Speese, S. D., Ashley, J., Jokhi, V., Nunnari, J., Barria, R., Li, Y., Ataman, B., Koon, A., Chang, Y. T., Li, Q., Moore, M. J., & Budnik, V. (2012). Nuclear envelope budding enables large ribonucleoprotein particle export during synaptic Wnt signaling. *Cell*, 149(4), 832-846. doi: 10.1016/j.cell.2012.03.032
- Starr, D. A. (2007). Communication between the cytoskeleton and the nuclear envelope to position the nucleus. *Molecular bioSystems*, 3(9), 583-589. doi: 10.1039/b703878j
- Stocco, A., Lebiere, C., & Anderson, J. R. (2010). Conditional Routing of Information to the Cortex: A Model of the Basal Ganglia's Role in Cognitive Coordination. *Psychological review*, 117(2), 541-574. doi: 10.1037/a0019077
- Swenson, R. S. (2006). *Review of Clinical and Functional Neuroscience*
- Switonski, P. M., Szlachcic, W. J., Krzyzosiak, W. J., & Figiel, M. (2015). A new humanized ataxin-3 knock-in mouse model combines the genetic features, pathogenesis of neurons and glia and late disease onset of SCA3/MJD. *Neurobiol Dis*, 73, 174-188. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.nbd.2014.09.020>
- Tanabe, L. M., Martin, C., & Dauer, W. T. (2012). Genetic background modulates the phenotype of a mouse model of DYT1 dystonia. *PLoS One*, 7(2), e32245. doi: 10.1371/journal.pone.0032245
- Tanida, I., Ueno, T., & Kominami, E. (2008). LC3 and Autophagy. In V. Deretic (Ed.), *Autophagosome and Phagosome* (Vol. 445, pp. 77-88): Humana Press.
- Tepper, J. M., Sharpe, N. A., Koos, T. Z., & Trent, F. (1998). Postnatal development of the rat neostriatum: electrophysiological, light- and electron-microscopic studies. *Dev Neurosci*, 20(2-3), 125-145.
- Thompson, M. L., Chen, P., Yan, X., Kim, H., Borom, A. R., Roberts, N. B., Caldwell, K. A., & Caldwell, G. A. (2014). TorsinA rescues ER-associated stress and locomotive defects in *C. elegans* models of ALS. *Dis Model Mech*, 7(2), 233-243. doi: 10.1242/dmm.013615
- 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. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101(44), 15650-15655. doi: 10.1073/pnas.0308088101
- Vale, R. D. (2000). AAA proteins. Lords of the ring. *J Cell Biol*, 150(1), F13-19.
- Valente, E. M., Warner, T. T., Jarman, P. R., Mathen, D., Fletcher, N. A., Marsden, C. D., Bhatia, K. P., & Wood, N. W. (1998). *The role of DYT1 in primary torsion dystonia in Europe* (Vol. 121).
- Vander Heyden, A. B., Naismith, T. V., Snapp, E. L., Hodzic, D., & Hanson, P. I. (2009). LULL1 retargets TorsinA to the nuclear envelope revealing an activity that is impaired by the DYT1 dystonia mutation. *Mol Biol Cell*, 20(11), 2661-2672. doi: 10.1091/mbc.E09-01-0094
- Vanni, V., Puglisi, F., Bonsi, P., Ponterio, G., Maltese, M., Pisani, A., & Mandolesi, G. (2015). Cerebellar synaptogenesis is compromised in mouse models of DYT1 dystonia. *Exp Neurol*, 271, 457-467. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.expneurol.2015.07.005>
- Vasudevan, A., Breakefield, X. O., & Bhide, P. G. (2006). Developmental patterns of torsinA and torsinB expression. *Brain Res*, 1073-1074, 139-145. doi: 10.1016/j.brainres.2005.12.087
- Vulinovic, F., Lohmann, K., Rakovic, A., Capetian, P., Alvarez-Fischer, D., Schmidt, A., Weissbach, A., Erogullari, A., Kaiser, F. J., Wieggers, K., Ferbert, A., Rolfs, A., Klein, C., & Seibler, P. (2014). Unraveling cellular phenotypes of novel TorsinA/TOR1A mutations. *Hum Mutat*, 35(9), 1114-1122. doi: 10.1002/humu.22604
- Walker, R. H., Brin, M. F., Sandu, D., Good, P. F., & Shashidharan, P. (2002). TorsinA immunoreactivity in brains of patients with DYT1 and non-DYT1 dystonia. *Neurology*, 58(1), 120-124.
- Walker, R. H., Brin, M. F., Sandu, D., Gujjari, P., Hof, P. R., Warren Olanow, C., & Shashidharan, P. (2001). Distribution and immunohistochemical characterization of torsinA immunoreactivity in rat brain. *Brain Res*, 900(2), 348-354.
- Walker, R. H., Good, P. F., & Shashidharan, P. (2003). TorsinA immunoreactivity in inclusion bodies in trinucleotide repeat diseases. *Mov Disord*, 18(9), 1041-1044. doi: 10.1002/mds.10487
- Wright, R., Basson, M., D'Ari, L., & Rine, J. (1988). Increased amounts of HMG-CoA reductase induce "karmellae": a proliferation of stacked membrane pairs surrounding the yeast nucleus. *J Cell Biol*, 107(1), 101-114.
- Xiao, J., Gong, S., Zhao, Y., & LeDoux, M. S. (2004). Developmental expression of rat torsinA transcript and protein. *Brain Res Dev Brain Res*, 152(1), 47-60. doi: 10.1016/j.devbrainres.2004.05.012
- Yokoi, F., Cheetham, C. C., Campbell, S. L., Sweatt, J. D., & Li, Y. (2013). Pre-synaptic release deficits in a DYT1 dystonia mouse model. *PLoS One*, 8(8), e72491. doi: 10.1371/journal.pone.0072491
- Yokoi, F., Dang, M. T., Li, J., Standaert, D. G., & Li, Y. (2011). Motor deficits and decreased striatal dopamine receptor 2 binding activity in the striatum-specific Dyt1 conditional knockout mice. *PLoS One*, 6(9), e24539. doi: 10.1371/journal.pone.0024539
- Yokoi, F., Dang, M. T., Liu, J., Gandre, J. R., Kwon, K., Yuen, R., & Li, Y. (2015). Decreased dopamine receptor 1 activity and impaired motor-skill transfer in Dyt1 DeltaGAG heterozygous knock-in mice. *Behav Brain Res*, 279, 202-210. doi: 10.1016/j.bbr.2014.11.037
- Yokoi, F., Dang, M. T., Mitsui, S., Li, J., & Li, Y. (2008). Motor deficits and hyperactivity in cerebral cortex-specific Dyt1 conditional knockout mice. *J Biochem*, 143(1), 39-47. doi: 10.1093/jb/mvm191
- Yu-Taeger, L., Petrasch-Parwez, E., Osmand, A. P., Redensek, A., Metzger, S., Clemens, L. E., Park, L., Howland, D., Calaminus, C., Gu, X., Pichler, B., Yang, X. W., Riess, O., & Nguyen, H. P. (2012). A novel BACHD transgenic rat exhibits characteristic neuropathological features of Huntington disease. *J Neurosci*, 32(44), 15426-15438. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1148-12.2012
- Zeman, W., & Dyken, P. (1967). Dystonia musculorum deformans. Clinical, genetic and pathoanatomical studies. *Psychiatr Neurol Neurochir*, 70(2), 77-121.
- Zhao, C., Brown, R. S., Chase, A. R., Eisele, M. R., & Schlieker, C. (2013). Regulation of Torsin ATPases by LAP1 and LULL1. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 110(17), E1545-1554. doi: 10.1073/pnas.1300676110
- Zhao, Y., DeCuypere, M., & LeDoux, M. S. (2008). Abnormal motor function and dopamine neurotransmission in DYT1 DeltaGAG transgenic mice. *Exp Neurol*, 210(2), 719-730. doi: 10.1016/j.expneurol.2007.12.027

- Zhu, L., Millen, L., Mendoza, J. L., & Thomas, P. J. (2010). A unique redox-sensing sensor II motif in TorsinA plays a critical role in nucleotide and partner binding. *J Biol Chem*, 285(48), 37271-37280. doi: 10.1074/jbc.M110.123471
- 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(12), 1327-1330. doi: 10.1136/jnnp.2008.148270

7 Danksagung

Ohne Hilfe wäre diese Arbeit bestimmt nicht möglich gewesen, daher gilt mein Dank:

- Prof. Dr. Olaf Rieß für die Möglichkeit diese Dissertation im Institut für Medizinische Genetik und Angewandte Genomik durchzuführen.
- Prof. Dr. Thomas Gasser für die Übernahme der Zweitkorrektur.
- Dr. Kathrin Grundmann-Hauser für die Bereitstellung des Themas dieser Dissertation sowie der Betreuung und den (zweifellos nicht immer einfachen) Diskussionen.
- Dr. Thomas Ott ebenfalls für die konstruktiven Diskussionen über den Verlauf dieses Projektes, sowie für die Hilfe bei der Korrektur.
- Dem Team im Hertie-Institut: Larissa Lotzer, Tina Rönisch, Dr. Fubo Cheng, Dr. Natalia Funk und Marita Munz für praktische Hilfe, Motivation und Kuchen.
- Dr. Jeanette Hübener-Schmid für die Geduld mir etwas über Mäuse beizubringen.
- Dr. Nicolas Casadei für seine Hilfe bei verschiedenen Verhaltenstests.
- Dr. Thomas Hentrich für die Hilfe bei der Erstellung der linearen Regressionsanalyse.
- Birgit Fehrenbacher und das Team der EM Core Facility für die genialen EM-Bilder.
- Das Team in der Frauenklinik für konstruktive Gespräche und praktische Tipps.
- Meiner Familie und Freunden für die anhaltende Unterstützung und Motivation diesen Weg zu gehen.