

Aus dem
Friedrich-Baur-Institut an der Neurologischen Klinik und Poliklinik
Klinik der Universität München
Direktor: Prof. Dr. Günter Höglinger

Untersuchungen zur Pathophysiologie der PRDM12-assoziierten angeborenen Schmerzunempfindlichkeit

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Philip Wolfgang Harrer

aus

Singen (Hohentwiel)

2023

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. Jan Senderek

Mitberichterstatter: PD Dr. Beate Averbeck
Prof. Dr. Gustav Schelling

**Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter:** Dr. Rolf Stucka

Dekan: Prof. Dr. Thomas Gudermann

Tag der mündlichen Prüfung: 30.11.2023

Inhaltsverzeichnis

| | |
|--|-----------|
| Inhaltsverzeichnis | 3 |
| Zusammenfassung..... | 5 |
| Abstract..... | 7 |
| 1. Einleitung..... | 9 |
| 1.1 Physiologische Grundlagen der Nozizeption | 9 |
| 1.2 Entwicklung von Nozizeptoren..... | 10 |
| 1.3 Monogen erbliche Störungen des Schmerzempfindens | 11 |
| 1.4 PRDM12-assoziierte congenital insensitivity to pain (CIP)..... | 12 |
| 1.5 Struktur und Funktion von PRDM12 | 14 |
| 2. Ziele der Arbeit..... | 17 |
| 3. Materialien und Methoden..... | 18 |
| 3.1 Polymerase-Ketten-Reaktion (polymerase chain reaction, PCR)..... | 18 |
| 3.2 Agarose-Gelelektrophorese und Gelextraktion..... | 18 |
| 3.3 DNA-Sequenzierung (Sanger-Methode)..... | 19 |
| 3.4 Genotypisierung von Mauslinien..... | 19 |
| 3.5 Expressionskonstrukte | 20 |
| 3.6 Topoisomerase-basierte Klonierung von PCR-Fragmenten..... | 22 |
| 3.7 Subklonierung in Expressionsvektoren..... | 23 |
| 3.8 Transformation von Plasmid-DNA in Bakterien | 23 |
| 3.9 Bakterienkultur und Isolation von Plasmid-DNA | 24 |
| 3.10 Eukaryotische Zellkultur | 24 |
| 3.11 Transiente Transfektion eukaryotischer Zellen..... | 25 |
| 3.12 Proteinisolation aus eukaryotischen Zellkulturen..... | 25 |
| 3.13 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) | 26 |
| 3.14 Western-Blot (Immunoblot) | 26 |
| 3.15 Co-Immunpräzipitation..... | 27 |
| 3.16 Immunfluoreszenzmikroskopie an Zellkulturen..... | 27 |
| 3.17 Reportergenassay..... | 28 |
| 3.18 Gewebereinbettung und Gefrierschnitte | 29 |
| 3.19 Immunofluoreszenzmikroskopie von Gefrierschnitten | 29 |
| 4. Ergebnisse..... | 30 |
| 4.1 Etablierung eines PRDM12-defizienten Mausmodells | 30 |
| 4.1.1 Ausgangsallele <i>Prdm12^{tm2a}</i> | 31 |
| 4.1.2 LacZ Reporter- und Knockout-Allel <i>Prdm12^{tm2b}</i> | 32 |
| 4.1.3 Allel mit konditionalem Potential <i>Prdm12^{tm2c}</i> | 34 |
| 4.1.4 Knockout-Allel <i>Prdm12^{tm2d}</i> | 36 |
| 4.2 Untersuchung des PRDM12-defizienten Mausmodells | 37 |

| | | |
|-----------|---|-----------|
| 4.2.1 | Makroskopische Untersuchung von Mausembryonen..... | 37 |
| 4.2.2 | Orientierende Untersuchung der Spinalganglien in Mausembryonen..... | 38 |
| 4.3 | Funktionelle Analyse des Transkriptionsfaktors PRDM12..... | 41 |
| 4.3.1 | Nachweis der Repressoraktivität von PRDM12..... | 41 |
| 4.3.2 | Interaktion von PRDM12 mit anderen Proteinen..... | 42 |
| 5. | Diskussion..... | 49 |
| | Literaturverzeichnis..... | 55 |
| | Abbildungsverzeichnis..... | 59 |
| | Danksagung..... | 60 |
| | Affidavit..... | 61 |
| | Publikationsliste..... | 62 |
| | Lebenslauf..... | 63 |

Zusammenfassung

Das Schmerzempfinden ist unerlässlich für die Aufrechterhaltung der Integrität des Körpers. Während die molekularen Mechanismen, die die Differenzierung der verschiedenen Subtypen nozizeptiver Neurone steuern, zunehmend verstanden werden, sind die Faktoren, die bei der Initiierung der nozizeptiven Linie entscheidend sind, noch weitgehend unbekannt. Biallelische Varianten im humanen *PRDM12*-Gen verursachen eine seltene autosomal-rezessiv erbliche Erkrankung, bei der es zu einem angeborenen Fehlen des Schmerzempfindens kommt (congenital insensitivity to pain, CIP). Andere sensible Modalitäten (leichte Berührung, Vibration und Propriozeption), autonome Funktionen sowie Geruchs- und Hörsinn sind nicht eingeschränkt. Nervenbiopsien betroffener Patienten zeigen einen deutlichen Verlust von A δ -Fasern, Hautbiopsien ein vollständiges Fehlen freier dermaler Nervenendigungen.

Um zu klären, ob diese Veränderungen auf einen Defekt in der Entwicklung oder eine rasche Degeneration sensibler Neurone zurückzuführen sind, wurde in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Herrn Professor Roman Chrast (Karolinska Institutet, Stockholm, Schweden) ein Mausmodell etabliert, bei dem die Expression des *Prdm12*-Gens ausgeschaltet wurde. Spinalganglien PRDM12-defizienter Mausembryonen waren im Vergleich zu den Spinalganglien von Wildtyp-Embryonen deutlich kleiner und wiesen weniger Neurone auf. Die weitergehende Untersuchung des Mausmodells durch die Arbeitsgruppe von Herrn Professor Roman Chrast zeigte, dass die beobachtete Größenminderung und verminderte Zellzahl der Spinalganglien auf ein Ausbleiben der Entwicklung der nozizeptiven Linie zurückzuführen ist. Die Entwicklung von Neuronen für andere sensible Modalitäten war hingegen nicht beeinträchtigt.

Einige Mitglieder der PRDM-Proteinfamilie, zu der auch PRDM12 gehört, sind Transkriptionsrepressoren und rekrutieren Co-Transkriptionsfaktoren, um chromatinregulierende Multiproteinkomplexe zu bilden. Unter Verwendung eines heterologen Promotors konnte gezeigt werden, dass PRDM12 ebenfalls dosisabhängig als Transkriptionsrepressor wirkt, wobei diese Funktion durch krankheitsassoziierte PRDM12-Varianten teilweise aufgehoben wird. Mit Hilfe von Immun-

präzipitationsstudien konnte der Co-Transkriptionsfaktor CBFA2T2 als neuer potentieller Interaktionspartner von PRDM12 identifiziert werden. Passend zur angenommenen Interaktion überlappen die zeitlichen und räumlichen Expressionsmuster von *Prdm12* und *Cbfa2t2*, und beide Proteine kolokalisieren in distinkten Strukturen im Zellkern. Darüber hinaus zeigen PRDM12 und CBFA2T2 einen synergistischen Effekt im Sinne einer verstärkten Repression eines heterologen Promotors.

Die Ergebnisse dieser Arbeit weisen auf eine spezifische und essenzielle Funktion von PRDM12 für die Initiierung der gesamten nozizeptiven Linie hin. Mechanistisch scheint PRDM12 als Transkriptionsrepressor zu wirken, möglicherweise in einem Komplex mit dem hier identifizierten Bindungspartner CBFA2T2. In Anbetracht der entscheidenden Rolle von PRDM12 in der Entwicklung von Nozizeptoren ist davon auszugehen, dass die weitergehende Aufklärung der beteiligten molekularen Mechanismen wesentlich zu einem besseren Verständnis der Regulation der sensiblen Neurogenese beitragen wird.

Abstract

The sensation of pain is essential for maintaining the integrity of the body. While the molecular mechanisms that control the differentiation of the various subtypes of nociceptive neurons are increasingly understood, the factors that are critical in initiating the nociceptive lineage are still largely unknown. Biallelic variants in the human *PRDM12* gene cause a rare autosomal recessive inherited disorder in which there is a congenital absence of pain sensation (congenital insensitivity to pain, CIP). Other sensory modalities (light touch, vibration and proprioception), autonomic functions, sense of smell and hearing are not impaired. Nerve and skin biopsies of affected patients show a marked loss of A δ -fibres, skin biopsies a complete absence of free dermal nerve endings.

To clarify whether these changes are due to a defect in the development or a rapid degeneration of sensory neurons, a mouse model was established in cooperation with the research group of Professor Roman Chrast (Karolinska Institutet, Stockholm, Sweden) in which the expression of the *Prdm12* gene was switched off. Spinal ganglia of PRDM12-deficient mouse embryos were significantly smaller and had fewer neurons compared to the spinal ganglia of wild-type embryos. Further investigation of the mouse model by Professor Roman Chrast's research group showed that the observed reduction in size and decreased cell number of the spinal ganglia was due to a failure of the nociceptive lineage to develop. In contrast, the development of neurons for other sensory modalities was not affected.

Some members of the PRDM protein family, which includes PRDM12, are transcriptional repressors and recruit co-transcription factors to form chromatin-regulating multiprotein complexes. Using a heterologous promoter, PRDM12 was also shown to act as a transcriptional repressor in a dose-dependent manner, while this function is partially abrogated by disease-associated PRDM12 variants. With the help of immunoprecipitation studies, the co-transcription factor CBFA2T2 could be identified as a new potential interaction partner of PRDM12. Consistent with the hypothesised interaction, the temporal and spatial expression patterns of *Prdm12* and *Cbfa2t2* overlap, and both proteins colocalise in distinct

structures in the nucleus. Furthermore, PRDM12 and CBFA2T2 show a synergistic effect in terms of enhanced repression of a heterologous promoter.

The results of this work indicate a specific and essential function of PRDM12 for the initiation of the entire nociceptive lineage. Mechanistically, PRDM12 appears to act as a transcriptional repressor, possibly in complex with the binding partner CBFA2T2 identified here. Considering the crucial role of PRDM12 in the development of nociceptors, it can be expected that further elucidation of the molecular mechanisms involved will contribute significantly to a better understanding of the regulation of sensory neurogenesis.

1. Einleitung

Schmerz ist eine Sinneswahrnehmung, deren physiologische Funktion darin besteht, den Körper vor tatsächlich oder potenziell gefährlichen Einflüssen zu warnen und durch reaktive Meidung dieser Reize vor tiefergehender Schädigung zu schützen. Im Gegensatz dazu haben chronische Schmerzzustände, die z. B. bei Nervenverletzungen, Gewebeschädigungen, muskuloskelettalen Erkrankungen, Tumorerkrankungen oder als psychosomatische Störung auftreten, keine offensichtliche Schutzfunktion [1]. Chronische Schmerzen sind mit einer Prävalenz von etwa 19 % in der Allgemeinbevölkerung eine häufige Erkrankung, was zu einer erheblichen Belastung der Gesundheits- und Sozialsysteme führt. Mehr als die Hälfte der Patienten sind nicht mehr in der Lage außerhalb des Hauses zu arbeiten und für etwa 20 % geht die Erkrankung mit einem Verlust des Arbeitsplatzes einher. Obwohl grundlagenorientierte und klinische Forschung über die letzten 200 Jahre hinweg zu einem allgemeinen Verständnis der normalen und gestörten Schmerzmechanismen und zur Etablierung zahlreicher Analgetika und anderer Behandlungskonzepte geführt haben [2], stellt die adäquate Behandlung von Schmerzen weiterhin eine zentrale Herausforderung dar. In einer europaweiten epidemiologischen Untersuchung zu chronischen Schmerzen zeigte sich, dass nur 2 % der Patienten von einem Spezialisten für Schmerztherapie behandelt wurden und nur bei jedem zweiten Patienten eine ausreichende Schmerzkontrolle erreicht wurde [3].

1.1 Physiologische Grundlagen der Nozizeption

Nozizeptoren sind pseudounipolare Neurone, deren Perikarya in den sensiblen Ganglien des Kopfes und entlang des Rückenmarks (Spinalganglien) lokalisiert sind [4]. Ihre langen peripheren Axone enden als freie Nervenendigungen und dienen der Wahrnehmung tatsächlicher oder drohender Gewebeschädigungen. Nozizeptive Nervenendigungen sind in fast jedem Gewebe vorhanden. Die zentralen Axone der Nozizeptoren vermitteln die Weiterleitung der sensiblen Informationen zum Hinterhorn des Rückenmarks. Im Hinblick auf ihre Spezifität lassen sich mechano-, chemo- und thermosensible sowie polymodale Nozizeptoren unterscheiden [5]. Dünn myelinisierte A δ -Fasern leiten schnell (2,5-30 m/s) das primäre Schmerzsignal ins Rückenmark und aktivieren spinale Reflexbögen

(Schutzreflexe). Nicht-myelinisierte C-Fasern leiten deutlich langsamer (< 2.5 m/s) und vermitteln länger anhaltende Schmerzsignale [5].

Im Hinterhorn des Rückenmarks erfolgt die Umschaltung auf das zweite Neuron der Schmerzbahn. Über den Tractus spinothalamicus anterior und lateralis wird das Signal zu den medialen und lateralen Thalamuskernen geleitet, wo nach synaptischer Integration die Weiterleitung über dritte Neurone zum somatosensorischen Kortex und limbischen System erfolgt [4, 5]. Eine Modulation der Schmerzwahrnehmung erfolgt über deszendierende Hemmmechanismen oder periphere und zentrale Sensibilisierung, die mitverantwortlich sind für die Diskrepanz zwischen subjektiver Schmerzwahrnehmung und Reizintensität [4, 5].

1.2 Entwicklung von Nozizeptoren

Nozizeptoren stammen wie die Rezeptoren für Propriozeption und Tastsinn (A-Faser-Mechanorezeptoren mit niedriger Schwelle, A-LTMRs) von Neuralleistenzellen ab. Die Neuralleiste ist eine transiente multipotente Zellpopulation, die an der Übergangszone zwischen Neuralplatte und dem umgebenden Oberflächenektoderm entsteht. Zum Zeitpunkt des Neuralrohrschlusses beginnen die Zellen den Transkriptionsfaktor SOX10 zu exprimieren, wandern aus dem Neuralrohr aus und entwickeln sich zu verschiedenen Zelltypen, darunter Knorpel, Knochen und Bindegewebe des Kopfes, Nebennierenmarkzellen, Melanozyten der Haut sowie das sensible und vegetative Nervensystem [6].

Im Bereich der späteren sensiblen Ganglien entstehen aus den eingewanderten Neuralleistenzellen Gliazellen und Neurone. Die sensible Neurogenese verläuft in zwei Wellen, in denen die proneuralen Transkriptionsfaktoren Neurogenin (Ngn) 2 (1. Welle, in der Maus an Embryonaltag (E) 10-E11) bzw. Ngn1 (2. Welle, in der Maus an E11-E13) die neuronale Identität der Vorläuferzellen festlegen [7]. Der überwiegende Anteil der späteren Nozizeptoren entstammt dabei der 2. Welle der Neurogenese in den sensiblen Ganglien. In der weiteren Entwicklung ist die nozizeptive Linie durch die Expression von Tropomyosinrezeptor-Kinase A (TRKA) gekennzeichnet, während die A-LTMR-Linie die Tropomyosinrezeptor-Kinasen C (TRKC), B (TRKB) oder RET exprimiert [8]. Durch nachfolgende Differenzierungsschritte kommt es zur Spezialisierung der Nozizeptoren

für verschiedene Modalitäten. In den Spinalganglien machen Nozizeptoren etwa 80 % der Neurone aus.

Während die molekularen Programme, die die Differenzierung der verschiedenen Subtypen von nozizeptiven Neuronen steuern, zunehmend besser verstanden werden [8], sind die Mechanismen, die für die Initiierung der nozizeptiven Linie verantwortlich sind, noch weitgehend unbekannt.

1.3 Monogen erbliche Störungen des Schmerzempfindens

In den vergangenen zwei Jahrzehnten konnten die molekularen Ursachen einiger seltener monogener Schmerzstörungen wie der familiären hemiplegischen Migräne [9], der Erythromelalgie [10], der paroxysmalen extremen Schmerzstörung [11] oder des familiären episodischen Schmerzsyndroms [12] aufgeklärt werden. Durch die Kenntnis der verantwortlichen Gene bzw. Genprodukte konnten dabei auch neue Einblicke in die molekularen und zellulären Prozesse der Nozizeption gewonnen werden. Genetische Varianten können jedoch nicht nur zu Erkrankungen mit einer gesteigerten, sondern auch mit verminderter oder fehlender Schmerzempfindlichkeit führen [13]. Hierzu gehören die hereditären sensiblen und autonomen Neuropathien (HSAN) und die angeborene Schmerzunempfindlichkeit (englisch: Congenital insensitivity to pain, CIP).

Bei den Patienten kommt es wiederholt zu unbemerkten Druckgeschwüren, Verbrennungen, Knochenbrüchen und anderen Verletzungen. Bei Kindern mit einer angeborenen oder früh einsetzenden Krankheit besteht ein hohes Risiko für selbstverletzendes Verhalten, z. B. Bissverletzungen an Zunge, Lippen und Fingern. Pathophysiologisch liegen Entwicklungsdefekte, eine frühzeitige Degeneration oder eine gestörte Funktion sensibler Neurone zu Grunde [14]. Ursächliche genetische Varianten wurden insbesondere in funktionellen Kandidatengenen identifiziert, die die Entwicklung von sensiblen Neuronen und insbesondere Nozizeptoren steuern (z. B. *NTRK1*, das für TRKA codiert [15]), für die Homöostase von Axonen wichtig sind (z. B. *RAB7*, das den retrograden axonalen Transport reguliert [16]) oder für die Aktivität von Nozizeptoren erforderlich sind (z. B. *SCN9A*, das für eine Untereinheit des spannungsgesteuerten Natriumkanals Nav1.7 codiert [17]).

1.4 PRDM12-assoziierte congenital insensitivity to pain (CIP)

Biallelische Varianten im humanen *PRDM12*-Gen (NM_021619.2) wurden erstmals 2015 als Ursache einer autosomal-rezessiv erblichen CIP berichtet. Insgesamt wurden bei Patienten aus elf nicht verwandten Familien homozygote *PRDM12*-Mutationen entdeckt [18]. Das humane *PRDM12*-Gen umfasst fünf Exone, die das 367 Aminosäuren lange Protein PRDM12 kodieren. Das Protein verfügt über eine PR-Domäne, drei Zinkfinger motive und eine C-terminale Polyalanin-Wiederholungssequenz (**Abb. 1**). Die bei Patienten nachgewiesenen Mutationen betrafen verschiedene Proteinregionen, veränderten stark konservierte Aminosäurereste und wurden von bioinformatischen Vorhersageprogrammen alle als pathogen eingestuft.

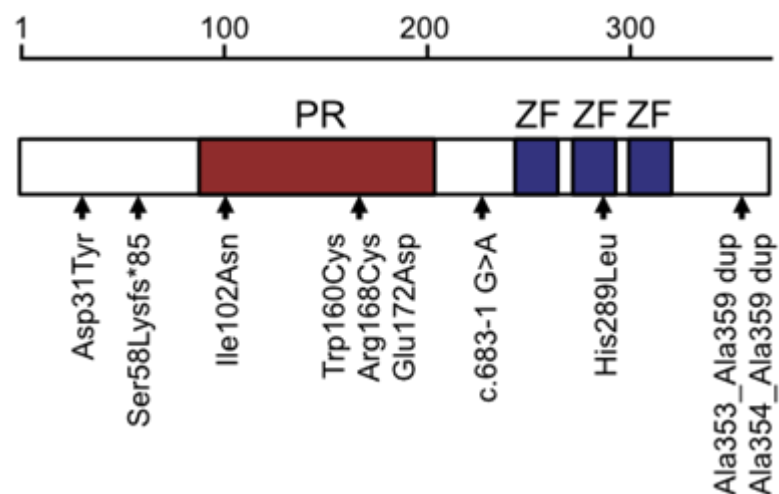


Abb. 1: PRDM12-Varianten bei CIP-Patienten

Schematische Darstellung des PRDM12-Proteins und Lokalisation von CIP-assoziierten Varianten. PR – PR-Domäne; ZF – Zinkfingermotiv. Die angegebenen Zahlen beziehen sich auf die Aminosäure-Positionen. Abbildung modifiziert nach Chen *et al.*, 2015 [18].

Klinisch zeigten die betroffenen Personen eine angeborene Schmerzunempfindlichkeit, die mit mutilierenden Läsionen der Zunge, Lippen und Finger infolge selbst zugefügter Bissverletzungen einherging. Durch das Fehlen von Schmerz als Warnsignal kam es in der Folge zu Selbstverletzungen, Verbrennungen, wiederholten Frakturen und anderen unbemerkten, traumatischen Läsionen (**Abb. 2**). Die Wahrnehmung von leichten Berührungen, Pallästhesie und Lage-sinn waren nicht eingeschränkt; autonome Funktionen, Geruchs- und Hörsinn

waren ebenfalls unauffällig. Heterozygote Anlageträger wiesen keine Symptome auf.

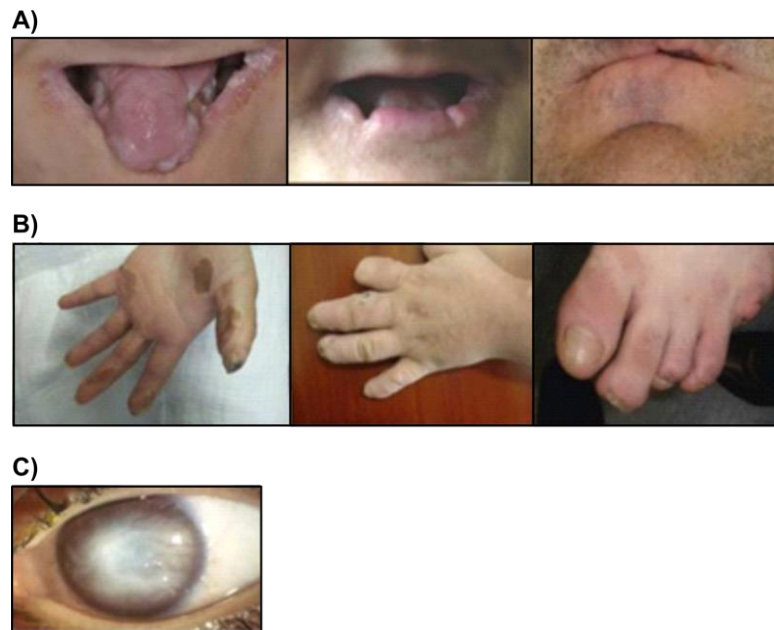


Abb. 2: Auswirkungen einer PRDM12-Defizienz beim Menschen

(A) Mutilationen an den Lippen und der Zunge infolge von selbst zugefügten Bissverletzungen. (B) Läsionen und Narbenbildung an Fingern und Zehen. (C) Ulzeration der Hornhaut durch ständiges Augenreiben. Abbildung modifiziert nach Chen *et al.*, 2015 [18].

Die lichtmikroskopische Untersuchung von archivierten Nervenbiopsien (N. suralis) betroffener Patienten zeigte einen deutlichen Verlust von A δ -Fasern. Die Zahl großkalibriger Axone für andere sensible Modalitäten war hingegen unverändert. Unbemarkte C-Fasern konnten in den Biopsien nicht beurteilt werden, da an den Präparaten keine elektronenmikroskopischen Untersuchungen durchgeführt worden waren. Hautbiopsien zeigten ein vollständiges Fehlen freier dermaler Nervenendigungen (**Abb. 3**).

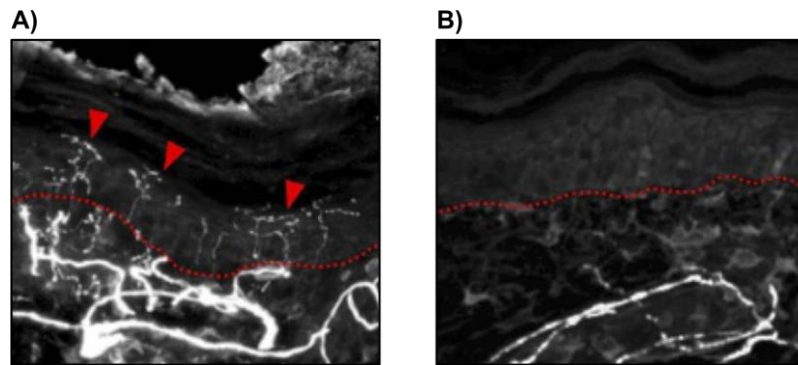


Abb. 3: Hautbiopsien eines Patienten mit PRDM12-assoziiierter CIP und einer nicht-betroffenen Kontrollperson

Neurone wurden mit einem Antikörper gegen PGP9.5 (pan-neuronaler Marker) markiert. In einer Biopsie des gesunden Spenders (**A**) sind zahlreiche intraepidermale Nervenendigungen (rote Pfeilspitzen) zu erkennen. In der Biopsie der betroffenen Person (**B**) überquerten die Nervenfasern nicht die dermoepidermale Junctionszone (rote gestrichelte Linie). Abbildung modifiziert nach Chen *et al.*, 2015 [18].

In Mausembryonen wird *Prdm12* zum Zeitpunkt der Entstehung (E10,5-E13,5) und Differenzierung (ab E14,5) sensibler Neurone [19] in den sich entwickelnden kranialen und spinalen sensiblen Ganglien exprimiert [20]. Übereinstimmend mit dem Ursprung der sensiblen Ganglien aus der Neuralleiste wurde PRDM12 als ein Marker für Neuralleistenzellen identifiziert [21].

1.5 Struktur und Funktion von PRDM12

PRDM12 gehört zur Familie der PRDI-BF1 (positive regulatory domain I-binding factor 1) homologous domain (PRDM)-Proteine [22]. Nach heutigem Kenntnisstand sind PRDMs Transkriptionsfaktoren, die an der Regulation zahlreicher Entwicklungs- und Differenzierungsprozesse beteiligt sind [23]. Auch in der Neurogenese spielen Mitglieder der PRDM-Familie eine wichtige Rolle [24]. So kontrolliert PRDM1a beispielsweise die Bildung von Expressionsdomänengrenzen in der ZNS-Entwicklung, während PRDM13 die Differenzierung inhibitorischer (GABAerger) Neurone vorantreibt. PRDM14 ist an der Steuerung des axonalen Wachstums in der Reifung von Motoneuronen beteiligt und PRDM8 wirkt an der Ausrichtung von Axonen während der Bildung neuronaler Schaltkreise mit [24]. PRDM12 ist im Zebrafisch für die Spezifikation von spinalen V1 Interneuronen erforderlich [25], während im Frosch Verlust und Überexpression von PRDM12 zu gestörter sensibler Neurogenese führen [26].

Alle PRDMs weisen eine N-terminale PR-Domäne auf, die mit der SET-Methyltransferase-Domäne verwandt ist. Zudem enthalten sie mehrere Zinkfinger-Motive (ZF), die die Bindung an DNA oder Protein-Protein-Interaktionen vermitteln können [22]. PRDM11 besitzt als einziges Mitglied der PRDM-Familie keine Zinkfinger, sondern stattdessen ein kleineres Protein-Protein-Interaktionsmotiv („Zinkknöchel“). Eine Übersicht über die humanen PRDM-Proteine zeigt **Abb. 4**.

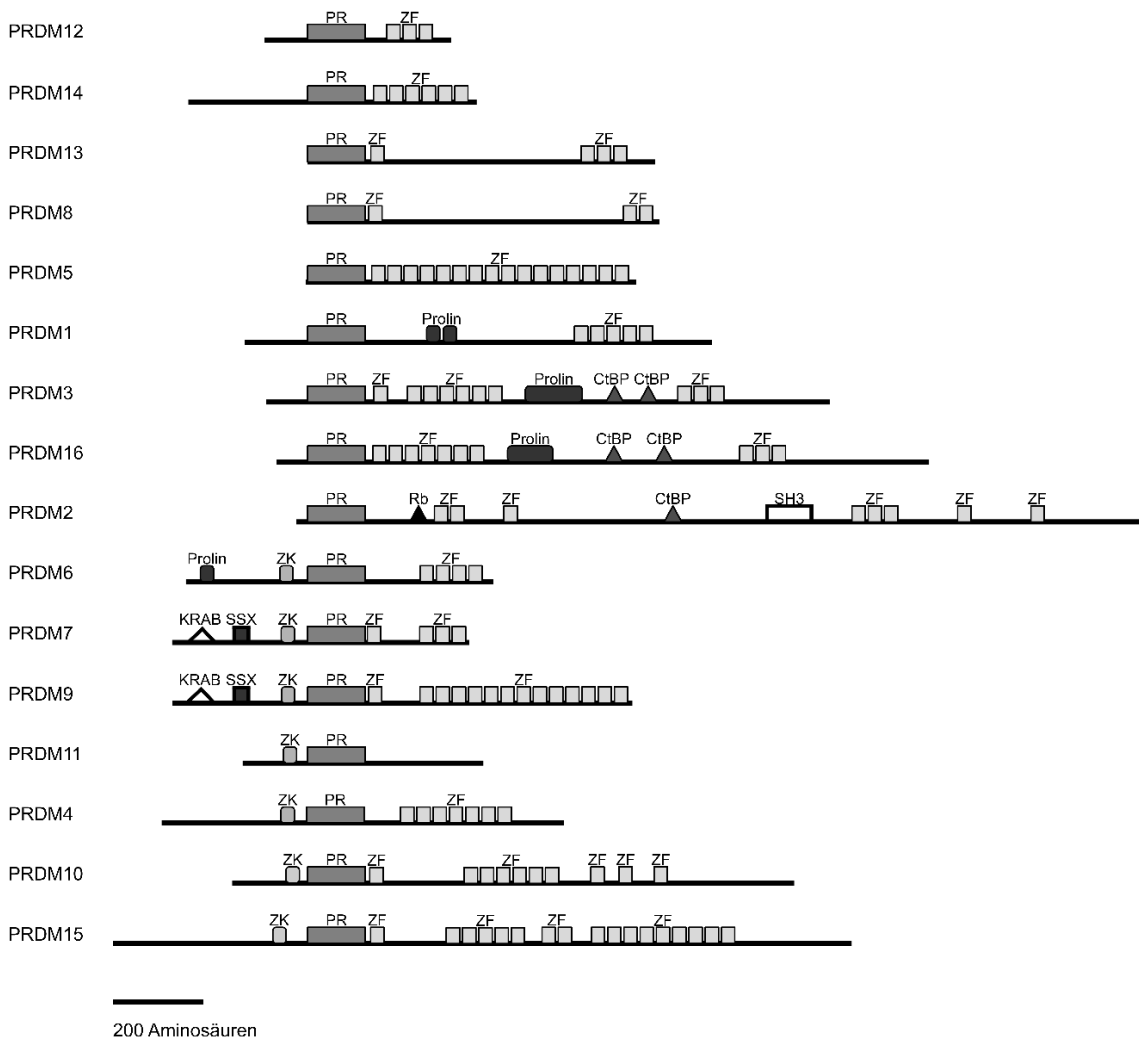


Abb. 4: Übersicht über die PRDM-Proteinfamilie

PR – PR-Domäne; ZF – Zinkfinger; ZK – Zinkknöchel; Prolin – Prolinreiche Repressor-Domäne; CtBP – Bindungsstelle für CtBP (C-terminal binding protein); Rb – Bindungsstelle für Rb (Retinoblastom-Protein); KRAB – Krüppel-associated box-Domäne; SSX – Synovial sarcoma X-Domäne; SH3 – SH3-Domäne. Bei mehreren bekannten Isoformen ist die längste dargestellt. Abbildung modifiziert nach Hohenauer & Moore *et al.*, 2012 [22].

PRDM-Familienmitglieder regulieren die Genexpression, indem sie entweder spezifische Konsensus-Sequenzen in Promotoren erkennen oder als nicht-DNA-bindende Transkriptions-Kofaktoren wirken [27]. Im Fall von PRDM12 ist derzeit noch unklar, ob es direkt an DNA binden kann oder im Komplex mit DNA-bindenden Proteinen indirekt an regulatorische Sequenzen rekrutiert wird. Für die zweite Möglichkeit spricht, dass bislang kein Konsensus-Bindungsmotiv identifiziert werden konnte. Die PR-Domänen einiger PRDM-Proteine (PRDM2, 7 und evtl. 14) haben intrinsische Histon-Methyltransferase-Aktivität, während PR-Domänen anderer PRDMs keine katalytische Aktivität aufweisen (sogenannte Pseudomethyltransferasen). Auch für PRDM12 konnte keine relevante Histon-Methyltransferase-Aktivität nachgewiesen werden [28]. Die Funktion der katalytisch inaktiven PR-Domänen der Pseudomethyltransferasen ist weitgehend unklar; möglicherweise vermitteln sie Interaktionen mit anderen Proteinen [27].

Katalytisch inaktive PRDMs können Histon-modifizierende Enzyme an Zielpromotoren rekrutieren und so indirekt epigenetische Modifikationen bewirken. PRDM1, PRDM5, PRDM6 und PRDM12 interagieren mit der Histon-Methyltransferase G9a [24]. Im Fall von PRDM12 konnte gezeigt werden, dass die zweite Zinkfinger-Domäne für die Bindung an G9a verantwortlich ist [28]. Eine CIP-assoziierte Mutation, die einen Aminosäurerest betrifft, der für die Koordination des zentralen Zinkions des Zinkfingers erforderlich ist, führte zum Verlust der Bindung an G9a [18].

2. Ziele der Arbeit

Ausgangspunkt dieser Arbeit war die Identifizierung von biallelischen Varianten im humanen *PRDM12*-Gen als Ursache für eine Form der angeborenen Schmerzunempfindlichkeit, einer autosomal-rezessiven Erkrankung. Das Hauptziel des ersten Teils der Arbeit bestand darin, die Pathogenese der mit *PRDM12* assoziierten Erkrankung zu untersuchen. Hierzu sollte geklärt werden, ob der beobachtete Verlust von Nervenfasern bei Patienten auf einen Entwicklungsdefekt oder die Degeneration sensibler Neurone zurückzuführen ist. Des Weiteren sollte untersucht werden, ob der Defekt auf Nozizeptoren beschränkt ist, wie es die klinische Präsentation nahelegt, oder ob andere Neuronenpopulationen (subklinisch) beteiligt sind. Zudem sollte überprüft werden, ob alle Neurone der nozizeptiven Linie betroffen sind oder nur bestimmte Subpopulationen von Nozizeptoren ausfallen. Um diese Fragen zu beantworten, wurde ein Mausmodell entwickelt, in welchem das *Prdm12*-Gen ausgeschaltet war. Im zweiten Teil der Arbeit lag der Fokus auf der Erforschung des molekularen Wirkmechanismus von *PRDM12*. Hierbei wurde überprüft, ob *PRDM12*, ähnlich wie andere Mitglieder der *PRDM*-Proteinfamilie, als Repressor der Genexpression fungiert. Zudem wurde untersucht, ob *PRDM12* mit anderen Proteinen interagiert und mit ihnen Proteinkomplexe bildet, die die Regulation der Genexpression steuern. Die Ergebnisse dieser Arbeit sollten zu einem besseren Verständnis der Rolle von *PRDM12* in der Entwicklung sensibler Neurone führen und neue Einblicke in die Biologie von Nozizeptoren liefern.

3. Materialien und Methoden

Sofern nicht anders angegeben, stammten die verwendeten Reagenzien von Sigma-Aldrich/Merck (Taufkirchen, Deutschland). Die Durchführung der Experimente erfolgte mit einzelnen Modifikationen nach publizierten Protokollen [29-32] bzw. nach Angaben des Herstellers.

3.1 Polymerase-Ketten-Reaktion (polymerase chain reaction, PCR)

Um DNA-Abschnitte nachzuweisen, zu sequenzieren, in Plasmide einzubringen oder gezielt zu verändern, wurden die Zielsequenzen mit PCR [33] angereichert. Die für die PCR erforderlichen Startfragmente (Oligonukleotidprimer, kurz: Primer) wurden aus entsprechenden Veröffentlichungen oder Vektorkarten entnommen oder aus öffentlich zugänglichen Sequenzen mit Hilfe des Programms Primer3 (<https://primer3.org/>) [34] abgeleitet. Mit der Synthese der Primer wurde der externe Dienstleister Metabion (Martinsried, Deutschland) beauftragt. Die Durchführung der PCR erfolgte in einem MJ Mini Personal Thermal Cycler (Biorad, Hercules, USA).

3.2 Agarose-Gelelektrophorese und Gelextraktion

Zur qualitativen und quantitativen Analyse wurden DNA-Fragmente mit 6x DNA Loading Dye (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) versetzt und in Ethidiumbromid-haltigen 1-3 %igen Agarosegelen in 1x TAE-Puffer elektrophoretisch aufgetrennt. Der Nachweis der Nukleinsäurefragmente erfolgte durch Visualisierung des eingelagerten Ethidiumbromids mit Hilfe von UV-Licht. Eine Größenbestimmung wurde durch Vergleich mit der Laufweite der DNA-Größenstandards GeneRuler 100 bp DNA ladder oder GeneRuler 1 kb DNA ladder (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) ermöglicht. Falls für weitere Anwendungen erforderlich, wurden Fragmente der erwarteten Größe mit einem Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten und anschließend mit dem NucleoSpin Gel and PCR Clean-up Kit (Macherey-Nagel, Düren, Deutschland) aufgereinigt. Der DNA-Gehalt der gewonnenen Eluate wurde mit einem NanoDrop 1000-Spektralphotometer (Peqlab, Erlangen, Deutschland) gemessen.

3.3 DNA-Sequenzierung (Sanger-Methode)

DNA-Sequenzierungen wurden von dem externen Dienstleister Eurofins Genomics (Ebersberg, Deutschland) nach der Kettenabbruchmethode [35] als *cycle sequencing* [36] mit fluoreszenzmarkierten Didesoxynukleotiden [37] durchgeführt. Die resultierenden Chromatogramme wurden durch Vergleich mit den bekannten Referenzsequenzen ausgewertet.

3.4 Genotypisierung von Mauslinien

Für die Genotypisierung wurden DNA-Proben von der Arbeitsgruppe von Professor Roman Chrast (Karolinska Institutet, Stockholm, Schweden) zur Verfügung gestellt. Genomische DNA von postnatalen Stadien wurde aus Ohrbiopsien gewonnen, während für Embryonalstadien DNA aus dem kaudalen Anteil der Embryonen isoliert wurde. Die Genotypisierung erfolgte durch PCR-Amplifikation (3.1) und Darstellung von allelspezifischen DNA-Fragmenten im Agarosegel (3.2) bzw. durch den Nachweis von Längenunterschieden von Fragmenten in Abhängigkeit vom vorliegenden Allel. In Abhängigkeit von der gewählten Zielsequenz und verwendeten Primerpaaren wurde das PCR-Protokoll angepasst (Tab. 1). Zur Bestätigung der Amplifikation der korrekten Zielsequenzen erfolgte im Zuge der Etablierung der Primerpaare eine Sequenzierung der PCR-Produkte (3.3) unter Verwendung der PCR-Primer als Sequenzierprimer.

Tab. 1: Primerpaare und Reaktionsbedingungen für Genotypisierungs-PCRs

| Primerpaar | Sequenz (5'-3') | Allel | Größe (bp) | Reaktionsansatz | PCR-Programm |
|--------------|--------------------------|------------------------------|--------------|--|--|
| gPRDM12int2F | CTGGCGGCAGAAA GGAACTC | <i>Wildtyp</i> | 567 | 1 µg DNA | 95 °C 5 min |
| gPRDM12int2R | GAGGTGGGCTAG CGTCAAAA | <i>Prdm12^{tm2a}</i> | 626 | 25 µl <i>DreamTaq</i> | 5x |
| | | <i>Prdm12^{tm2b}</i> | kein Produkt | Green PCR Mix | 94 °C 1 min |
| | | <i>Prdm12^{tm2c}</i> | 626 | (Thermo Fisher | 58 °C 1 min |
| | | <i>Prdm12^{tm2d}</i> | kein Produkt | Scientific, Waltham, USA) | 72 °C 2 min |
| | | | | 100 pmol <i>forward</i> - bzw. <i>reverse</i> -Primer mit nukleasefreiem Wasser auf 50 µl auf- gefüllt | 27x 94 °C 30 s 58 °C 30 s 72 °C 1 min |

Fortsetzung auf Seite 20.

Fortsetzung von Seite 19.

| Primerpaar | Sequenz (5'-3') | Allel | Größe (bp) | Reaktionsansatz | PCR-Programm |
|--|---|--|--|-----------------|--|
| RAF5 gPRDM12-tm2d-cre2_nR | CACAC-CTCCCCCTGAAC-CTGAAAC CGAGCTCAGAC-CATAACTTCGT | <i>Wildtyp</i> <i>Prdm12^{tm2a}</i> <i>Prdm12^{tm2b}</i> <i>Prdm12^{tm2c}</i> <i>Prdm12^{tm2d}</i> | kein Produkt 3071* 235 kein Produkt kein Produkt | s. o. | 95 °C 5 min 5x 94 °C 1 min 59 °C 1 min 72 °C 2 min 28x 94 °C 30 s 59 °C 30 s 72 °C 1 min |
| gPRDM12-flp-wt_F gPRDM12-flp-wt_R | TCAC-CAGACCCGGCCTCAGTT CAC-CGGTCTTCCATCGCGGAA | <i>Wildtyp</i> <i>Prdm12^{tm2a}</i> <i>Prdm12^{tm2b}</i> <i>Prdm12^{tm2c}</i> <i>Prdm12^{tm2d}</i> | 86 kein Produkt kein Produkt kein Produkt kein Produkt | s. o. | 95 °C 5 min 5x 94 °C 1 min 59 °C 1 min 72 °C 2 min 28x 94 °C 30 s 59 °C 30 s 72 °C 1 min |
| gPRDM12-flp-tm2c_F gPRDM12-flp-tm2c_R | CAGACCAAGGCG-CATAACGA CGAAGTTATCTCGACGAAGTTCCTA | <i>Wildtyp</i> <i>Prdm12^{tm2a}</i> <i>Prdm12^{tm2b}</i> <i>Prdm12^{tm2c}</i> <i>Prdm12^{tm2d}</i> | kein Produkt 7037* kein Produkt 133 133 | s. o. | 95 °C 5 min 5x 94 °C 1 min 62 °C 1 min 72 °C 1 min 25x 94 °C 30 s 62 °C 30 s 72 °C 30 s |
| gPRDM12-tm2d-cre2_nF gPRDM12-tm2d-cre2_nR | CGCCGGAAC-CGAAGTTCCTA CGAGCTCAGAC-CATAACTTCGT | <i>Wildtyp</i> <i>Prdm12^{tm2a}</i> <i>Prdm12^{tm2b}</i> <i>Prdm12^{tm2c}</i> <i>Prdm12^{tm2d}</i> | kein Produkt 7939* 5103* 1035* 110 | s. o. | 95 °C 5 min 5x 94 °C 1 min 59 °C 1 min 72 °C 2 min 28x 94 °C 30 s 59 °C 30 s 72 °C 1 min |
| cPRDM12_ex2nF gPRDM12int2nR | CGCTCAGAG-TTCCATCCCAG ATCCCTTTCCAAA-GCTCCCG | <i>Wildtyp</i> <i>Prdm12^{tm2a}</i> <i>Prdm12^{tm2b}</i> <i>Prdm12^{tm2c}</i> <i>Prdm12^{tm2d}</i> | 170 170 kein Produkt 170 kein Produkt | s. o. | 95 °C 5 min 5x 94 °C 1 min 59 °C 1 min 72 °C 2 min 28x 94 °C 30 s 59 °C 30 s 72 °C 1 min |

* erwartetes PRC-Produkt unter den gewählten Versuchsbedingungen nicht nachweisbar

3.5 Expressionskonstrukte

Expressionskonstrukte für Myc-PRDM12 in pCMV-Myc, Myc-PRDM12_H289L in pCMV-Myc und Myc-PRDM12_ΔZF in pCMV-Myc lagen zu Beginn dieser Arbeit bereits vor [18]. Flag-G9a in pcDNA3-Flag wurde von Herrn Professor Chenfang Dong (University of Kentucky, Lexington, USA) zur Verfügung gestellt.

Myc-PRDM12_F271I in pCMV-Myc: Die Generierung eines PRDM12-Leserahmens mit der Mutation p.F271I erfolgte mittels *overlap-extension* PCR (OE-PCR) [38]. Dazu wurden in einem PCR-Ansatz (3.1) jeweils einer von zwei komplementären Mutageneseprimern (*forward*: 5'-GACAAGCCCATCGTGTGC-3' und *reverse*: 5'-GCACACGATGGGCTTGTC-3') mit jeweils einem von zwei äußeren Primern kombiniert, die dem N- bzw. C-Terminus von PRDM12 entsprachen und zusätzlich 5'-Überhänge mit einer *EcoRI*-Schnittstelle (*forward primer*: 5'-GCCCGAATTCGGATGATGGGCTCTGTGCTC-3') bzw. einer *NotI*-Schnittstelle (*reverse primer*: 5'-TTAAGCGGCCGCTCACAGCACCATGGCCGG-3') enthielten. Die PCR wurde mit dem AccuPrime Pfx DNA Polymerase-System (Invitrogen, Carlsbad, USA) durchgeführt, wobei das Konstrukt Myc-PRDM12 in pCMV-Myc als Matrize diente. Anschließend wurden die PCR-Produkte mittels Gelextraktion (3.2) aufgereinigt. Jeweils 200 ng der geextrahierten PCR-Produkte, die sich im Bereich der eingefügten Mutation überlappten, wurden mit den beiden äußeren Primern in einer dritten PCR (wieder mit dem AccuPrime Pfx DNA Polymerase-System (Invitrogen, Carlsbad, USA)) eingesetzt, um den vollständigen PRDM12-Leserahmen mit der p.F271I-Variante zu amplifizieren. Die PCR-Produkte wurden durch Gelextraktion (3.2) gereinigt, in pCR2.1-TOPO-TA kloniert (3.6) und in Bakterien transformiert (3.8). Nach Vermehrung des Plasmids in Bakterien und Bestätigung der Integrität des Inserts (3.9) erfolgten die Subklonierung der mutierten cDNA in den pCMV-Myc-Vektor (3.7) und die Aufreinigung des Plasmids aus Bakterien (3.9).

Myc-PRDM12_ΔPR in pCMV-Myc: Ein pCAG-Flag-IRES-Puro-Plasmid, das einen artifiziellen PRDM12-Leserahmen enthielt, dem die PR-Domäne fehlte, wurde von Herrn Professor Yoichi Shinkai (RIKEN Institute, Saitama, Japan) zur Verfügung gestellt. Der veränderte PRDM12-Leserahmen wurde durch PCR (3.1) mit den gleichen äußeren Primern amplifiziert, die für die Amplifikation von Myc-PRDM12_F271I verwendet wurden. Die weitere Vorgehensweise entsprach der Klonierung von Myc-PRDM12_F271I in pCMV-Myc.

HA-CBFA2T2 in pCMV-HA: Der CBFA2T2-Leserahmen wurde mit PCR (3.1) aus mit Oligo-dT-Primern hergestellter HEK293-Zell-cDNA amplifiziert, die von Herrn Dr. Rolf Stucka (Friedrich-Baur-Institut, LMU München, München, Deutschland) zur Verfügung gestellt wurde. PCR-Primer entsprachen dem CBFA2T2 N- bzw.

C-Terminus und enthielten 5'-Überhänge mit *Sall*- (*forward*: 5'-GCCCGTCGAC-CATGGCTAAAGAATCTGGAATAAGC-3') bzw. *NotI*-Schnittstellen (*reverse*: 5'-TTAAGCGGCCGCTCAGAGTCCGTTGGTGTCTG-3'). Die PCR erfolgte mit dem AccuPrime Pfx DNA Polymerase-System (Invitrogen, Carlsbad, USA). Die weitere Vorgehensweise entsprach der Klonierung von Myc-PRDM12_F271I in pCMV-Myc mit Ausnahme der Verwendung des Vektors pCMV-HA anstelle von pCMV-Myc und des Restriktionsenzym *Sall* anstatt *EcoRI*.

GAL4-DBD-PRDM12: Der PRDM12-Leserahmen wurde an Myc-PRDM12 in pCMV-Myc durch PCR (3.1) mit den gleichen äußeren Primern amplifiziert, die für die Amplifikation von Myc-PRDM12_F271I verwendet wurden. Die weitere Vorgehensweise entsprach der Klonierung von Myc-PRDM12_F271I in pCMV-Myc mit Ausnahme der Verwendung eines anderen Zielvektors, pcDNA3-GAL4-DBD, der die Sequenz der GAL4-DNA-Bindungsdomäne (Aminosäuren 1-147) enthielt, die mit dem N-Terminus der eingebrachten Proteine fusioniert wird.

GAL4-DBD-PRDM12_D31Y, -_R168C, -_E172D: Die Klonierung erfolgte wie für GAL4-DBD-PRDM12 beschrieben, allerdings wurden Myc-PRDM12_D31Y in pCMV-Myc, Myc-PRDM12_R168C in pCMV-Myc und Myc-PRDM12_E172D in pCMV-Myc [18] als Matrize verwendet.

GAL4-DBD-CBFA2T2: Der CBFA2T2-Leserahmen wurde an HA-CBFA2T2 in pCMV-HA durch PCR (3.1) mit Primern amplifiziert, die dem CBFA2T2 N- bzw. C-Terminus entsprachen und 5'-Überhänge mit *EcoRV*- (*forward*: 5'-GCCCGA-TATCCATGGCTAAAGAATCTGGAATAAGC-3') bzw. *XbaI*-Schnittstellen (*reverse*: 5'-TTAATCTAGATCAGAGTCCGTTGGTGTCTG-3') enthielten. Die PCR erfolgte mit dem AccuPrime Pfx DNA Polymerase-System (Invitrogen, Carlsbad, USA). Die weitere Vorgehensweise entsprach der Klonierung von Myc-PRDM12_F271I in pCMV-Myc mit Ausnahme der Verwendung des Vektors pcDNA3-GAL4-DBD anstatt pCMV-Myc und der Restriktionsenzyme *EcoRV* und *XbaI* anstelle von *EcoRI* und *NotI*.

3.6 Topoisomerase-basierte Klonierung von PCR-Fragmenten

PCR-Produkte, die zur Generierung von Expressionskonstrukten (3.5) verwendet werden sollten, wurden an den 3'-Enden durch eine 30-minütige Inkubation bei

72 °C mit einer Taq-Polymerase (Maxima Hot Start Green PCR Master Mix, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) mit einem Desoxyadenosin-Überhang versehen. Anschließend erfolgten die Topoisomerase-basierte Klonierung der Fragmente (200 ng) in den pCR2.1-TOPO-TA-Vektor mithilfe des TOPO TA Cloning Kits (Invitrogen, Carlsbad, USA) und die Transformation der Plasmide in *E. coli*-Bakterien (3.8).

3.7 Subklonierung in Expressionsvektoren

Inserts wurden mit Restriktionsenzymen, die die mittels PCR eingefügten Schnittstellen (3.5) erkannten, aus dem pCR2.1-TOPO-TA-Vektor (3.6) herausgeschnitten und durch Gelextraktion aufgereinigt (3.2). Gleichzeitig wurden die Expressionsvektoren (pCMV-Myc, pCMV-HA, pcDNA3-GAL4-DBD) mit den entsprechenden Restriktionsenzyme linearisiert und ebenfalls durch Gelextraktion aufgereinigt (3.2). Die Ligation der Inserts in die Expressionsvektoren erfolgte mit Hilfe einer T4 DNA-Ligase (New England Biolabs, Ipswich, USA). Für die Ligation wurden Insert und Vektor im molaren Verhältnis von 1:3 gemischt und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurde die Ligase durch Erhitzen (65 °C für 10 min) inaktiviert. Danach wurden die Ligationsprodukte in *E. coli*-Bakterien transformiert (3.8).

3.8 Transformation von Plasmid-DNA in Bakterien

Konstrukte in pCR2.1-TOPO-TA (3.6) wurden in TOP10 *E. coli*-Bakterien (OneShot TOP10 Chemically competent cells, Invitrogen, Carlsbad, USA) transformiert. Für die Transformation der Expressionskonstrukte (3.7) wurden chemisch kompetente *E. coli* des Stamms DH5 α verwendet. Jeweils 25 μ l Bakteriensuspension wurden mit 2 μ l des Produkts aus der Topoisomerase-basierten Klonierung (3.6) bzw. der Ligation in die Expressionsvektoren (3.7) gemischt und 30 min auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock (42 °C für 45 s) wurde das Gemisch nochmals 2 min auf Eis stehen gelassen und danach mit 0,2 ml S.O.C.-Medium (New England Biolabs, Ipswich, USA) versetzt. Der Transformationsansatz wurde eine Stunde lang bei 37 °C geschüttelt und anschließend auf Kulturplatten ausgebracht (3.9).

3.9 Bakterienkultur und Isolation von Plasmid-DNA

Jeweils 100 µl der Transformationsansätze (3.8) wurden auf LB-Agarplatten (1 % Trypton, 1 % NaCl, 0,5 % Hefeextrakt, 15 g Bacto-Agar) ausplattiert. Zur Selektion von Bakterien, die das gewünschte Plasmid aufgenommen hatten, wurde dem Kulturmedium entsprechend dem Antibiotika-Resistenzgen der verwendeten Vektoren Ampicillin (100 µg/ml) zugesetzt. Bei der Klonierung in pCR2.1-TOPO-TA (3.6), der eine LacZ-Kassette enthielt, die bei Aufnahme eines Inserts disruptiert wurde, wurde zur Identifizierung von Kolonien mit aufgenommenem Insert eine Blau-Weiß-Selektion durchgeführt. Dazu wurden 10 µl einer X-Gal-Lösung (20 mg/ml) und 10 µl einer IPTG-Lösung (100 mM) pro 1 ml Nährmedium hinzugegeben. Kolonien (im Fall der Klonierung in pCR2.1-TOPO-TA: weißgefärbte Kolonien), die nach 24-48 h bei 37 °C auf der Agarplatte wuchsen, wurden mittels einer „Kolonie-PCR“ auf das Vorhandensein eines Inserts untersucht. Dazu wurde ein Teil der Kolonie mit einer sterilen Pipettenspitze aufgenommen und in einem PCR-Ansatz (Maxima Hot Start Green PCR Master Mix, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA), der die jeweiligen Klonierungsprimer (3.5) enthielt, gelöst. Anschließend wurde eine Gelelektrophorese (3.2) durchgeführt, um zu überprüfen, ob Banden mit der erwarteten Größe amplifiziert worden waren. Von Kolonien mit positivem PCR-Ergebnis wurden Flüssigkulturen in LB-Medium (1 % Trypton, 1 % NaCl, 0,5 % Hefeextrakt, 100 µg/ml Ampicillin) angesetzt, die über Nacht bei 37 °C auf einer Schüttelplattform inkubiert wurden. Für Konstrukte in pCR2.1-TOPO-TA erfolgte die Plasmidisolierung mit dem QIAPrep 8-System (Qiagen, Hilden, Deutschland). Die Integrität des Inserts wurde durch Sequenzierung (3.3) mit T7- und M13R-Universalprimern überprüft. Für Expressionsplasmide, die anschließend für Transfektionen eingesetzt wurden, erfolgte die Plasmidisolierung mit dem NucleoBond PC 500-Kit (Macherey-Nagel, Düren, Deutschland). Zum Ausschluss von Klonierungsartefakten erfolgte abschließend eine Sequenzierung (3.3) mit pCMV-Sequenzierprimern (pCMV-Myc, pCMV-HA) bzw. T6- und T7-Universalprimern (pcDNA3-GAL4-DBD).

3.10 Eukaryotische Zellkultur

Die humane Nierenepithelzelllinie HEK293 (ATCC/LGC Standards, Wesel, Deutschland) wurde bei 37 °C, 5 % CO₂ und 95 % Luftfeuchtigkeit in DMEM-

Medium (GE Healthcare, Chalfont St Giles, UK), das zusätzlich 10 % FCS (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA), 2 % L-Glutamin (GE Healthcare, Chalfont St Giles, UK) und 0,4 % Penicillin/Streptomycin enthielt, adhärent wachsend kultiviert. Bei Erreichen von 70-80 % Konfluenz wurden die Zellen passagiert. Dazu wurde nach Waschen mit 1x PBS der Zellrasen durch Zugabe von Trypsin-EDTA von der Kulturschale abgelöst. Anschließend wurden die Zellen in frischem Kulturmedium aufgenommen und mit einer Dichte von 10-20 % auf neuen Platten ausgesät.

3.11 Transiente Transfektion eukaryotischer Zellen

Die Transfektion von adhärent wachsenden HEK293-Zellen (**3.10**) mit Plasmiden erfolgte bei einer Dichte von 50-70 % mithilfe des Transfektionsreagenzes jetPEI (Polyplus transfection, Illkirch, Frankreich). Anschließend wurden die Zellen weiter kultiviert. Nach 24 h wurde das Medium gewechselt, und nach weiteren 24 h wurden die Zellen zur Proteinisolation (**3.12**) oder für die Immunfluoreszenzmikroskopie (**3.16**) verwendet.

3.12 Proteinisolation aus eukaryotischen Zellkulturen

Bei Erreichen einer Konfluenz von 70-80 % wurden adhärent wachsende HEK293-Zellen (**3.10**) nach Absaugen des Kulturmediums mit 1x PBS gewaschen, mittels Schaber abgelöst und in 1 ml 1x PBS resuspendiert. Nach Zentrifugation (4 °C, 10 min, 14.000 Upm) wurde das Zellpellet durch Zugabe von 300-400 µl Lyse-Puffer (für SDS-PAGE: 1 % SDS, 10 mM Tris-HCl, pH 7,4 bzw. für Co-Immunpräzipitation: 1x PBS, 5 mM EDTA, 0,5 % NP-40, 0,1 mM PMSF, Complete Protease Inhibitor (Roche, Rotkreuz, Schweiz), 30-minütige Inkubation auf Eis und dreimaliges Vortexen im Abstand von jeweils 10 min homogenisiert. Nach erneuter Zentrifugation wurde der proteinhaltige Überstand abgenommen und für nachfolgende Untersuchungen eingesetzt. Zur Bestimmung der Proteinkonzentrationen wurde ein NanoDrop 1000-Spektralphotometer verwendet (Peachlab, Erlangen, Deutschland).

3.13 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Auftrennung von zellulären Proteinen (3.12) wurde mittels der diskontinuierlichen SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese durchgeführt. Zellysate wurden mit 6x SDS-Ladepuffer (0,06 M Tris-HCl (pH 6,8), 0,012 % Bromphenolblau, 9,3 % DTT, 10 % SDS, 30 % Glycerol) versetzt und bei 95 °C für 10 min denaturiert. Anschließend wurden die Proben auf ein 4-15 % Polyacrylamid-Gradientengel (Biorad, Hercules, USA) geladen. Als Größenreferenz wurde die PageRuler Prestained Protein Ladder (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) verwendet. Nachfolgend wurden die Proben durch Anlegen einer elektrischen Spannung (zunächst 80 V, dann bis zu 120 V) in einem Laufpuffer (0,025 M Tris, 0,192 M Glycin, 0,1 % SDS) aufgetrennt.

3.14 Western-Blot (Immunoblot)

Die in der SDS-PAGE (3.13) aufgetrennten Proteine wurden mittels Semi-Dry-Verfahren in einer Trans-Blot Cell-Apparatur (Biorad, Hercules, USA) auf eine Nitrocellulosemembran transferiert. Nach Abschluss des Transfers wurde die Membran zur Blockade unspezifischer Bindungsstellen für 1 h bei Raumtemperatur in 5 % Milchpulver/1x TBS-T inkubiert. Anschließend erfolgte die Bindung der Primärantikörper in 5 % Milchpulver/1x TBS-T bei 4 °C über Nacht. Folgende Primärantikörper wurden verwendet: Maus anti-Myc (Clontech, Mountain View, USA, #631206, 1:1.000), Maus anti-Flag (Sigma-Aldrich/Merck, Taufkirchen, Deutschland, #F3165, 1:1.000) und Kaninchen anti-HA (Cell Signaling Technology, Danvers, USA, #3724, 1:1.000). Nach viermaligem Waschen für jeweils 10 min mit 1x TBS-T wurde die Membran in 5 % Milchpulver/1x TBS-T mit an horseradish peroxidase (HRP) gekoppelten Sekundärantikörpern Ziege anti-Maus IgG (Jackson ImmunoResearch, Ely, UK, #115-035-003, 1:10.000) und Ziege anti-Kaninchen IgG (Jackson ImmnoResearch, Ely, UK, #111-035-003, 1:10.000) für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Membranen erneut 4x 10 min mit 1x TBS-T gewaschen. Proteinbanden wurden unter Verwendung des Chemilumineszenz-Detektionsreagenzes ECL Prime Western Blotting Detection Reagent (GE Healthcare, Chalfont St Giles, UK) mithilfe eines ECL Imager-Systems (Intas, Göttingen, Deutschland) und der Aufnahmesoftware ChemoStar visualisiert.

3.15 Co-Immunpräzipitation

HEK293-Zellen (3.10) wurden mit Expressionskonstrukten (3.5) für PRDM12 (Wildtyp oder Deletionsmutanten, Myc-Tag) und G9a (Flag-Tag) bzw. CBFA2T2 (HA-Tag) transfiziert (3.11). Nach 48 h wurden die Zellen lysiert und zelluläre Proteine isoliert (3.12). Ein Aliquot der Proteinlösung wurde für die Expressionskontrolle mit SDS-PAGE (3.13) und Westernblot (3.14) abgenommen. Die restliche Proteinlösung wurde über Nacht bei 4 °C unter ständigem Schütteln mit 25 µl c-Myc Monoclonal Antibody (Klon 9E10)-Agarose Beads (Clontech, Mountain View, USA) inkubiert. Die Beads wurden durch Zentrifugation bei 13.000 Upm für 1 min sedimentiert, fünfmal mit 1x PBS gewaschen und in 25 µl 6x SDS-Ladepuffer gelöst. Nach fünfminütigem Erhitzen auf 95 °C wurden die Proben zentrifugiert und die im Überstand enthaltenen immunpräzipitierten Proteine mittels SDS-PAGE und Western-Blot identifiziert (3.13, 3.14).

3.16 Immunfluoreszenzmikroskopie an Zellkulturen

HEK293-Zellen wurden in Wachstumsmedium auf Deckgläschen (Durchmesser 12 mm) ausgesät, für 24 h kultiviert (3.10) und anschließend mit Expressionskonstrukten für Myc-PRDM12 und HA-CBFA2T2 (3.5) transfiziert (3.12). Nach weiteren 48 h Kultivierung wurden die Zellen mit 1x PBS gewaschen und durch eine zehnminütige Inkubation mit 3,7 % PFA in 1x PBS fixiert. Nach einem weiteren Waschschrift mit 1x PBS wurden die Zellen 15 min lang in 0,1 % Triton X-100 in 1x PBS permeabilisiert. Nach dreimaligem Waschen in 1x PBS wurden unspezifische Bindungsstellen durch eine einstündige Inkubation in 5 % Pferdeserum (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) in 1x PBS blockiert. Danach wurden die Deckgläschen bei 4 °C über Nacht mit Primärantikörpern Maus anti-Myc (Clontech, Mountain View, USA, #631206, 1:200) und Kaninchen anti-HA (Cell Signaling Technology, Denver, USA, #3724, 1:800) in 5 % Pferdeserum in 1x PBS inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit 1x PBS wurden die Zellen für 1 h mit Alexa Fluor (AF)-gekoppelten-Sekundärantikörpern AF488 Ziege anti-Maus IgG (Invitrogen, Carlsbad, USA, #A-11001, 1:500) und AF594 Ziege anti-Kaninchen IgG (Invitrogen, Carlsbad, USA, #A-11012, 1:500) in 5 % Pferdeserum in 1x PBS bei Raumtemperatur inkubiert. Daran schlossen sich nochmals drei Waschschriffe mit 1x PBS und die Einbettung der Präparate in Fluorescence

Mounting Medium (Dako, Hamburg, Deutschland) an. Mikroskopie und Aufnahme von Bildern erfolgten mithilfe eines Zeiss Axiovert 200 M-Mikroskops und des Programms AxioVision (Carl Zeiss, Oberkochen, Deutschland).

3.17 Reporterassay

Die Untersuchung des Einflusses von PRDM12 und CBFA2T2 auf die Aktivität eines heterologen Promotors erfolgte mit Hilfe eines über GAL4 regulierten Luciferase-Reportergens. Dazu wurden PRDM12 bzw. CBFA2T2- mit der GAL4-DNA-Bindungsdomäne (GAL4-DBD) fusioniert (3.5). Als Reporterkonstrukt wurde pGAL4-TK-FLuc verwendet, das ein Firefly-Luciferase-Gen (*FLuc*) unter der Kontrolle eines minimalen Thymidinkinase (TK)-Promotors mit fünf stromaufwärts gelegenen GAL-Bindungsstellen (UAS) enthält. HEK293-Zellen (3.10) wurden in einer Dichte von $0,8 \times 10^5$ Zellen pro Well in 24-Well-Platten ausgesät und mit 500 ng GAL4-DBD-Leervektor bzw. 20-200 ng GAL4-DBD-PRDM12- oder GAL4-DBD-CBFA2T2-Fusionskonstrukten, 200 ng Reporterplasmid GAL4-TK-FLuc und 2 ng Renilla-Luciferase (*RLuc*)-tragendes internes Kontrollplasmid pRL-TK (Promega, Madison, USA) kotransfiziert (3.11). Zur Untersuchung der Interaktion von PRDM12 und CBFA2T2 wurden 20-200 ng Myc-PRDM12 mit dem GAL4-DBD-Leervektor bzw. dem GAL4-DBD-CBFA2T2-Fusionskonstrukt, dem Reporterplasmid GAL4-TK-FLuc und dem Kontrollplasmid pRL-TK kotransfiziert. Die transfizierten Zellen wurden über Nacht unter Standardbedingungen kultiviert (3.10). Die Luciferase-Expression wurde mit dem Dual-Luciferase-Reporter-Assay-System (Promega) analysiert. Die Zellen wurden einmal mit 1x PBS gespült und dann mit 1x Reporter-Lysepuffer lysiert. Die Lumineszenz des Firefly-Reporters wurde durch Zugabe von Luciferase Assay Reagent II gemessen. Anschließend wurde die Reaktion gequencht, und die Bestimmung der Renilla-Luciferase-Aktivität wurde durch Zugabe von Stop & Glo Reagent gestartet. Alle Messungen wurden mit einem Berthold Technologies TriStar LB 941 Luminometer (Berthold Technologies, Bad Wildbad, Deutschland) durchgeführt. Die relative Reporteraktivität wurde durch Normalisierung des Firefly-Luciferase-Signals auf die Renilla-Luciferase-Aktivität ermittelt.

3.18 Gewebereinbettung und Gefrierschnitte

In 4 % Paraformaldehyd fixierte Mausembryonen wurden von der Arbeitsgruppe von Professor Roman Chrast (Karolinska Institutet, Stockholm, Schweden) zur Verfügung gestellt. Die Embryonen wurden in einer 30 %igen Sucrose-Lösung auf Eis verschickt und nach Eingang in unserem Labor für 1 h in einem 1:1 Gemisch aus Tissue-Tek und 30 %iger Sucrose-Lösung inkubiert. Anschließend wurden die Embryonen in Tissue-Tek eingebettet. Nach dem Aushärten des Einbettmediums auf Trockeneis wurden die Präparate bei -80 °C gelagert. Die Anfertigung von Gefrierschnitten erfolgte bei -20 °C in einem vorgekühlten Kryostaten. Als Objektträger wurden Eprexia SuperFrost Plus Adhäsionsobjektträger (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) verwendet. Die angefertigten Schnitte wurden bei -20 °C gelagert.

3.19 Immunfluoreszenzmikroskopie von Gefrierschnitten

Die bei -20 °C gelagerten Schnitte wurden zunächst über etwa 30 min auf Raumtemperatur erwärmt und anschließend für 5 min in 2 % PFA in 1x PBS fixiert. Nach dreimaligem Waschen mit 1x PBS für jeweils 10 min wurden die Proben unter Zugabe eines 0.1 % Triton X-100/1x PBS-Gemisches für 10 min permeabilisiert. Nach erneuten Waschschrritten wurden die Schnitte zur Blockierung unspezifischer Antikörperbindungen in 5 % Kälberserum in 0.1 % Triton X-100 und 1x PBS für 1 h inkubiert. Die Bindung des primären Antikörpers erfolgte im selben Medium bei 4 °C über Nacht. Nach erneuten Waschschrritten wurden die Präparate mit dem sekundären Antikörper für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Schnitte nach erneuten Waschschrritten in einem wässrigem Eindeckmedium eingebettet. Als primärer Antikörper wurde anti-TUJ1 (human) aus Kaninchen (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland, #T2200; 1:80) verwendet, als sekundärer Antikörper Ziege anti-Kaninchen IgG konjugiert an Alexa Fluor AF488 (Invitrogen, Carlsbad, USA, #A-11008, 1:500). Für die Mikroskopie und die Aufnahme der Bilder wurden ein Zeiss Axiovert 200 M-Mikroskop und das Programm AxioVision (Carl Zeiss, Oberkochen, Deutschland) verwendet.

4. Ergebnisse

4.1 Etablierung eines PRDM12-defizienten Mausmodells

Zur Klärung der pathophysiologischen Rolle von PRDM12 wurde in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Herrn Professor Roman Chrast (Karolinska Institutet, Stockholm, Schweden) die Generierung eines Mausmodells mit fehlender Prdm12-Expression angestrebt (**Abb. 5**).

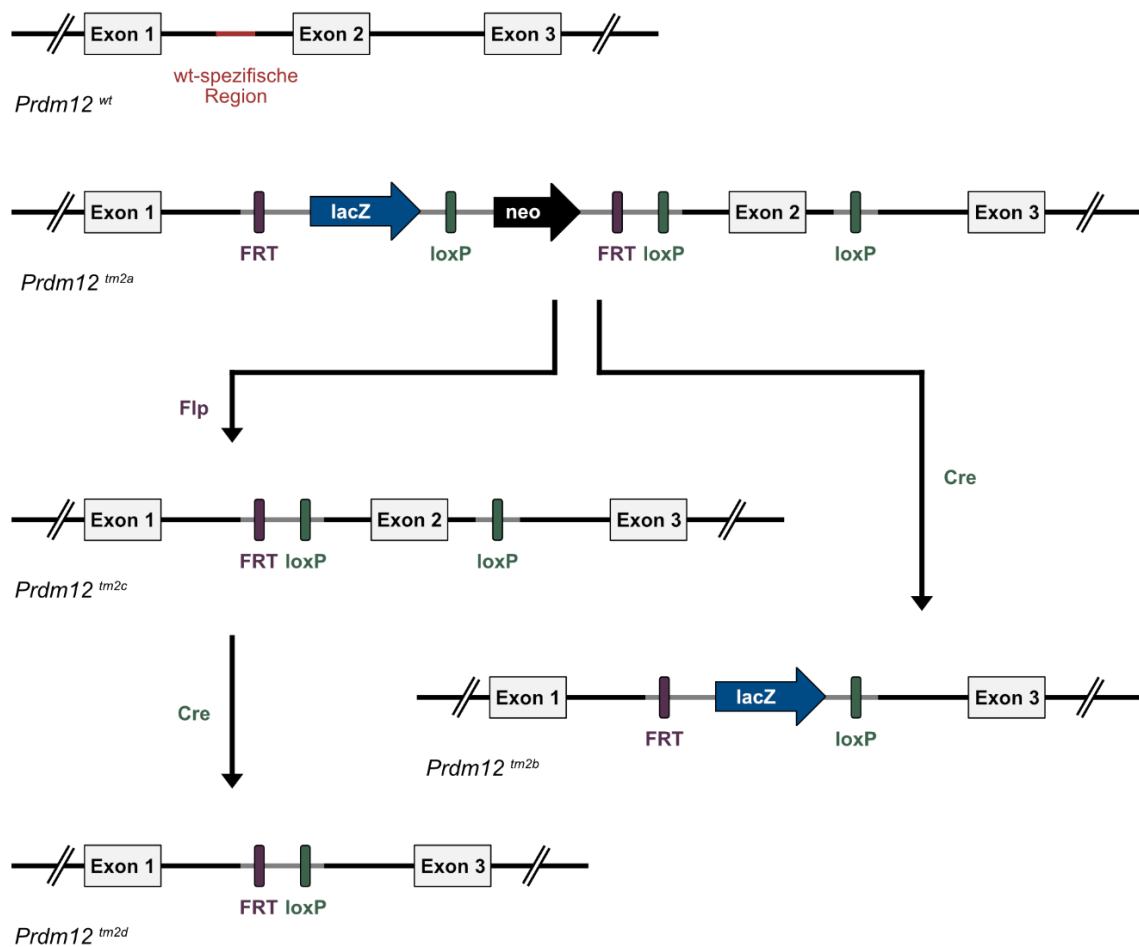


Abb. 5: Schematische Darstellung der Generierung verschiedener *Prdm12*-Allele

FRT – Zielsequenz der Flippase (Flp); lacZ – β -Galactosidase-Reporter; loxP – Zielsequenz der Cre-Rekombinase (Cre); neo – Neomycin-Kassette; schwarze Bereiche entsprechen dem Wildtyp-Allel; hellgraue Bereiche umfassen die durch homologe Rekombination eingebrachten Elemente; der rote Bereich ist spezifisch für das Wildtyp-Allel. *Prdm12^{tm2b}* ist ein LacZ-Reporter- und gleichzeitig konstitutives Knockout-Allel. *Prdm12^{tm2c}* kodiert ein intaktes Protein, hat aber durch die loxP-Sequenzen konditionales Potential, und kann je nach verwendeter Cre-Rekombinase zur Generierung eines konstitutiven Knockouts oder eines gewebe- und/oder zeitspezifischem konditionalen Knockout (*Prdm12^{tm2d}*) verwendet werden.

Im Rahmen dieser Kooperation wurden Primersets für Genotypisierungen etabliert, Genotypisierungen durchgeführt und postmortale Untersuchungen an Mausembryonen vorgenommen. Haltung, Zucht und Tötung der Tiere sowie die Isolation von Embryonen und Geweben erfolgten im Labor von Professor Roman Chrast (Karolinska Institutet, Stockholm, Schweden). Vom Canadian Mouse Mutant Repository (CMMR, Toronto, Canada) wurden transgene *Prdm12^{tm2a}*(EUCOMM)Hmgu-Mäuse auf einem C57BL/6J-Hintergrund (im Folgenden vereinfacht als *Prdm12^{tm2a}* bezeichnet) bezogen. In dieser Mauslinie war ein Teil des endogenen *Prdm12*-Gens mittels homologer Rekombination durch ein DNA-Fragment ersetzt worden, in dem Exon 2 von loxP-Schnittstellen flankiert ist und das stromaufwärts FRT-, LacZ-, loxP-, neo- und FRT-Elemente enthält. Mit Hilfe von Cre- und Flp-Rekombinasen können ausgehend vom *Prdm12^{tm2a}*-Allel LacZ-Reporter-, konstitutive Knockout- und konditionale Knockout-Allele generiert werden (**Abb. 5**).

4.1.1 Ausgangsallel *Prdm12^{tm2a}*

Zum PCR-Nachweis des *Prdm12^{tm2a}*-Allels wurde ein Primerpaar gewählt, das die Position der loxP-Sequenz in Intron 2 flankiert. Das Transgen liefert ein um 59 Basenpaare größeres PCR-Produkt als das *Prdm12*-Wildtyp-Allel (**Abb. 6**). Die Verteilung der Genotypen aus Kreuzungen heterozygoter *Prdm12^{tm2a}*-Mäuse mit Wildtyp-Tieren entsprach den Erwartungen nach den Mendelschen Regeln. Heterozygotie für das Transgen führte nicht zu erkennbaren phänotypischen Abweichungen. Nach Verpaarung heterozygoter Träger des *Prdm12^{tm2a}*-Allels konnten postnatal bei 81 Nachkommen (51 *Prdm12^{tm2a/wt}*, 30 *Prdm12^{wt/wt}*) keine lebenden, homozygoten *Prdm12^{tm2a}*-Mäuse nachgewiesen werden.

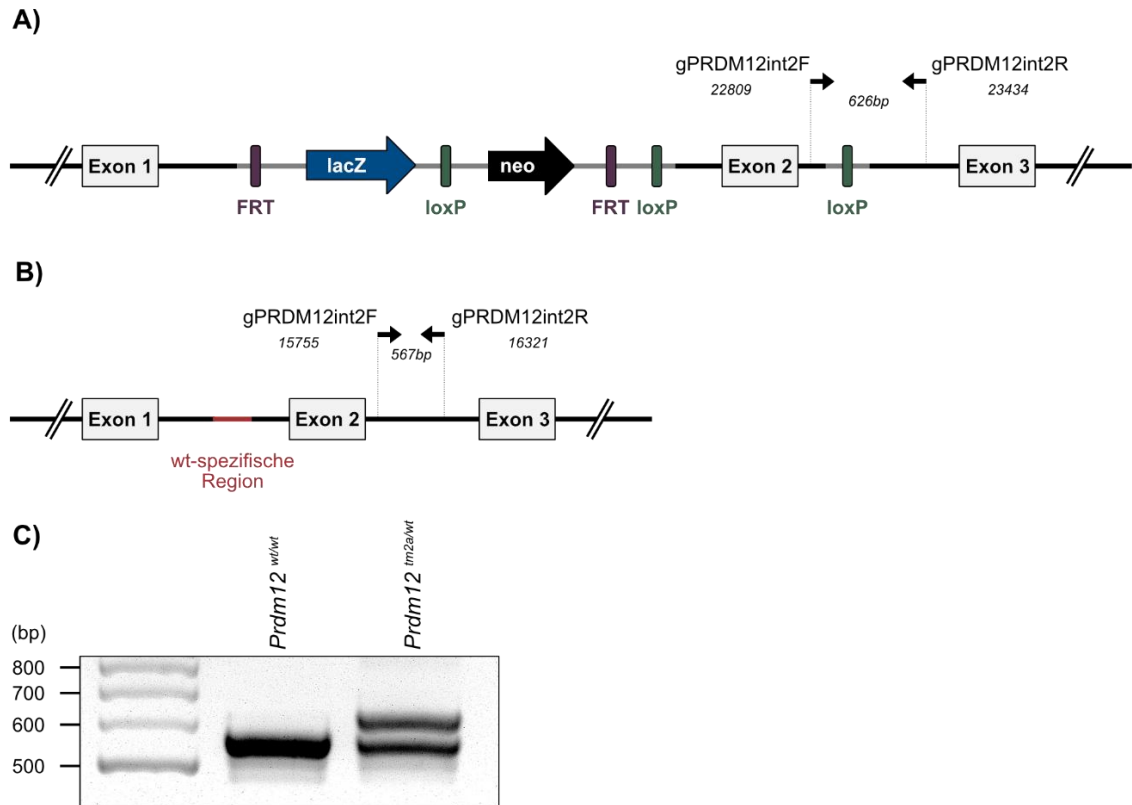


Abb. 6: PCR-Strategie zum Nachweis des *Prdm12^{tm2a}*- und Wildtyp-Allels

FRT – Zielsequenz der Flippase (Flp); lacZ – β -Galactosidase-Reporter; loxP – Zielsequenz der Cre-Rekombinase (Cre); neo – Neomycin-Kassette; schwarze Bereiche entsprechen dem Wildtyp-Allel; hellgraue Bereiche umfassen die künstlich eingebrachten Elemente; der rote Bereich ist spezifisch für das Wildtyp-Allel. Basenpositionen beziehen sich auf das jeweilige Allel. **(A)** Positionen der PCR-Primer mit Größenangabe des PCR-Produkts im *Prdm12^{tm2a}*-Allel (NCBI Accession Number: JN960000). **(B)** Positionen der PCR-Primer mit Größenangabe des PCR-Produkts im Wildtyp-Allel (NCBI Accession Number NC_000068). **(C)** Repräsentatives Beispiel einer Genotypisierungs-PCR zum Nachweis des *Prdm12^{tm2a}*-Transgens in postnatalen Tieren.

4.1.2 LacZ Reporter- und Knockout-Allel *Prdm12^{tm2b}*

Durch Kreuzung von männlichen Trägern des *Prdm12^{tm2a}*-Allels mit weiblichen Tieren, die Cre-Rekombinase unter der Kontrolle des CAG-Promotors exprimieren, wurde die Entfernung der neo-Kassette und des „gefloxten“ *Prdm12* Exon 2 erreicht. Das CAG Cre-Transgen wird bereits in der Keimbahn exprimiert und bleibt in reifen Eizellen unabhängig von der Übertragung des Transgens erhalten. Dementsprechend kann eine effiziente Cre-vermittelte Rekombination der väterlichen Zielgene bei Befruchtung angenommen werden [39]. Im rekombinierten Allel wird die LacZ-Kassette unter der Kontrolle des endogenen *Prdm12*-Promo-

tors exprimiert, so dass durch den Nachweis von β -Galaktosidase bzw. ihrer enzymatischen Aktivität [40] die zeitliche und örtliche Expression des *Prdm12*-Gens untersucht werden kann. Da im Zuge der Rekombination Exon 2 deletiert wird, kann kein funktionales *Prdm12*-Transkript mehr gebildet werden, und es resultiert zusätzlich ein konstitutiver Gen-Knockout. Der Nachweis der erfolgreichen Rekombination im *Prdm12^{tm2b}*-Allel erfolgte über Primer, die stromauf- bzw. stromabwärts der äußeren loxP-Schnittstellen binden. Das Wildtyp-Allel wurde mittels PCR-Amplifikation eines DNA-Abschnitts nachgewiesen, der im Transgen nicht vorhanden ist („Wildtyp-spezifische Sequenz“; **Abb. 7**).

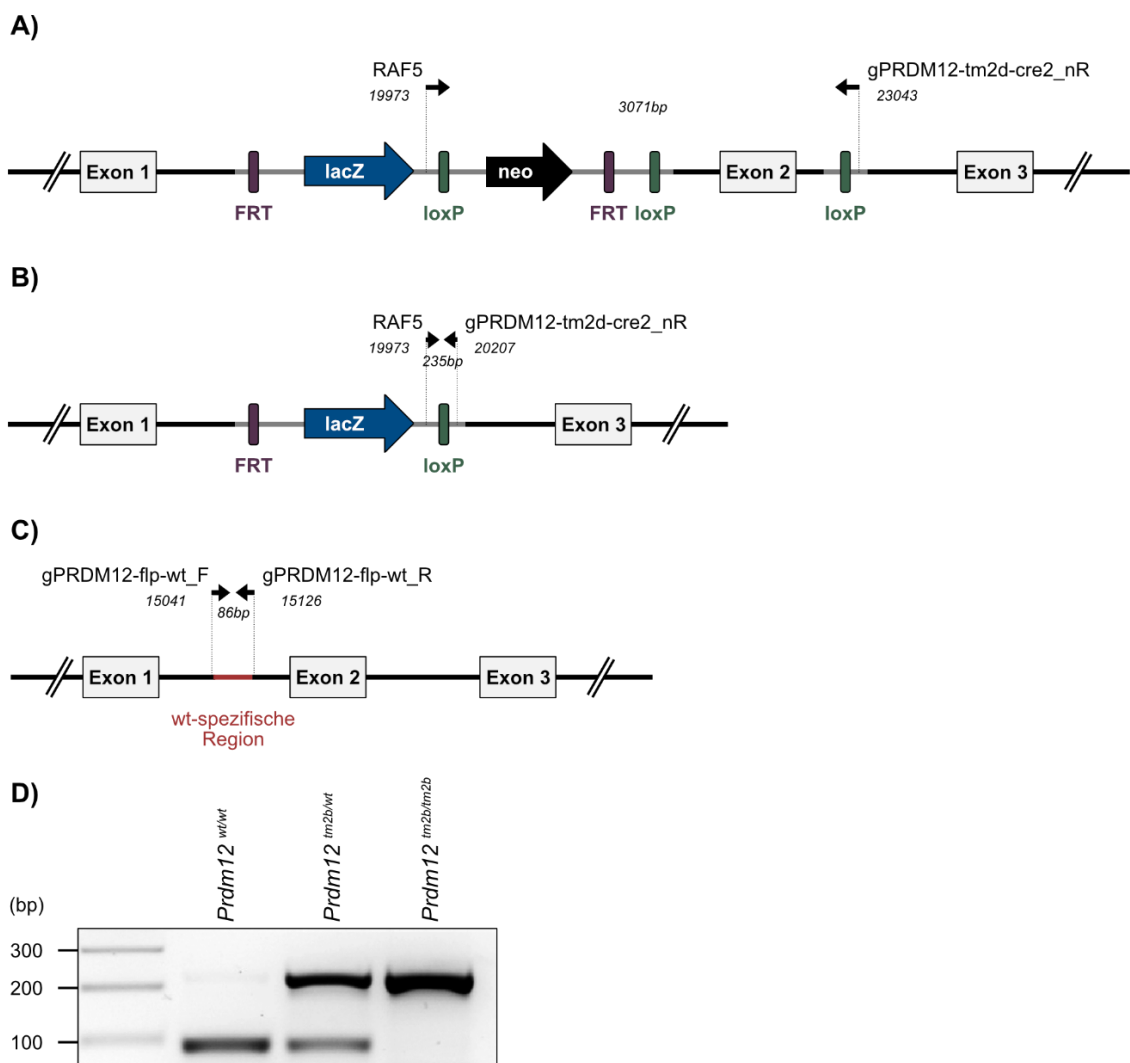


Abb. 7: PCR-Strategie zum Nachweis des *Prdm12^{tm2b}*- und Wildtyp-Allels

Fortsetzung auf Seite 34.

Fortsetzung von Seite 33.

FRT – Zielsequenz der Flippase (Flp); LacZ – β -Galactosidase-Reporter; loxP – Zielsequenz der Cre-Rekombinase (Cre); schwarze Bereiche entsprechen dem Wildtyp-Allel; hellgraue Bereiche umfassen die durch homologe Rekombination eingebrachten Elemente; der rote Bereich ist spezifisch für das Wildtyp-Allel. Basenpositionen basieren auf dem jeweiligen Allel. Position der Primer zum Nachweis des *Prdm12^{tm2b}*-Allels mit Größenangabe des erwarteten PCR-Produkts im *Prdm12^{tm2a}*-Allel (A) und *Prdm12^{tm2b}*-Allel (B). (C) Position der Primer zum Nachweis des Wildtyp-Allels mit Größenangabe des erwarteten PCR-Produkts. (D) Repräsentatives Beispiel einer Genotypisierungs-PCR zum Nachweis des *Prdm12^{tm2b}*-Allels in Embryonen (E15,5). Das im Falle des *Prdm12^{tm2a}*-Allels erwartete > 3 kb große Produkt war unter den gewählten PCR-Bedingungen nicht nachweisbar.

Nach Verpaarung heterozygoter Träger des *Prdm12^{tm2b}*-Allels konnten homozygote Nachkommen im Embryonalstadium zu den Zeitpunkten E12,5 und E15,5 nachgewiesen werden. Die Verteilung der Genotypen entsprach dabei den Mendelschen Regeln. Postnatal konnte unter 86 Nachkommen (55 *Prdm12^{tm2b/wt}*, 31 *Prdm12^{wt/wt}*) kein homozygotes Tier nachgewiesen werden.

4.1.3 Allel mit konditionalem Potential *Prdm12^{tm2c}*

Durch Verpaarung von *Prdm12^{tm2a}*-Mäusen mit einer Flp-Rekombinase exprimierenden Mauslinie können die LacZ- und die neo-Kassette entfernt werden. Es resultiert ein intaktes *Prdm12*-Gen, in dem Exon 2 von loxP-Schnittstellen flankiert wird (Abb. 8). Durch Verpaarung mit Mäusen, die ein Transgen für eine entsprechende Cre-Rekombinase tragen, ist eine zelltypspezifische Deletion von Exon 2 und damit eine Inaktivierung des Gens in den jeweiligen Zellpopulationen möglich. Unter Verwendung von induzierbaren Cre-Rekombinasen ist darüber hinaus auch eine globale oder zelltypspezifische Ausschaltung des Gens zu definierten Zeitpunkten möglich [41]. Schließlich kann das *Prdm12^{tm2c}*-Allel durch Kreuzung mit einer Cre-Deleter-Linie auch zur Generierung eines konstitutiven Knockouts verwendet werden, der im Unterschied zum *Prdm12^{tm2b}*-Allel keine lacZ-Kassette mehr aufweist. Der Nachweis der erfolgreichen Rekombination im *Prdm12^{tm2a}*-Allel erfolgte über Primer, die stromauf- bzw. stromabwärts der FRT-Schnittstellen binden. Das Wildtyp-Allel wurde mittels PCR-Amplifikation der „Wildtyp-spezifische Sequenz“ nachgewiesen. Die Zucht homozygoter Mäuse war ohne Einschränkungen möglich. Die Verteilung der Genotypen folgte den Mendelschen Regeln.

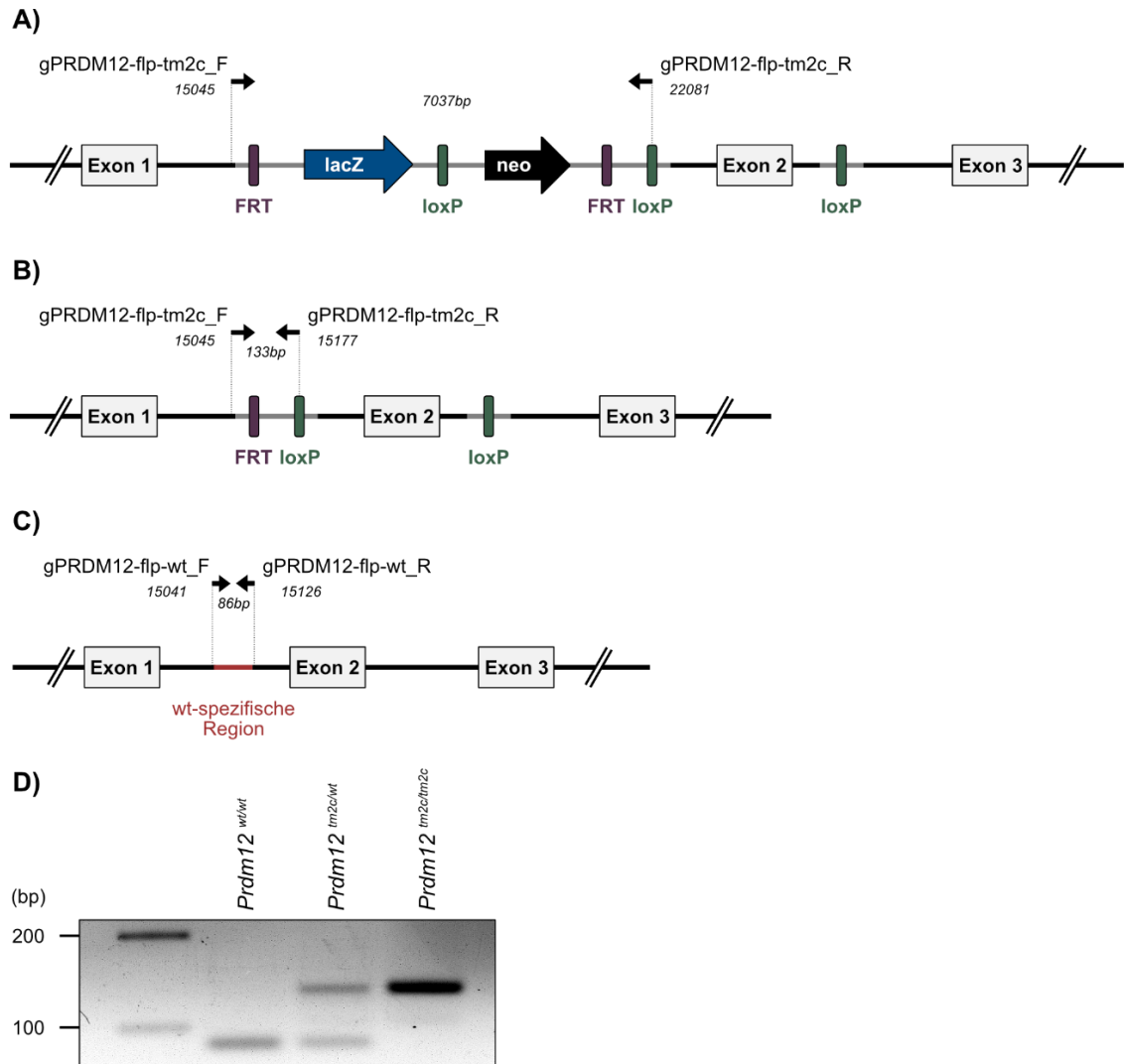


Abb. 8: PCR-Strategie zum Nachweis des *Prdm12^{tm2c}*- und Wildtyp-Allels

FRT – Zielsequenz der Flippase (Flp); loxP – Zielsequenz der Cre-Rekombinase (Cre); schwarze Bereiche entsprechen dem Wildtyp-Allel; hellgraue Bereiche umfassen die durch homologe Rekombination eingebrachten Elemente; der rote Bereich ist spezifisch für das Wildtyp-Allel. Basenpositionen basieren auf dem jeweiligen Allel. Position der Primer zum Nachweis des *Prdm12^{tm2c}*-Allels mit Größenangabe des erwarteten PCR-Produkts im *Prdm12^{tm2a}*-Allel (**A**) und *Prdm12^{tm2c}*-Allel (**B**). (**C**) Position der Primer zum Nachweis des Wildtyp-Allels mit Größenangabe des erwarteten PCR-Produkts. (**D**) Repräsentatives Beispiel einer Genotypisierungs-PCR zum Nachweis des *Prdm12^{tm2c}*-Allels in postnatalen Tieren. Das im Falle des *Prdm12^{tm2a}*-Allels erwartete > 7kb große Produkt war unter den gewählten PCR-Bedingungen nicht nachweisbar.

4.1.4 Knockout-Allel *Prdm12^{tm2d}*

Ein konstitutiver Knockout wurde durch Verpaarung von männlichen Trägern des *Prdm12^{tm2c}*-Allels mit weiblichen Tieren erreicht, die Cre-Rekombinase unter Kontrolle des CAG-Promotors exprimieren. Dabei wird das von loxP-Stellen flankierte, kritische Exon 2 entfernt, wodurch ein funktionales *Prdm12*-Transkript nicht mehr gebildet werden kann. Zum Nachweis der Rekombination wurden PCR-Primer gewählt, die die verbliebenen loxP- und FRT-Schnittstellen flankieren (**Abb. 9**).

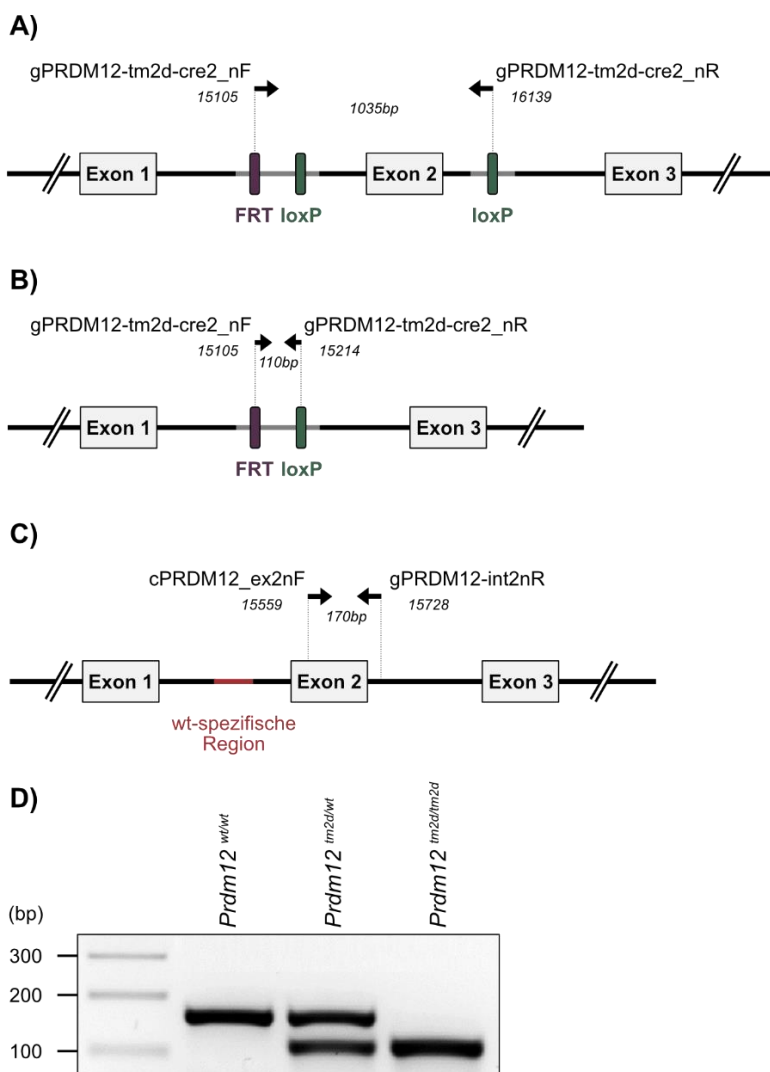


Abb. 9: PCR-Strategie zum Nachweis des *Prdm12^{tm2d}*- und Wildtyp-Allels

Fortsetzung auf Seite 37.

Fortsetzung von Seite 36.

FRT – Zielsequenz der Flippase (Flp); loxP – Zielsequenz der Cre-Rekombinase (Cre); schwarze Bereiche entsprechen dem Wildtyp-Allel; hellgraue Bereiche umfassen die durch homologe Rekombination eingebrachten Elemente; der rote Bereich ist spezifisch für das Wildtyp-Allel. Basenpositionen basieren auf dem jeweiligen Allel. Position der Primer zum Nachweis des *Prdm12^{tm2d}*-Allels mit Größenangabe des erwarteten PCR-Produkts im *Prdm12^{tm2c}*-Allel (A) und *Prdm12^{tm2d}*-Allel (B). (C) Position der Primer zum Nachweis des Wildtyp-Allels mit Größenangabe des erwarteten PCR-Produkts. (D) Repräsentatives Beispiel einer Genotypisierungs-PCR zum Nachweis des *Prdm12^{tm2d}*-Allels in Embryonen (E15,5). Das im Falle des *Prdm12^{tm2c}*-Allels erwartete > 1 kb große Produkt war unter den gewählten PCR-Bedingungen nicht nachweisbar.

Zum PCR-Nachweis des Wildtyp-Allels wurden Primer so positioniert, dass sie das kritische Exon 2 erfassten. Nach Verpaarung heterozygoter Träger des *Prdm12^{tm2d}*-Allels konnten homozygote Nachkommen im Embryonalstadium zu den Zeitpunkten E12,5 und E15,5 nachgewiesen werden. Die Verteilung der Genotypen entsprach dabei den Mendelschen Regeln. Postnatal konnte unter 90 Nachkommen (54 *Prdm12^{tm2d/wt}*, 36 *Prdm12^{wt/wt}*) kein homozygoten Tier nachgewiesen werden.

4.2 Untersuchung des PRDM12-defizienten Mausmodells

4.2.1 Makroskopische Untersuchung von Mausembryonen

Prdm12^{tm2b/tm2b}- und *Prdm12^{tm2d/tm2d}*-Embryonen wiesen makroskopisch zu den Zeitpunkten E12,5 und E15,5 keine offensichtlichen genotypbezogenen morphologischen Unterschiede auf (Abb. 10). Auch in späteren Schwangerschaftsstadien (bis E18,5) waren homozygote *Prdm12*-Knockout-Embryonen nachweisbar und zeigten keine makroskopischen Auffälligkeiten (persönliche Mitteilung Professor Roman Chrast (Karolinska Institutet, Stockholm, Schweden); [42]). Nach der Geburt konnte in der durchgeführten Genotypisierung keine homozygoten Knockout-Tiere nachgewiesen werden, so dass – im Unterschied zur Situation beim Menschen – der Verlust von PRDM12 in der Maus mit perinataler Letalität einherzugehen scheint. Somit war eine Analyse postnataler Stadien homozygoter Träger der Knockout-Allele *Prdm12^{tm2b/tm2b}* und *Prdm12^{tm2d/tm2d}* nicht möglich. Heterozygote Tiere waren lebensfähig, fruchtbar, von normaler Größe und wiesen keine makroskopisch sichtbaren Unterschiede zu Trägern des Wildtyp-Allels auf (persönliche Mitteilung Professor Roman Chrast (Karolinska Institutet, Stockholm, Schweden); [42]).

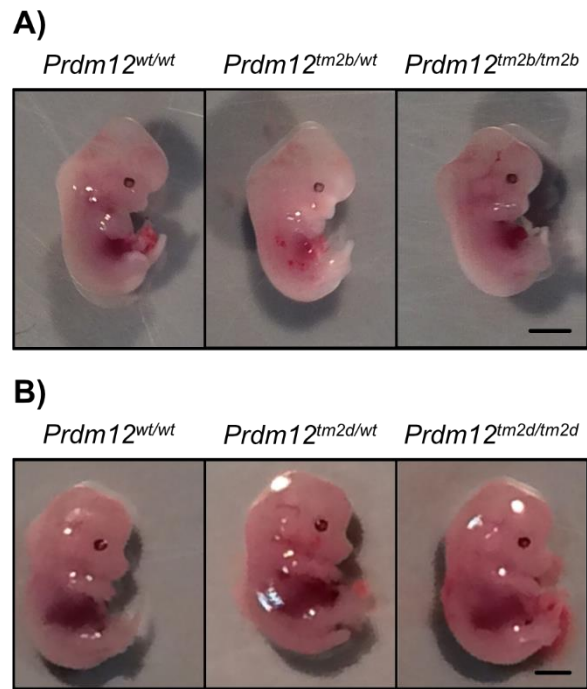


Abb. 10: Makroskopischer Aspekt von Maus-Embryonen

(A) Embryonen mit den Genotypen *Prdm12^{wt/wt}*, *Prdm12^{tm2b/wt}* und *Prdm12^{tm2b/tm2b}* zum Zeitpunkt E12,5. (B) Embryonen mit den Genotypen *Prdm12^{wt/wt}*, *Prdm12^{tm2d/wt}* und *Prdm12^{tm2d/tm2d}* zum Zeitpunkt E15,5. Makroskopisch sind keine eindeutigen morphologischen Besonderheiten in Abhängigkeit vom Genotyp zu erkennen. Maßstabsbalken, 2 mm.

4.2.2 Orientierende Untersuchung der Spinalganglien in Mausembryonen

Für eine erste orientierende Analyse der Folgen einer PRDM12-Ablation in der sensiblen Neurogenese wurden Spinalganglien in Mausembryonen unter Verwendung eines Antikörpers gegen den pan-neuronalen Marker β -Tubulin 3 (TUJ1) dargestellt. Die Spinalganglien in *Prdm12^{tm2d/tm2d}*-Embryonen enthielten deutlich weniger neuronale Zellen und waren deutlich kleiner als bei Wildtyp-Embryonen (**Abb. 11**). Heterozygote Tiere wiesen keine Unterschiede im Vergleich zum Wildtyp auf.

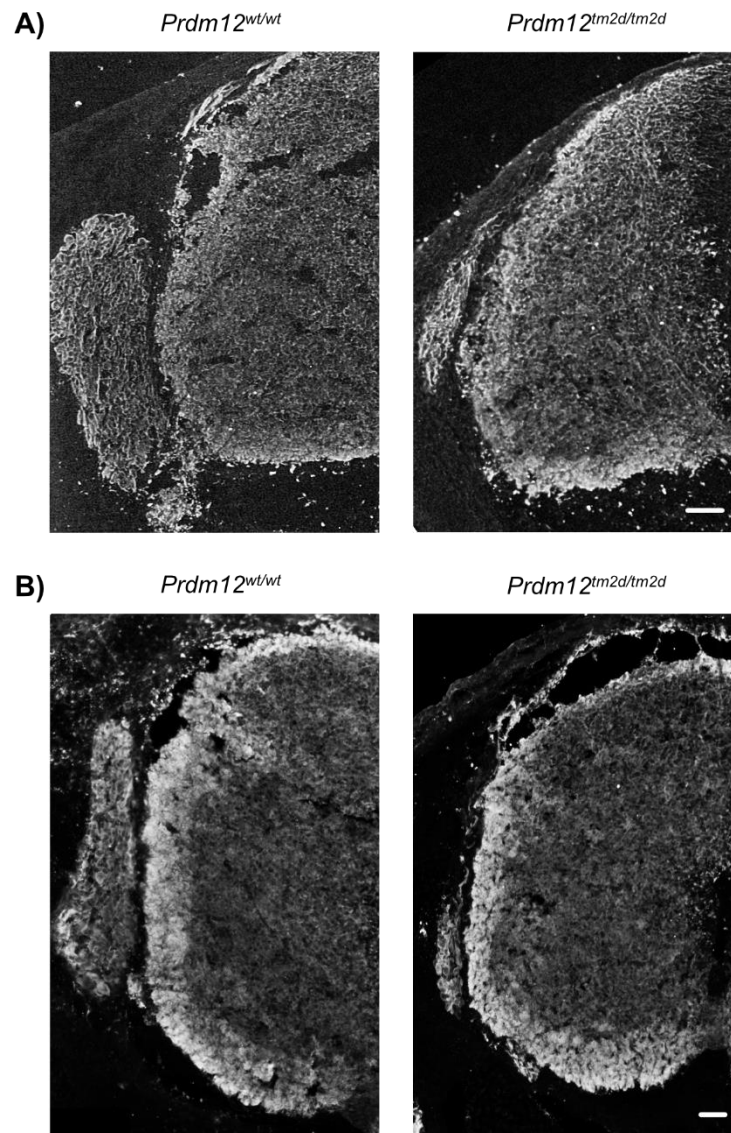


Abb. 11: Lumbale Spinalganglien in *Prdm12*-Knockout-Mausembryonen

Immunfluoreszenzmikroskopische Darstellung neuronal differenzierter Zellen durch den panneuronalen Antikörper TUJ1. **(A)** Zeitpunkt E12,5. **(B)** Zeitpunkt E15,5. In homozygoten *Prdm12^{tm2d}*-Embryonen ist im Vergleich zum Wildtyp eine deutliche verringerte Zahl der Neuronen und eine erhebliche Größenreduktion der Spinalganglien zu erkennen. Maßstabsbalken, 50 μ m.

Eine unterschiedliche Schnitthöhe als Ursache der Größendifferenz der Spinalganglien von homozygoten *Prdm12^{tm2d}*- und Wildtyp-Embryonen konnte durch das Anfertigen von Serienschnitten ausgeschlossen werden (**Abb. 12**).

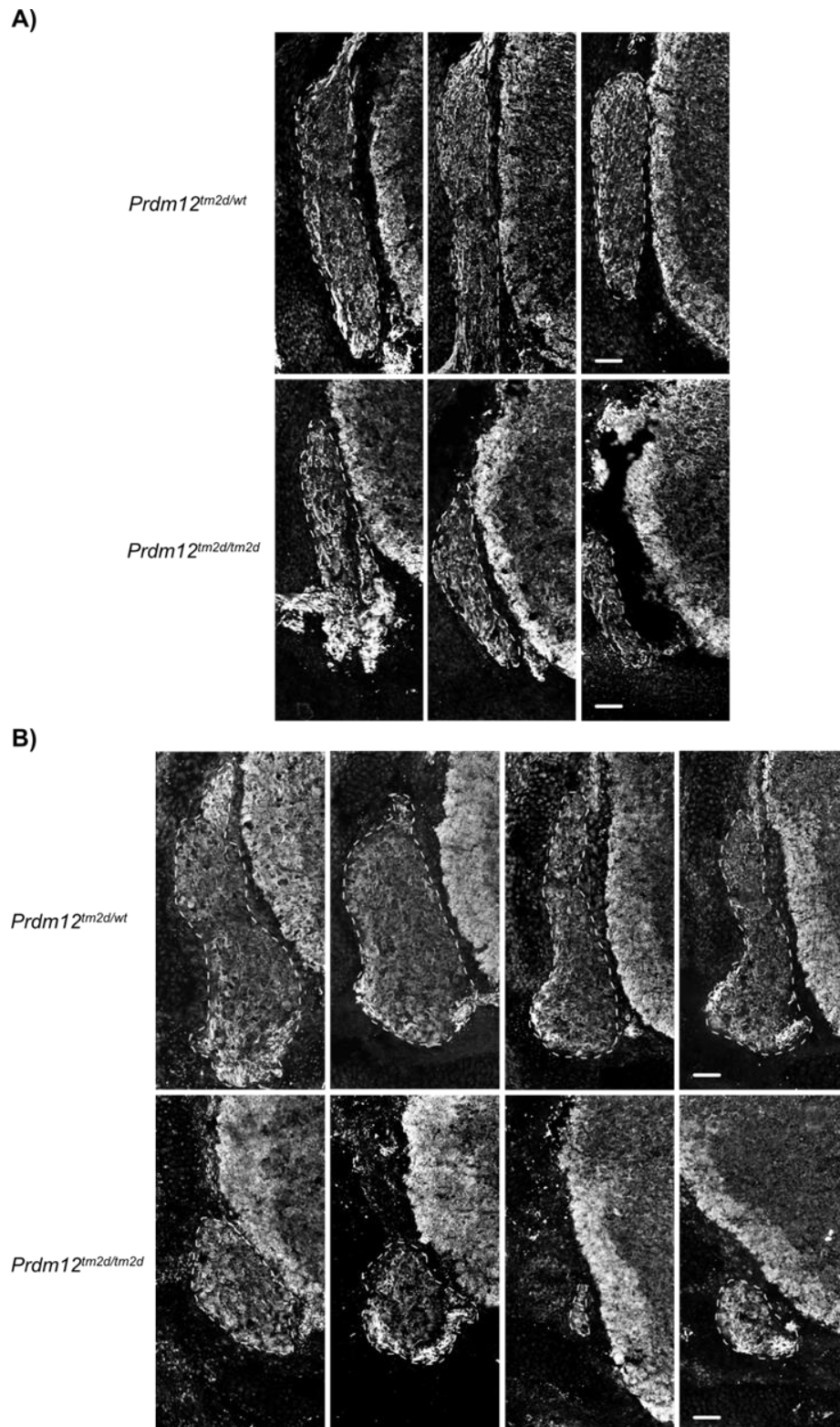


Abb. 12: Serienschnitte lumbaler Spinalganglien in *Prdm12*-Knockout- Mausembryonen

Darstellung von Spinalganglien in verschiedenen transversalen Schnittebenen (Abstand der Ebenen: 20 μm). Panneuronale Färbung mit einem anti-TUJ1-Antikörper. (A) Embryonen am Tag E12,5. (B) Embryonen am Tag E15,5. Die Größenreduktion der Spinalganglien homozygoter Tiere im Vergleich zu heterozygoten Trägern des Knockout-Allels ist in allen Schnittebenen nachvollziehbar. Maßstabsbalken, 50 μm .

4.3 Funktionelle Analyse des Transkriptionsfaktors PRDM12

4.3.1 Nachweis der Repressoraktivität von PRDM12

Für einige Mitglieder der PRDM-Proteinfamilie konnte gezeigt werden, dass sie repressive Transkriptionsfaktoren sind [27]. Deshalb sollte überprüft werden, ob auch PRDM12 eine derartige Funktion hat, wenn es im Komplex mit Chromatin vorliegt. Da die DNA-Bindungsdomäne und die Zielgene von PRDM12 bislang nicht bekannt sind, wurde ein heterologes Promotorsystem eingesetzt. Die DNA-Bindungsdomäne des Hefe-Transkriptionsfaktors GAL4 (GAL4-DBD) wurde mit dem N-Terminus von PRDM12 fusioniert und das Konstrukt durch transiente Transfektion in HEK293-Zellen eingebracht. Die Zellen wurden gleichzeitig mit einem Reporterplasmid transfiziert, das fünf GAL4-Bindungsstellen stromaufwärts eines minimalen Thymidinkinase-Promotors enthielt, der die Expression einer Luciferase-Kassette kontrollierte. Dieses Experiment zeigte, dass PRDM12 die Reporteraktivität dosisabhängig unterdrücken kann (**Abb. 13**).

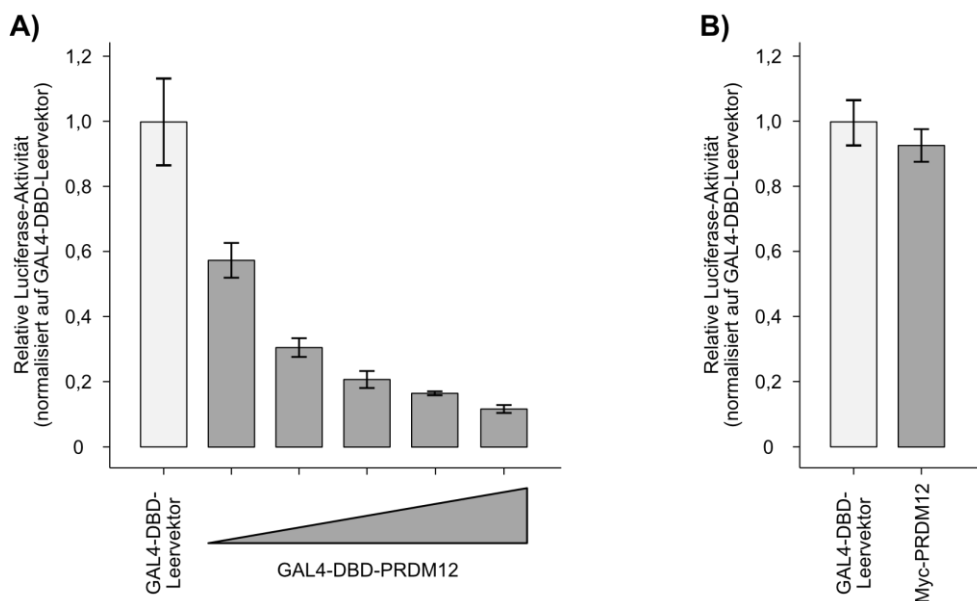


Abb. 13: Repressoraktivität eines GAL4-DBD-PRDM12-Fusionsproteins

(A) Die Repressoraktivität von unterschiedlichen PRDM12-Konzentrationen im Vergleich zum leeren GAL4-DBD-Konstrukt wurde mit Hilfe eines Reporterassays getestet. Die Ergebnisse beruhen auf mindestens drei unabhängigen Experimenten mit jeweils zwei technischen Replikaten. Die Diagramme zeigen Mittelwerte und Standardabweichungen. Die zunehmende Repressoraktivität mit zunehmenden PRDM12 Konzentrationen deutet auf eine Dosisabhängigkeit hin. (B) PRDM12 ohne GAL4-DBD (Myc-PRDM12) zeigte keinen Effekt im Vergleich zum GAL4-DBD-Leervektor.

Um die Auswirkungen von pathogenen, bei Patienten nachgewiesenen *PRDM12*-Varianten auf die Repressoraktivität zu untersuchen, wurden entsprechend modifizierte GAL4-DBD-*PRDM12*-Expressionskonstrukte zur Transfektion von HEK293-Zellen etabliert. Alle untersuchten krankheitsassoziierten *PRDM12*-Varianten führten zu einem partiellen, statistisch jeweils signifikanten Verlust der Repressoraktivität (**Abb. 14**).

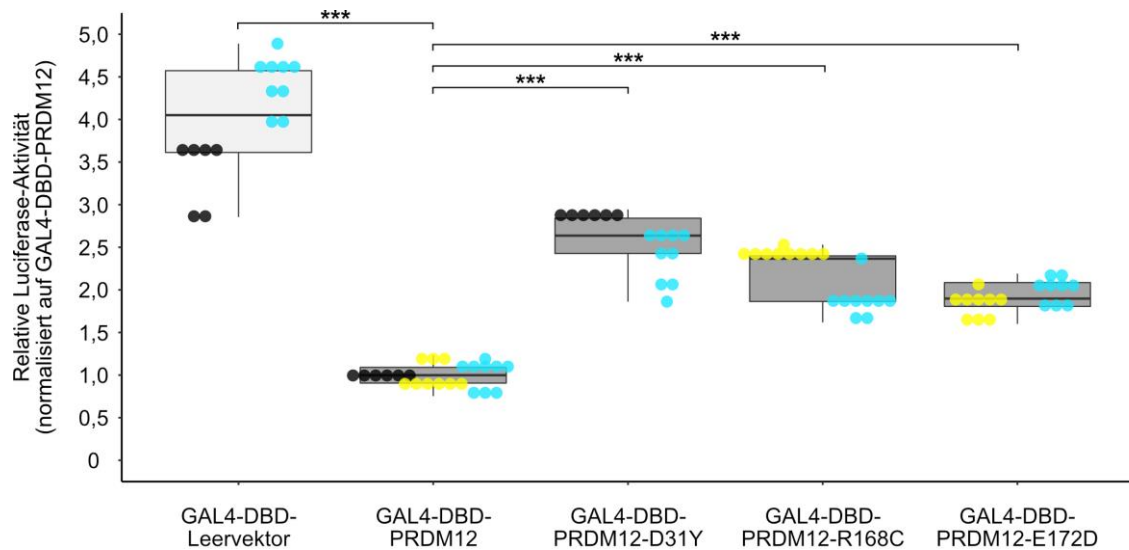


Abb. 14: Repressoraktivität krankheitsassoziiierter *PRDM12*-Varianten

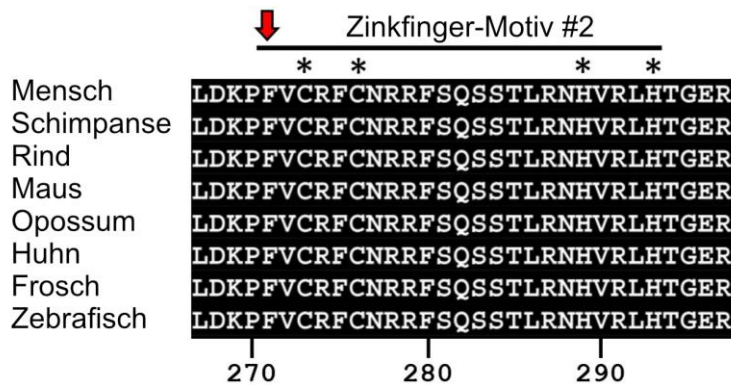
Die Repressoraktivität von drei patientenspezifischen *PRDM12*-Varianten wurde mit Hilfe eines Reporterassays getestet. Die Ergebnisse beruhen auf mindestens drei unabhängigen Experimenten mit jeweils zwei technischen Replikaten. Die Boxplots stellen den Median, das erste und dritte Quartil dar, die Whisker reichen bis zum 1,5-fachen Interquartilabstand. Gleichfarbige Punkte entsprechen Werten aus einem Messdurchgang. Die statistische Analyse erfolgte mittels Wilcoxon Signed-Rank-Test. Die p-Werte sind als *** ($p < 0,001$) angegeben. Alle untersuchten Varianten zeigten einen signifikanten Verlust an Repressoraktivität im Vergleich zu GAL4-DBD-*PRDM12* (Wildtyp).

4.3.2 Interaktion von *PRDM12* mit anderen Proteinen

Mitglieder der *PRDM*-Familie können Co-Transkriptionsfaktoren rekrutieren, um repressive Multiproteinkomplexe zu bilden [27]. So konnte beispielsweise für *PRDM12* gezeigt werden, dass es mit der Histon-Methyltransferase G9a einen Komplex bildet, der die Dimethylierung von Histon H3 an Lysin 9 (H3K9me₂) bewirkt [28]. Co-Immunpräzipitationsstudien mit *PRDM12*-Mutanten, denen Teile der Zinkfingerdomäne fehlten oder die Punktmutationen in der Zinkfingerdomäne

aufwiesen, legten nahe, dass das zweite Zinkfinger-Motiv für die Assoziation mit G9a erforderlich ist [18, 28]. In der vorliegenden Arbeit wurde deshalb überprüft, ob die krankheitsassoziierte PRDM12-Variante p.F271I, die den zweiten Zinkfinger betrifft, ebenfalls die Bindung an G9a beeinträchtigt. Tatsächlich zeigte sich in der Co-Immunpräzipitation eine deutlich abgeschwächte Interaktion mit G9a (**Abb. 15**). Der betroffene Phenylalaninrest 271 ist in der Evolution stark konserviert und in unmittelbarer Nähe zum Cystein-Rest 273 lokalisiert, der an der Koordination des zentralen Zinkions und damit an der Ausbildung der Tertiärstruktur des Zinkfingers beteiligt ist (**Abb. 15**).

A)



B)

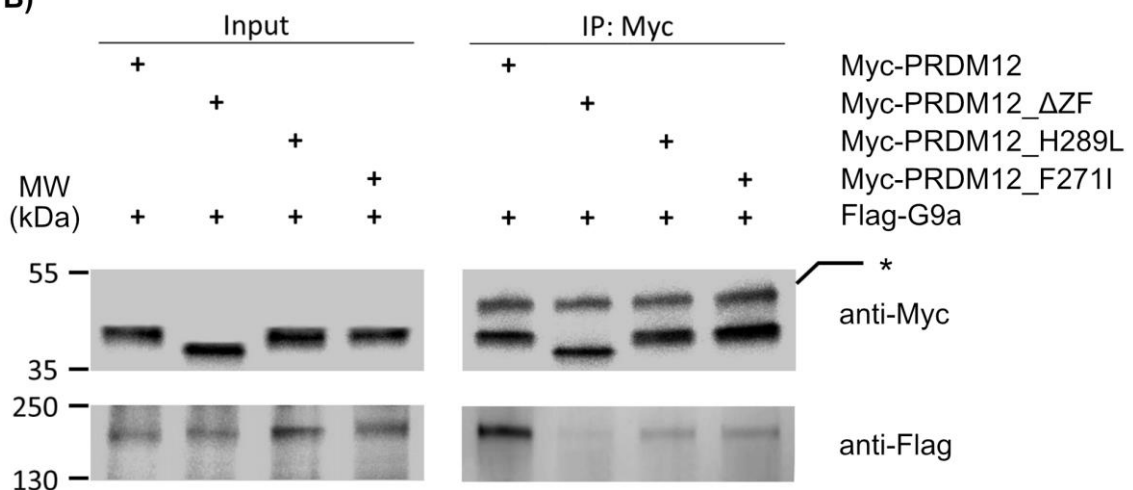


Abb. 15: Auswirkung der PRDM12 p.F271I-Variante auf die Interaktion mit G9a

Fortsetzung auf Seite 44.

Fortsetzung von Seite 43.

(A) Vergleich der Sequenzen des zweiten PRDM12-Zinkfingermotivs in verschiedenen Spezies. Die Sequenz ist in der Evolution vollständig konserviert. Sterne markieren Aminosäurereste, die an der Koordination des zentralen Zinkions beteiligt sind. Die Position von Phenylalanin 271 ist durch einen roten Pfeil markiert. (B) Myc-PRDM12 und Flag-G9a wurden in COS-7-Zellen (Input) exprimiert und mit anti-Myc-Antikörpern, die an eine Sepharosematrix gekoppelt waren, immunpräzipitiert (IP: Myc). Die Menge an co-präzipitiertem G9a wurde auf die Menge von präzipitiertem PRDM12 und die G9a-Spiegel im Zelllysate normiert. Der artifiziellen Mutante PRDM12 Δ ZF fehlt die gesamte Zinkfinger-Domäne. Die Variante p.F271I führt ähnlich wie die bereits publizierte Variante p.H289L zu einer deutlich verminderten Bindung von G9a. * schwere IgG-Kette.

Um weitere, bisher noch nicht bekannte Bestandteile des PRDM12-Repressor-komplexes zu identifizieren, erfolgte durch die kooperierende Arbeitsgruppe von Herrn PD Dr. rer. nat. Andreas Roos (Leibniz-Institute of Analytical Sciences (I-SAS), Dortmund, Deutschland) ein proteomisches Screening auf Proteine, die mit PRDM12 interagieren. Dazu wurden mit einem Tandem-Affinitätstag versehenes PRDM12 in stabil transfizierten HEK293-Zellen überexprimiert, der PRDM12-Proteinkomplex mittels Tandem-Affinitätsaufreinigung aufgereinigt und die im Komplex enthaltenen Proteine anschließend durch Massenspektrometrie identifiziert (zu Details des Protokolls siehe [44]). Bei einem der identifizierten möglichen PRDM12-Bindungspartner handelte es sich um den Co-Transkriptionsfaktor CBFA2T2 (CBFA2/RUNX1 partner transcriptional co-repressor 2 [45]). Zur weiteren Charakterisierung der möglichen Bindung von PRDM12 an CBFA2T2 wurden Myc-getagtes PRDM12 und HA-getagtes CBFA2T2 in HEK293-Zellen überexprimiert und anschließend PRDM12 mit Hilfe eines anti-Myc-Antikörpers aus Zelllysaten immunpräzipitiert. Passend zu den Ergebnissen der Tandem-Affinitätsaufreinigung war CBFA2T2 im Präzipitat nachweisbar. Untersuchungen mit PRDM12-Deletionsmutanten zeigten, dass für die Bindung an CBFA2T2 die PR-Domäne von PRDM12 erforderlich ist, nicht aber die Zinkfinger-Domäne: Eine PRDM12-Deletionsmutante, die keine PR-Domäne aufwies (Δ PR), zeigte keine Interaktion mit CBFA2T2, während die Deletion der Zinkfinger-motive (Δ ZF) keinen erkennbaren Einfluss auf die Bildung des PRDM12-CBFA2T2-Komplexes hatte (**Abb. 16**).

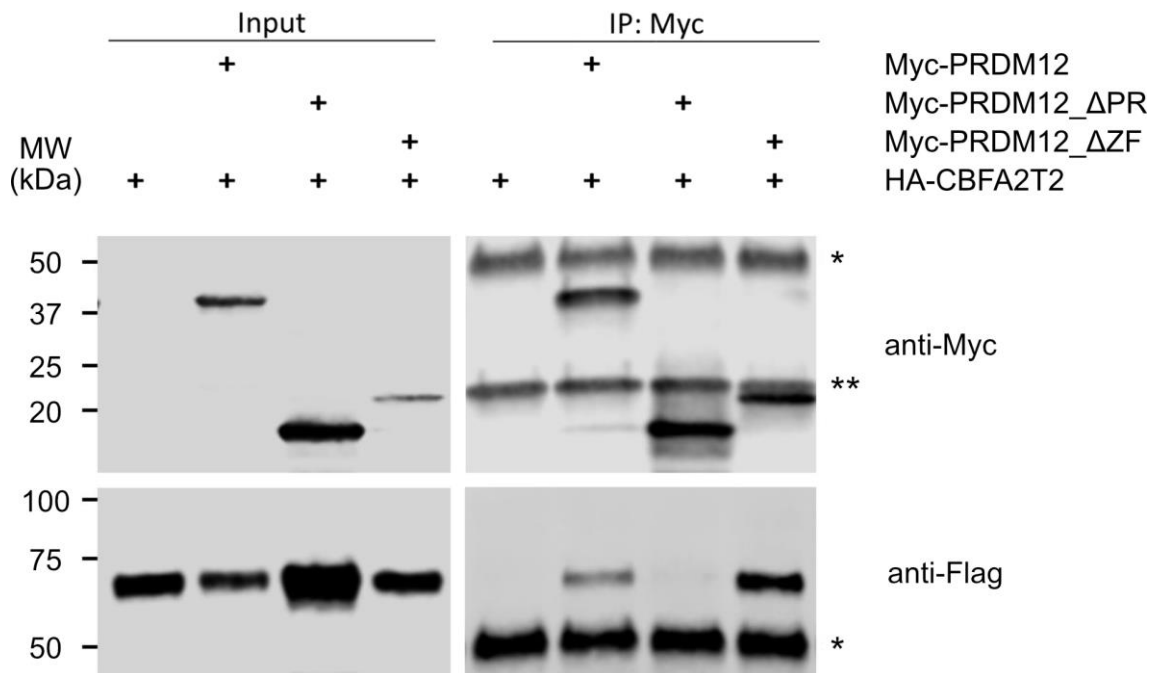


Abb. 16: Nachweis der Interaktion von PRDM12 und CBFA2T2

Co-Immunpräzipitation von PRDM12 und CBFA2T2. Myc-PRDM12 und HA-CBFA2T2 wurden in COS-7-Zellen (Input) exprimiert und mit anti-Myc-Antikörpern, die an eine Sepharosematrix gekoppelt waren, immunpräzipitiert (IP: Myc). Die Menge an co-präzipitiertem CBFA2T2 wurde auf die Menge von präzipitiertem PRDM12 und die CBFA2T2-Spiegel im Zelllysate normiert. Sowohl mit Wildtyp-Vollängen-PRDM12 als auch mit einer artifiziellen Mutante, der die Zinkfinger-Motive fehlen (Δ ZF), kann CBFA2T2 koimmunpräzipitiert werden. Eine artifizielle PRDM12-Mutante, der die PR-Domäne fehlt (Δ PR), bindet nicht an CBFA2T2. * Schwere IgG-Kette; ** Leichte IgG-Kette.

Zur Überprüfung der Plausibilität einer Interaktion zwischen PRDM12 und CBFA2T2 wurden die Expressionsprofile und die subzelluläre Lokalisation der beiden Proteine miteinander verglichen. Die Expression von *Prdm12* ist während der Embryonalentwicklung der Maus strikt auf sensible Ganglien beschränkt [18]. Die Auswertung öffentlich zugänglicher Expressionsdaten in Genepaint (<https://gp3.mpg.de>; [46]) zeigte, dass das Expressionsspektrum von *Cbfa2t2* in embryonalen Geweben verhältnismäßig breit ist und mit der Expression von *Prdm12* in sich entwickelnden DRGs überlappt (**Abb. 17A**). Die Analyse publizierter mRNA-Sequenzierungsdaten [47, 48] ergab, dass - ähnlich wie *Prdm12* - auch *Cbfa2t2* in sensiblen Ganglien erwachsener Mäuse exprimiert wird (**Abb. 17B**); allerdings zeigt *Cbfa2t2* bei Weitem nicht die gleiche extreme Spezifität für Nozizeptoren wie *Prdm12* (**Abb. 17C**).

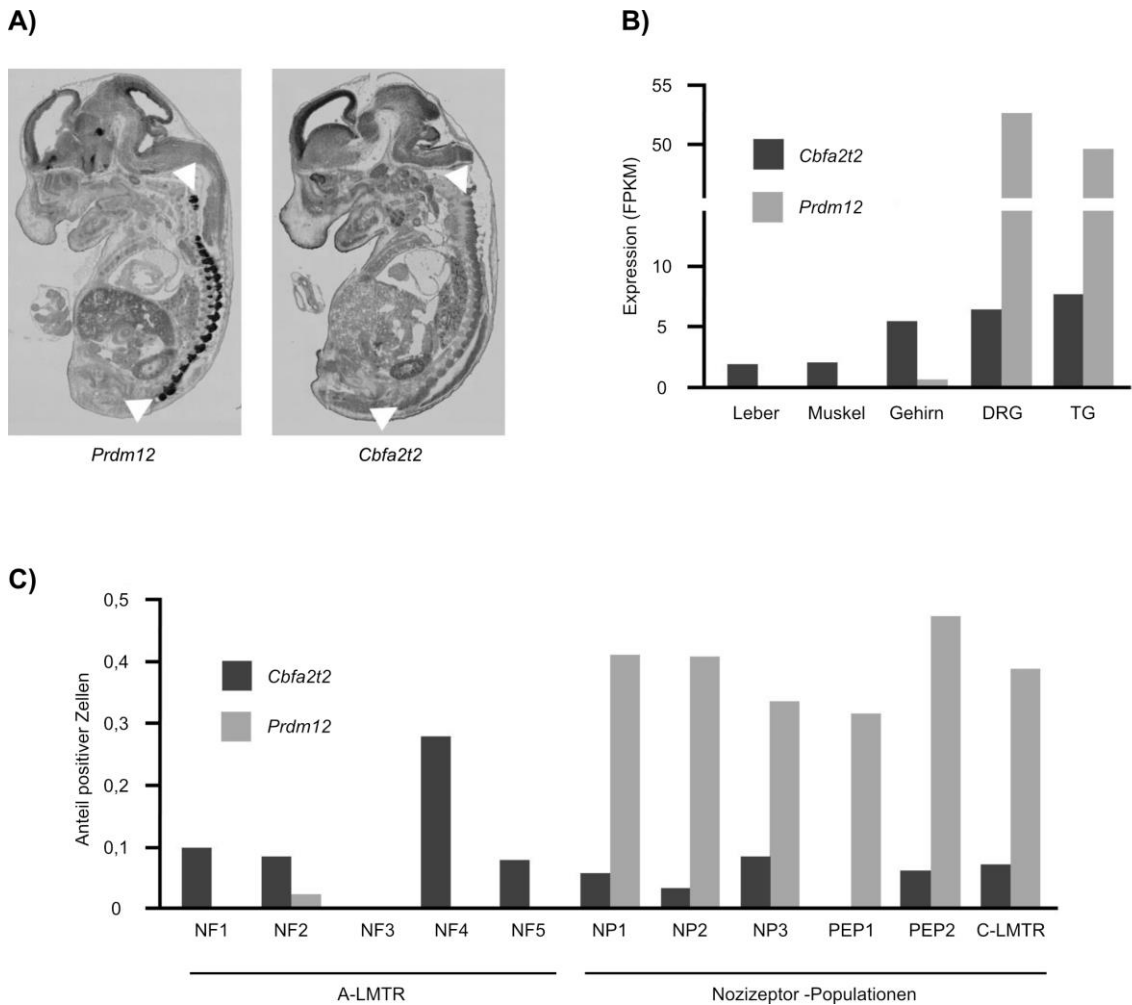


Abb. 17: Gemeinsame Expression von *Prdm12* und *Cbfa2t2* in sensiblen Ganglien der Maus

(A) In-situ-Hybridisierungsbilder von E14,5-Mäuseembryonen zeigen eine starke, regional begrenzte Expression von *Prdm12* in Spinalganglien (linkes Bild, Pfeilspitzen), während *Cbfa2t2* eine breite Expression aufweist und auch in Spinalganglien nachweisbar war (rechtes Bild, Pfeilspitzen). Die Bilder stammen aus dem GenePaint-Atlas, <https://gp3.mpg.de/viewer/setInfo/MH3128> bzw. <https://gp3.mpg.de/viewer/setInfo/MH2931> [46]. (B) Die Koexpression von *Prdm12* und *Cbfa2t2* bleibt in den sensiblen Ganglien (DRG: Spinalganglien, TG: Ganglion trigeminale) erwachsener Mäuse erhalten. Die Expressionswerte wurden für jede Probe als Zahl der Fragmente pro Kilobase des Transkripts/Million kartierter Fragmente (FPKM) dargestellt. Daten aus Manteniotis *et al.*, 2013 [47]. (C) Relative Expression von *Prdm12* und *Cbfa2t2* in den verschiedenen Populationen sensibler Neurone in Spinalganglien erwachsener Mäuse. *Cbfa2t2* wird in allen Zellpopulationen variabel exprimiert, während *Prdm12* auf die nozizeptive Linie beschränkt ist (nicht-peptiderge NP1-NP3, peptiderge PEP1-PEP2, C-Faser-Mechanorezeptoren mit niedriger Schwelle C-LTMR) und in A-LTMRs (Neurofilament NF1-NF5) praktisch nicht vorkommt. Daten aus Usoskin *et al.*, 2015 [48].

In Zellen, die exogenes PRDM12 aber nicht CBFA2T2 exprimierten, zeigte PRDM12 in der Immunfluoreszenzmikroskopie typischerweise ein diffuses, feingranuläres Verteilungsmuster in den Zellkernen [18]. Im Gegensatz dazu war überexprimierte CBFA2T2 in den meisten Zellen in diskreten, punktförmigen Strukturen im Zellkern lokalisiert (**Abb. 18**). Wenn PRDM12 zusammen mit CBFA2T2 überexprimiert wurde, blieb die Lokalisation von CBFA2T2 nahezu unverändert. PRDM12 hingegen fand sich vermehrt in nukleären Foci, wo es mit CBFA2T2 kolokalisierte (**Abb. 18**).

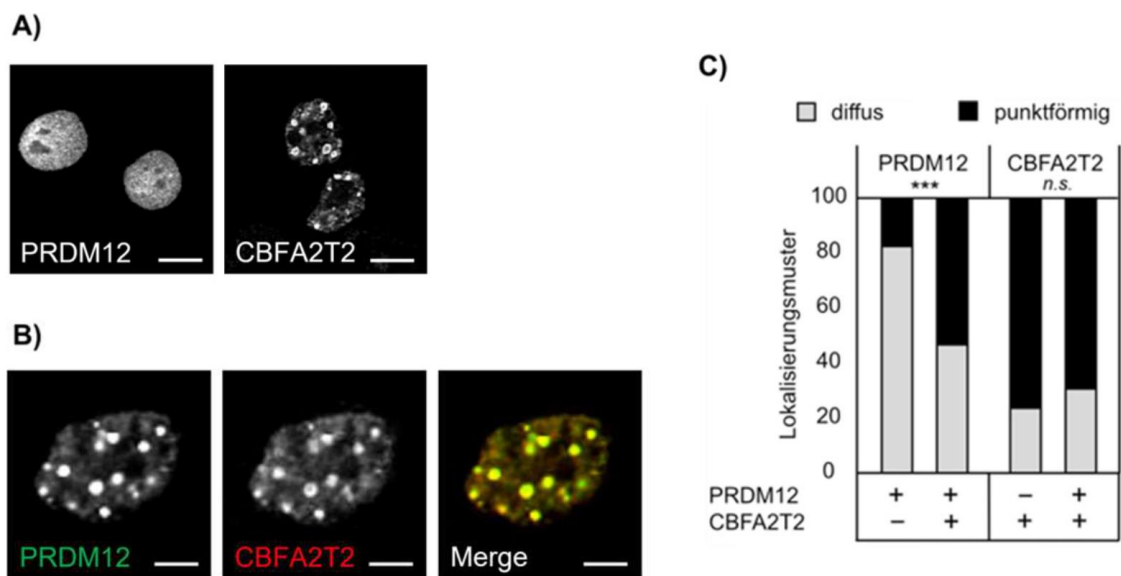


Abb. 18: PRDM12 und CBFA2T2 kolokalisieren in punktförmigen Strukturen im Zellkern

HEK293-Zellen wurden mit Myc-PRDM12- oder HA-CBFA2T2-Konstrukten oder beiden Konstrukten transfiziert. Die überexprimierten Proteine wurden durch Immunfluoreszenzmikroskopie mit Antikörpern, die den Myc- bzw. HA-Tag erkennen, sichtbar gemacht. **(A)** Lokalisierung von überexprimiertem PRDM12 und CBFA2T2 in einzeln transfizierten Zellen. PRDM12 zeigte typischerweise eine diffuse, feinkörnige Verteilung im Zellkern, während CBFA2T2 in der Regel in diskreten, punktförmigen Strukturen im Zellkern konzentriert war. Maßstabsbalken, 10 μm . **(B)** In Zellen, die PRDM12 zusammen mit CBFA2T2 überexprimierten, kolokalisierten beide Proteine in mehr als der Hälfte der Zellen in diskreten nukleären Strukturen. Maßstabsbalken, 5 μm . **(C)** Die Ergebnisse wurden kategorisiert und quantifiziert ($n \geq 100$ Zellen pro Bedingung). CBFA2T2 scheint PRDM12 in bestimmte Kernkompartimente zu rekrutieren. Statistische Unterschiede wurden mit einem zweiseitigen Mann-Whitney U-Test ermittelt. Der p-Wert ist als *** ($p < 0,001$) angegeben.

Um zu untersuchen, ob die Interaktion von PRDM12 mit CBFA2T2 funktionelle Konsequenzen hat, wurde die kombinierte Wirkung von PRDM12 und CBFA2T2 auf die Aktivität des GAL4-UAS-Reportersystems im Firefly/Renilla Dual Luciferase Assay getestet. In Übereinstimmung mit früheren Beobachtungen [49] unterdrückte CBFA2T2 die Transkription des heterologen Promotors, wenn es durch Fusion mit der GAL4-DNA-Bindungsdomäne an Chromatin rekrutiert wurde (**Abb. 19**). Vergleichbar mit Beobachtungen zur Interaktion von CBFA2T2 mit PRDM14 [50] verstärkte die Co-Transfektion von GAL4-DBD-CBFA2T2 und Myc-PRDM12 die Repressoraktivität (**Abb. 19**).

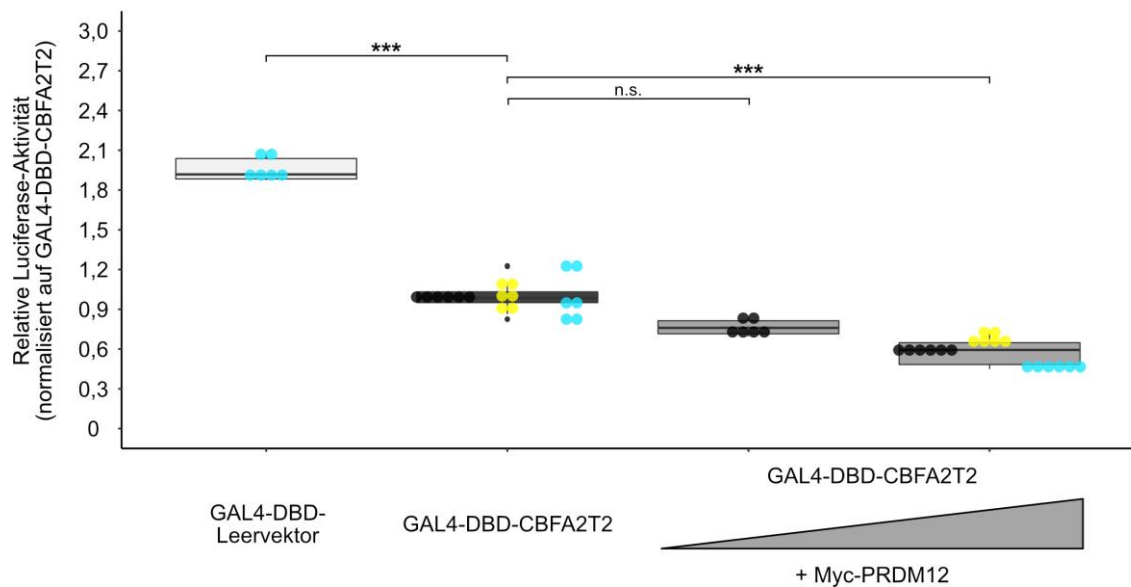


Abb. 19: Einfluss der Interaktion von CBFA2T2 und PRDM12 auf die Repressoraktivität

Der Einfluss der Interaktion von CBFA2T2 mit PRDM12 auf die Repressoraktivität wurde mit Hilfe eines Reporterassays getestet. Die Ergebnisse beruhen auf mindestens drei unabhängigen Experimenten mit jeweils zwei technischen Replikaten. Die Boxplots stellen den Median, das erste und dritte Quartil dar, die Whisker reichen bis zum 1,5-fachen Interquartilabstand. Gleichfarbige Punkte entsprechen Werten aus einem Messdurchgang. Die statistische Analyse erfolgte mittels Wilcoxon Signed-Rank-Test. Die p-Werte sind als n.s. (nicht signifikant) und *** ($p < 0,001$) angegeben. Myc-PRDM12 zeigte einen synergistischen Effekt mit CBFA2T2 mit signifikantem Anstieg der Repressoraktivität.

5. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass der Verlust des Transkriptionsregulators PRDM12 in einem Mausmodell zu einem schwerwiegenden Defekt in der Entwicklung sensibler Neurone führt. Darüber hinaus legten die Ergebnisse von Untersuchungen zur molekularen Funktion von PRDM12 nahe, dass PRDM12 als Transkriptionsrepressor agiert und mit dem bekannten Co-Repressor CBFA2T2 interagiert.

Seit 2015 ist bekannt, dass biallelische Varianten im humanen PRDM12-Gen eine sehr seltene autosomal-rezessiv erbliche Erkrankung verursachen, bei der es zu einem angeborenen Fehlen des Schmerzempfindens kommt (*congenital insensitivity to pain*, CIP) [18]. Diese Publikation konnte aber die der klinischen Symptomatik zu Grunde liegende Pathologie nicht abschließend klären: Der bei betroffenen Patienten beobachtete Ausfall bzw. das vollständige Fehlen sensibler Nervenfasern und nozizeptiver Nervenendigungen waren sowohl mit einem Entwicklungsdefekt als auch einer früh beginnenden, rasch voranschreitenden Degeneration sensibler Neurone vereinbar [18]. Des Weiteren konnte nicht abschließend geklärt werden, welche sensible Neuronenpopulation vorrangig oder selektiv betroffen war bzw. ob alle Nozizeptoren oder nur eine Teilpopulation ausgefallen war. Diese Fragen sollten das hier vorgestellte Mausmodell und die darauf aufbauenden weitergehenden Untersuchungen der Arbeitsgruppe von Professor Roman Chrast (Karolinska Institutet, Stockholm, Schweden) adressieren [42]. Es zeigte sich, dass es in Mäusen ohne eine intakte *Prdm12*-Genkopie bereits in der Embryonalentwicklung zu einer deutlichen Reduktion der Größe und Anzahl von Neuronen in den Spinalganglien kommt, so dass von einer primären Störung der sensiblen Neurogenese auszugehen war.

Während der Entwicklung sensibler Ganglien in der Maus war *Prdm12* am Tag E18.5 in allen Zellen nachweisbar, die den Nozizeptor-Marker *Trka* exprimieren [42]. Entsprechende Untersuchungen in *Prdm12*-Knockout-Mausembryonen zeigten, dass die ursprünglich beobachtete erhebliche Verringerung der Neuronenzahl und Größe der Spinalganglien auf einen Ausfall der TRKA-positiven nozizeptiven Linie zurückzuführen war. Der Ausfall der Nozizeptorpopulation war

vollständig, betraf alle Subtypen gleichermaßen und war unabhängig vom Zeitpunkt der Differenzierung aus Vorläuferzellen in der ersten oder zweiten Welle der sensiblen Neurogenese in den Spinalganglien. Die Populationen von Neuronen für andere sensible Modalitäten wie Berührung, Vibration und Propriozeption (Marker: TRKB und TRKC) waren hingegen nicht beeinträchtigt. Auch autonome Ganglien waren regelhaft angelegt [42].

In der Frühphase der Entwicklung der Spinalganglien fiel in PRDM12-defizienten Mausembryonen eine deutliche Verringerung der Zahl SOX10-positiver Vorläuferzellen auf. Dieser Befund ist sehr wahrscheinlich auf eine unzureichende Proliferation der Vorläuferzellen zurückzuführen [42], so dass eine physiologische Funktion von PRDM12 in der Erhaltung eines ausreichend großen Pools von proliferierenden Vorläuferzellen bestehen könnte. Überexpressionsexperimente in Hühnerembryonen zeigten, dass in der weiteren Entwicklung sensibler Neurone PRDM12 zur Festlegung eines neuronalen Schicksals und Inhibition eines A-LTMR-Schicksals führt [42] und damit die Generierung einer ausreichend großen Nozizeptorpopulation sicherstellt. Dabei ist PRDM12 erforderlich, um die Expression des Nozizeptor-Markers TRKA zu induzieren, jedoch allein nicht ausreichend [42], so dass davon auszugehen ist, dass weitere, bisher noch unbekannte Faktoren eine Rolle spielen. Studien von anderen Arbeitsgruppen, die entweder das hier beschriebene Mausmodell verwendeten [51] oder auf einem anderen Mausmodell basierten [52], führten im Wesentlichen zu vergleichbaren Resultaten. Diese unabhängigen Daten unterstützen somit ebenfalls die Schlussfolgerung, dass PRDM12 einer der Faktoren ist, die für die Initiierung der nozizeptiven Linie erforderlich sind.

PRDM12-defiziente Mausmodelle haben ein grundlegendes Verständnis der PRDM12-assoziierten Pathologie ermöglicht. Die genauen molekularen Mechanismen, die zum Ausbleiben der Entwicklung von Nozizeptoren infolge unzureichender Proliferation von Vorläuferzellen und Festlegung des Zellschicksals führen, konnten bislang noch nicht vollständig aufgeklärt werden. Einige Mitglieder der PRDM-Proteinfamilie, zu der auch PRDM12 gehört, sind Transkriptionsrepressoren [52]. Da Zielgene von PRDM12 bisher nicht bekannt sind und eine direkte, spezifische Bindung von PRDM12 an Chromatin bisher nicht belegt werden konnte, wurde eine mögliche Repressoraktivität von PRDM12 indirekt unter

Verwendung eines heterologen Promotors untersucht. Dieses Experiment zeigte, dass PRDM12 tatsächlich als Transkriptionsrepressor wirkt. Die Stärke des Effekts korrelierte direkt mit der Menge an PRDM12, und die Wirkung wird durch krankheitsassoziierte *PRDM12*-Varianten teilweise aufgehoben, was nahelegt, dass die Repressoraktivität von PRDM12 biologisch und pathophysiologisch relevant sein könnte. Allerdings ist der Mechanismus, durch den PRDM12 als Transkriptionsrepressor wirkt, bislang noch nicht eindeutig geklärt. Die PR-Domänen einiger PRDMs haben Histonmethyltransferase-Aktivität und können direkt repressive Histonmodifikationen vornehmen [52]. PRDM12 scheint keine relevante katalytische Aktivität zu haben [28], könnte aber andere Faktoren in einen Repressorkomplex rekrutieren. Diese Überlegung erscheint auch deshalb plausibel, weil PR- und ZF-Domänen, die in PRDM12 vorkommen, als Proteininteraktionsmotive fungieren können [53, 54].

Mehrere Mitglieder der PRDM-Proteinfamilie rekrutieren Co-Transkriptionsfaktoren, um chromatinregulierende Multiproteinkomplexe zu bilden [55, 56]. So konnte im Fall von PRDM12 gezeigt werden, dass es mit der Histonmethyltransferase G9a/EHMT2 interagiert [28], die repressive Histon-Modifikationen vermittelt [57]. Die Ergebnisse von Versuchen mit PRDM12-Deletionsmutanten ließen den Schluss zu, dass diese Interaktion das Vorhandensein des zweiten Zinkfingers von PRDM12 erfordert [28]. In der hier vorgelegten Arbeit konnte außerdem gezeigt werden, dass die krankheitsassoziierte PRDM12-Variante p.F271I, die den zweiten Zinkfinger betrifft, die Bindung an G9a beeinträchtigt. Ein ähnlicher Effekt konnte bereits für eine andere krankheitsassoziierte Variante, p.H289L, die ebenfalls den zweiten Zinkfinger betrifft, nachgewiesen werden [18]. Dadurch könnte es zu einer fehlerhaften Regulierung von Zielgenen infolge unzureichender G9a-vermittelter Methylierung von Histonen an Zielpromotoren kommen. Andere CIP-assoziierte PRDM12-Mutanten stören die Interaktion zwischen PRDM12 und G9a jedoch nicht [18]. Möglicherweise kommt es aber zu anderen Veränderungen in der Zusammensetzung oder Struktur des Repressorkomplexes, so dass G9a möglicherweise nicht aktiviert werden kann [58, 59] oder keinen Zugang zum Chromatin findet. Für eine generelle Störung der G9a-Funktion in Zusammenhang mit *PRDM12*-Mutationen könnten Daten aus PRDM12-Überex-

pressionsexperimenten in Frosch-Embryonen sprechen: Während die Überexpression von Wildtyp-PRDM12 zu einer deutlich verstärkten H3K9me2-Methylierung führte, zeigte keine der untersuchten PRDM12-Varianten, unabhängig von ihrer Position im Protein und ihrer Fähigkeit, direkt mit G9a zu interagieren, einen vergleichbaren Effekt [18].

Unter der Annahme, dass sich aus der Kenntnis von PRDM12-Interaktionspartnern Rückschlüsse auf die molekularen Mechanismen ergeben, an denen PRDM12 beteiligt ist, wurde nach zusätzlichen PRDM12-Interaktionspartnern gesucht. Dazu wurde durch einen externen Kooperationspartner (PD Dr. rer. Nat. Andreas Roos, ISAS, Dortmund, Deutschland) ein Interaktionsscreen mittels Tandemaffinitätsaufreinigung durchgeführt. Einer der identifizierten potentiellen Interaktionspartner von PRDM12 war der Transkriptionsfaktor CBFA2T2 [45]. CBFA2T2 war ein interessanter Kandidat, weil es ähnlich wie PRDM12 ein Co-Repressor ist [60] und an der Steuerung der Entwicklung und Differenzierung von Zellen und Geweben beteiligt ist [49, 61]. CBFA2T2 spielt auch eine Rolle in der Neurogenese [62, 63] und wirkt dabei mit dem proneuralen Transkriptionsfaktor Neurogenin 2 (Ngn2) zusammen [64, 65], der unter anderem die Differenzierung von Vorläuferzellen zu sensiblen Neuronen reguliert [19, 66]. Darüber hinaus bildet CBFA2T2 mit einem anderen Mitglied der PRDM-Proteinfamilie, PRDM14, einen Komplex, der die Expression von Zielgenen unterdrücken kann [50, 67].

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführte Co-Immunpräzipitationsstudien mit überexprimiertem PRDM12 und CBFA2T2 bestätigten die Ergebnisse des Interaktionsscreens und zeigten zusätzlich, dass die Interaktion sehr wahrscheinlich über die PR-Domäne von PRDM12 vermittelt wird. Damit konnte dieser Proteinregion, die bislang als katalytisch inaktive Histonmethyltransferase-Domäne eingeordnet worden war [28], erstmalig eine Funktion zugeordnet werden. Passend zur angenommenen Interaktion der Proteine überlappen die zeitlichen und räumlichen Expressionsmuster von *Prdm12* und *Cbfa2t2* in der Maus, wobei *Cbfa2t2* aber nicht die extreme Spezifität für Nozizeptoren von *Prdm12* aufweist. Beide Proteine kolokalisierten in distinkten, punktförmigen Strukturen im Zellkern, deren Identität noch durch Kolokalisationsstudien mit nukleären Markern und biochemische Fraktionierung von Zellkernen weiter untersucht werden

muss. Dabei scheint CBFA2T2 in der Lage zu sein, PRDM12 in diese Kompartimente zu rekrutieren. Darüber hinaus zeigten PRDM12 und CBFA2T2 einen synergistischen Effekt im Sinne einer verstärkten Repression eines heterologen GAL4-abhängigen Promotorsystems.

Wenngleich alle diese Beobachtungen auf eine biologische Relevanz der Interaktion zwischen PRDM12 und CBFA2T2 hindeuten, sind noch weitere Untersuchungen notwendig, um diese Schlussfolgerung zu untermauern. Insbesondere steht die Bestätigung der Interaktion von endogen exprimierten PRDM12 und CBFA2T2 in Zielgeweben bzw. -zellen noch aus. Auch wurde bislang noch nicht geklärt, ob PRDM12 direkt oder indirekt mit CBFA2T2 interagiert und welche Proteinregion in CBFA2T2 für die Vermittlung der Interaktion verantwortlich ist. Ausgehend von der ähnlich gelagerten Situation im Fall von CBFA2T2 und PRDM14 [50, 68] erscheint es plausibel, dass CBFA2T2 und PRDM12 direkt aneinander binden, wobei die NHR1-Domäne von CBFA2T2 vermutlich mit der PR-Domäne von PRDM12 interagiert. Schließlich stehen Experimente aus, um eine mögliche biologische Relevanz der PRDM12-CBFA2T2-Interaktion zu testen. Dazu könnten PRDM12-Überexpressionsexperimente (mittels *in ovo*-Elektroporation von Hühnerembryonen [42]) eingesetzt werden, um zu prüfen, ob PRDM12 in der Lage ist, eine neuronale Identität in Zellen zu induzieren, die kein funktionales CBFA2T2 aufweisen (inaktiviert durch die Verwendung einer co-transfizierten dominant-negativen CBFA2T2-Mutante [62]). Ein weiterer Ansatz wäre, die sensible Neurogenese und die Entwicklung der Spinalganglien in etablierten CBFA2T2-defizienten Mausmodellen [49, 50] zu untersuchen. Um Hinweise auf eine mögliche pathophysiologische Bedeutung der Interaktion zu erhalten, könnte schließlich auch der Einfluss von krankheitsassoziierten PRDM12-Mutanten auf die Interaktion mit CBFA2T2 untersucht werden. Bislang ist kein Signalweg bekannt, den PRDM12 und CBFA2T2 gemeinsam als Transkriptionsrepressoren regulieren. Denkbar wäre etwa eine Beeinflussung des Notch/Hes-Signalwegs, der unter anderem in der Differenzierung von Vorläuferzellen aus der Neuralleiste und in der Neurogenese bedeutsam ist [69, 70] und durch CBFA2T2 reguliert werden kann [61].

Kurz zusammengefasst legen die Ergebnisse dieser Arbeit und darauf aufbauender, weiterführender Untersuchungen nahe, dass PRDM12 eine spezifische und

essenzielle Funktion bei der Initiierung der gesamten nozizeptiven Linie hat. Es scheint, dass PRDM12 mechanistisch als Transkriptionsrepressor agiert, möglicherweise in einem Komplex mit dem hier identifizierten Bindungspartner CBFA2T2. Da PRDM12 eine entscheidende Rolle in der Entwicklung von Nozizeptoren spielt, ist anzunehmen, dass eine weitere Aufklärung der beteiligten molekularen Mechanismen zu einem besseren Verständnis der Regulation der sensiblen Neurogenese führen wird. Diese Erkenntnisse könnten langfristig auch dazu beitragen, ein besseres Verständnis der Mechanismen der Schmerzentscheidung zu erlangen und neue therapeutische Ansätze für Schmerzerkrankungen zu entwickeln, die nach wie vor eine bedeutende medizinische Herausforderung darstellen.

Literaturverzeichnis

1. Costigan, M., J. Scholz, and C.J. Woolf, *Neuropathic pain: a maladaptive response of the nervous system to damage*. *Annu Rev Neurosci*, 2009. **32**: p. 1-32.
2. Bonica, J.J., *The Management of Pain: The Future*, in *Anesthesiology and Pain Management*, T.H. Stanley, M.A. Ashburn, and P.G. Fine, Editors. 1991, Springer Netherlands: Dordrecht. p. 73-92.
3. Breivik, H., et al., *Survey of chronic pain in Europe: prevalence, impact on daily life, and treatment*. *Eur J Pain*, 2006. **10**(4): p. 287-333.
4. Aumüller, G., et al., *Duale Reihe Anatomie, 2. Auflage*. 2010: Thieme.
5. Schmidt, R.F., F. Lang, and M. Heckmann, *Physiologie des Menschen: mit Pathophysiologie*. 2011: Springer-Verlag.
6. Knecht, A.K. and M. Bronner-Fraser, *Induction of the neural crest: a multigene process*. *Nat Rev Genet*, 2002. **3**(6): p. 453-61.
7. Bachy, I., et al., *The transcription factor Cux2 marks development of an A-delta sublineage of TrkA sensory neurons*. *Dev Biol*, 2011. **360**(1): p. 77-86.
8. Lallemand, F. and P. Ernfors, *Molecular interactions underlying the specification of sensory neurons*. *Trends Neurosci*, 2012. **35**(6): p. 373-81.
9. Barrett, C.F., et al., *Familial hemiplegic migraine*. *Adv Genet*, 2008. **63**: p. 57-83.
10. Mann, N., T. King, and R. Murphy, *Review of primary and secondary erythromelalgia*. *Clin Exp Dermatol*, 2019. **44**(5): p. 477-482.
11. Fertleman, C.R., et al., *Paroxysmal extreme pain disorder (previously familial rectal pain syndrome)*. *Neurology*, 2007. **69**(6): p. 586-95.
12. Shen, Y., Y. Zheng, and D. Hong, *Familial Episodic Pain Syndromes*. *J Pain Res*, 2022. **15**: p. 2505-2515.
13. Lischka, A., et al., *Genetic pain loss disorders*. *Nat Rev Dis Primers*, 2022. **8**(1): p. 41.
14. Rotthier, A., et al., *Mechanisms of disease in hereditary sensory and autonomic neuropathies*. *Nat Rev Neurol*, 2012. **8**(2): p. 73-85.
15. Indo, Y., et al., *Mutations in the TRKA/NGF receptor gene in patients with congenital insensitivity to pain with anhidrosis*. *Nat Genet*, 1996. **13**(4): p. 485-8.
16. Verhoeven, K., et al., *Mutations in the small GTP-ase late endosomal protein RAB7 cause Charcot-Marie-Tooth type 2B neuropathy*. *Am J Hum Genet*, 2003. **72**(3): p. 722-7.
17. Cox, J.J., et al., *An SCN9A channelopathy causes congenital inability to experience pain*. *Nature*, 2006. **444**(7121): p. 894-8.
18. Chen, Y.C., et al., *Transcriptional regulator PRDM12 is essential for human pain perception*. *Nat Genet*, 2015. **47**(7): p. 803-8.
19. Ma, Q., et al., *Neurogenin1 and neurogenin2 control two distinct waves of neurogenesis in developing dorsal root ganglia*. *Genes Dev*, 1999. **13**(13): p. 1717-28.
20. Kinameri, E., et al., *Prdm proto-oncogene transcription factor family expression and interaction with the Notch-Hes pathway in mouse neurogenesis*. *PLoS One*, 2008. **3**(12): p. e3859.
21. Thomas, S., et al., *Human neural crest cells display molecular and phenotypic hallmarks of stem cells*. *Hum Mol Genet*, 2008. **17**(21): p. 3411-25.
22. Hohenauer, T. and A.W. Moore, *The Prdm family: expanding roles in stem cells and development*. *Development*, 2012. **139**(13): p. 2267-82.
23. Rienzo, M., et al., *PRDM12 in Health and Diseases*. *Int J Mol Sci*, 2021. **22**(21).
24. Zannino, D.A. and C.G. Sagerström, *An emerging role for prdm family genes in dorsoventral patterning of the vertebrate nervous system*. *Neural Dev*, 2015. **10**: p. 24.

25. Zannino, D.A., G.B. Downes, and C.G. Sagerström, *prdm12b specifies the p1 progenitor domain and reveals a role for V1 interneurons in swim movements*. *Dev Biol*, 2014. **390**(2): p. 247-60.
26. Matsukawa, S., et al., *The requirement of histone modification by PRDM12 and Kdm4a for the development of pre-placodal ectoderm and neural crest in Xenopus*. *Dev Biol*, 2015. **399**(1): p. 164-176.
27. Di Tullio, F., et al., *The duality of PRDM proteins: epigenetic and structural perspectives*. *Febs j*, 2022. **289**(5): p. 1256-1275.
28. Yang, C.M. and Y. Shinkai, *Prdm12 is induced by retinoic acid and exhibits anti-proliferative properties through the cell cycle modulation of P19 embryonic carcinoma cells*. *Cell Struct Funct*, 2013. **38**(2): p. 197-206.
29. Harlow, E., *Antibodies*. A laboratory manual, 1988.
30. Sambrook, J., E.F. Fritsch, and T. Maniatis, *Molecular cloning : a laboratory manual*. 2nd ed. 1989, Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory.
31. Ausubel, F., et al., *Current Protocols in Molecular Biology*. New York: John Willey & Sons. 1994, Inc.
32. Bonifacino, J., et al., *Current protocols in cell biology*. 2001: John Wiley & Sons, Inc.
33. Mullis, K.B. and F.A. Faloon, [21] *Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction*, in *Methods in Enzymology*. 1987, Academic Press. p. 335-350.
34. Rozen, S. and H. Skaletsky, *Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers*. *Methods Mol Biol*, 2000. **132**: p. 365-86.
35. Sanger, F., S. Nicklen, and A.R. Coulson, *DNA sequencing with chain-terminating inhibitors*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1977. **74**(12): p. 5463-7.
36. Innis, M.A., et al., *DNA sequencing with Thermus aquaticus DNA polymerase and direct sequencing of polymerase chain reaction-amplified DNA*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1988. **85**(24): p. 9436-40.
37. Prober, J.M., et al., *A system for rapid DNA sequencing with fluorescent chain-terminating dideoxynucleotides*. *Science*, 1987. **238**(4825): p. 336-41.
38. Higuchi, R., B. Krummel, and R.K. Saiki, *A general method of in vitro preparation and specific mutagenesis of DNA fragments: study of protein and DNA interactions*. *Nucleic Acids Res*, 1988. **16**(15): p. 7351-67.
39. Sakai, K. and J. Miyazaki, *A transgenic mouse line that retains Cre recombinase activity in mature oocytes irrespective of the cre transgene transmission*. *Biochem Biophys Res Commun*, 1997. **237**(2): p. 318-24.
40. Krämer, M.S., R. Feil, and H. Schmidt, *Analysis of Gene Expression Using lacZ Reporter Mouse Lines*. *Methods Mol Biol*, 2021. **2224**: p. 29-45.
41. Kühn, R., et al., *Inducible gene targeting in mice*. *Science*, 1995. **269**(5229): p. 1427-9.
42. Bartesaghi, L., et al., *PRDM12 Is Required for Initiation of the Nociceptive Neuron Lineage during Neurogenesis*. *Cell Rep*, 2019. **26**(13): p. 3484-3492.e4.
43. Waterhouse, A., et al., *SWISS-MODEL: homology modelling of protein structures and complexes*. *Nucleic Acids Research*, 2018. **46**(W1): p. W296-W303.
44. Kleine, H., et al., *Substrate-assisted catalysis by PARP10 limits its activity to mono-ADP-ribosylation*. *Mol Cell*, 2008. **32**(1): p. 57-69.
45. Kitabayashi, I., et al., *The AML1-MTG8 leukemic fusion protein forms a complex with a novel member of the MTG8(ETO/CDR) family, MTGR1*. *Mol Cell Biol*, 1998. **18**(2): p. 846-58.
46. Visel, A., C. Thaller, and G. Eichele, *GenePaint.org: an atlas of gene expression patterns in the mouse embryo*. *Nucleic Acids Res*, 2004. **32**(Database issue): p. D552-6.

47. Mantioti, S., et al., *Comprehensive RNA-Seq expression analysis of sensory ganglia with a focus on ion channels and GPCRs in Trigeminal ganglia*. PLoS One, 2013. **8**(11): p. e79523.
48. Usoskin, D., et al., *Unbiased classification of sensory neuron types by large-scale single-cell RNA sequencing*. Nat Neurosci, 2015. **18**(1): p. 145-53.
49. Amann, J.M., et al., *Mtgr1 is a transcriptional corepressor that is required for maintenance of the secretory cell lineage in the small intestine*. Mol Cell Biol, 2005. **25**(21): p. 9576-85.
50. Tu, S., et al., *Co-repressor CBFA2T2 regulates pluripotency and germline development*. Nature, 2016. **534**(7607): p. 387-90.
51. Desiderio, S., et al., *Prdm12 Directs Nociceptive Sensory Neuron Development by Regulating the Expression of the NGF Receptor TrkA*. Cell Rep, 2019. **26**(13): p. 3522-3536.e5.
52. Landy, M.A., et al., *Loss of Prdm12 during development, but not in mature nociceptors, causes defects in pain sensation*. Cell Rep, 2021. **34**(13): p. 108913.
53. Huang, S., G. Shao, and L. Liu, *The PR domain of the Rb-binding zinc finger protein RIZ1 is a protein binding interface and is related to the SET domain functioning in chromatin-mediated gene expression*. J Biol Chem, 1998. **273**(26): p. 15933-9.
54. Leon, O. and M. Roth, *Zinc fingers: DNA binding and protein-protein interactions*. Biol Res, 2000. **33**(1): p. 21-30.
55. Seale, P., et al., *PRDM16 controls a brown fat/skeletal muscle switch*. Nature, 2008. **454**(7207): p. 961-7.
56. Kajimura, S., et al., *Initiation of myoblast to brown fat switch by a PRDM16-C/EBP-beta transcriptional complex*. Nature, 2009. **460**(7259): p. 1154-8.
57. Shankar, S.R., et al., *G9a, a multipotent regulator of gene expression*. Epigenetics, 2013. **8**(1): p. 16-22.
58. Tachibana, M., et al., *Histone methyltransferases G9a and GLP form heteromeric complexes and are both crucial for methylation of euchromatin at H3-K9*. Genes Dev, 2005. **19**(7): p. 815-26.
59. Tachibana, M., et al., *G9a/GLP complexes independently mediate H3K9 and DNA methylation to silence transcription*. Embo j, 2008. **27**(20): p. 2681-90.
60. Lindberg, S.R., et al., *Interactions between the leukaemia-associated ETO homologues of nuclear repressor proteins*. Eur J Haematol, 2003. **71**(6): p. 439-47.
61. Parang, B., et al., *The transcriptional corepressor MTGR1 regulates intestinal secretory lineage allocation*. Faseb j, 2015. **29**(3): p. 786-95.
62. Koyano-Nakagawa, N. and C. Kintner, *The expression and function of MTG/ETO family proteins during neurogenesis*. Dev Biol, 2005. **278**(1): p. 22-34.
63. Alishahi, A., N. Koyano-Nakagawa, and Y. Nakagawa, *Regional expression of MTG genes in the developing mouse central nervous system*. Dev Dyn, 2009. **238**(8): p. 2095-102.
64. Aaker, J.D., et al., *Interaction of MTG family proteins with NEUROG2 and ASCL1 in the developing nervous system*. Neurosci Lett, 2010. **474**(1): p. 46-51.
65. Aaker, J.D., et al., *Feedback regulation of NEUROG2 activity by MTGR1 is required for progression of neurogenesis*. Mol Cell Neurosci, 2009. **42**(4): p. 267-77.
66. Hulme, A.J., et al., *Molecular and Functional Characterization of Neurogenin-2 Induced Human Sensory Neurons*. Front Cell Neurosci, 2020. **14**: p. 600895.
67. Nady, N., et al., *ETO family protein Mtgr1 mediates Prdm14 functions in stem cell maintenance and primordial germ cell formation*. Elife, 2015. **4**: p. e10150.
68. Kawaguchi, M., et al., *Co-option of the PRDM14-CBFA2T complex from motor neurons to pluripotent cells during vertebrate evolution*. Development, 2019. **146**(2).

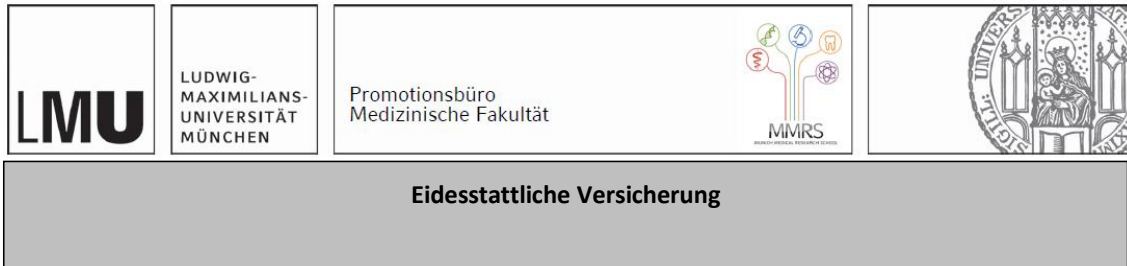
-
69. Mead, T.J. and K.E. Yutzey, *Notch pathway regulation of neural crest cell development in vivo*. Dev Dyn, 2012. **241**(2): p. 376-89.
 70. Hu, Z.L., et al., *The role of the transcription factor Rbpj in the development of dorsal root ganglia*. Neural Dev, 2011. **6**: p. 14.

Abbildungsverzeichnis

| | |
|--|----|
| Abb. 1: PRDM12-Varianten bei CIP-Patienten..... | 12 |
| Abb. 2: Auswirkungen einer PRDM12-Defizienz beim Menschen..... | 13 |
| Abb. 3: Hautbiopsien eines Patienten mit PRDM12-assoziiertes CIP und einer nicht-betroffenen Kontrollperson..... | 14 |
| Abb. 4: Übersicht über die PRDM-Proteinfamilie | 15 |
| Abb. 5: Schematische Darstellung der Generierung verschiedener <i>Prdm12</i> -Allele | 30 |
| Abb. 6: PCR-Strategie zum Nachweis des <i>Prdm12^{tm2a}</i> - und Wildtyp-Allels..... | 32 |
| Abb. 7: PCR-Strategie zum Nachweis des <i>Prdm12^{tm2b}</i> - und Wildtyp-Allels..... | 33 |
| Abb. 8: PCR-Strategie zum Nachweis des <i>Prdm12^{tm2c}</i> - und Wildtyp-Allels..... | 35 |
| Abb. 9: PCR-Strategie zum Nachweis des <i>Prdm12^{tm2d}</i> - und Wildtyp-Allels..... | 36 |
| Abb. 10: Makroskopischer Aspekt von Maus-Embryonen | 38 |
| Abb. 11: Lumbale Spinalganglien in <i>Prdm12</i> -Knockout-Mausembryonen..... | 39 |
| Abb. 12: Serienschnitte lumbaler Spinalganglien in <i>Prdm12</i> -Knockout- Mausembryonen..... | 40 |
| Abb. 13: Repressoraktivität eines GAL4-DBD-PRDM12-Fusionsproteins | 41 |
| Abb. 14: Repressoraktivität krankheitsassoziiertes PRDM12-Varianten | 42 |
| Abb. 15: Auswirkung der PRDM12 p.F271I-Variante auf die Interaktion mit G9a | 43 |
| Abb. 16: Nachweis der Interaktion von PRDM12 und CBFA2T2..... | 45 |
| Abb. 17: Gemeinsame Expression von <i>Prdm12</i> und <i>Cbfa2t2</i> in sensiblen Ganglien der Maus . | 46 |
| Abb. 18: PRDM12 und CBFA2T2 kolokalisieren in punktförmigen Strukturen im Zellkern | 47 |
| Abb. 19: Einfluss der Interaktion von CBFA2T2 und PRDM12 auf die Repressoraktivität | 48 |

Meinen Eltern und Kollegen.

Affidavit



Harrer, Philip

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel:

Untersuchungen zur Pathophysiologie der PRDM12-assoziierten angeborenen Schmerzunempfindlichkeit

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

Philip Harrer

München, 01.12.2023

Publikationsliste

Harrer P, Škorvánek M, Kittke V, Dzinovic I, Borngräber F, Thomsen M, Mandel V, Svorenova T, Ostrozovicova M, Kulcsarova K, Berutti R, Busch H, Ott F, Kopajtich R, Prokisch H, Kumar KR, Mencacci NE, Kurian MA, Di Fonzo A, Boesch S, Kühn AA, Blümlein U, Lohmann K, Haslinger B, Weise D, Jech R, Winkelmann J, Zech M. ***Dystonia Linked to EIF4A2 Haploinsufficiency: A Disorder of Protein Translation Dysfunction***. *Mov Disord*. 2023 Jul 23. doi: 10.1002/mds.29562. Epub ahead of print. PMID: 37485550.

Harrer P, Mirza-Schreiber N, Mandel V, Roeber S, Stefani A, Naher S, Wagner M, Gieger C, Waldenberger M, Peters A, Högl B, Herms J, Schormair B, Zhao C, Winkelmann J, Oexle K. ***Epigenetic Association Analyses and Risk Prediction of RLS***. *Mov Disord*. 2023 May 22. doi: 10.1002/mds.29440. Epub ahead of print. PMID: 37212434.

Harrer P, Schalk A, Shimura M, Baer S, Calmels N, Spitz MA, Warde MA, Schaefer E, Kittke VMS, Dincer Y, Wagner M, Dzinovic I, Berutti R, Sato T, Shirakawa T, Okazaki Y, Murayama K, Oexle K, Prokisch H, Mall V, Melčák I, Winkelmann J, Zech M. ***Recessive NUP54 Variants Underlie Early-Onset Dystonia with Striatal Lesions***. *Ann Neurol*. 2023 Feb;93(2):330-335. doi: 10.1002/ana.26544. Epub 2022 Nov 18. PMID: 36333996.

Harrer P, Leppmeier V, Berger A, Demund S, Winkelmann J, Berweck S, Zech M. ***A de novo BCL11B variant case manifesting with dystonic movement disorder regarding the article "BCL11B-related disorder in two canadian children: Expanding the clinical phenotype (Prasad et al., 2020)." Eur J Med Genet***. 2022 Nov;65(11):104635. doi: 10.1016/j.ejmg.2022.104635. Epub 2022 Oct 3. PMID: 36202297.

Bartesaghi L, Wang Y, Fontanet P, Wanderoy S, Berger F, Wu H, Akkuratova N, Boučanová F, Médard JJ, Petitpré C, Landy MA, Zhang MD, **Harrer P**, Stendel C, Stucka R, Dusl M, Kastrić ME, Croci L, Lai HC, Consalez GG, Pattyn A, Ernfors P, Senderek J, Adameyko I, Lallemand F, Hadjab S, Chrast R. ***PRDM12 Is Required for Initiation of the Nociceptive Neuron Lineage during Neurogenesis***. *Cell Rep*. 2019 Mar 26;26(13):3484-3492.e4. doi: 10.1016/j.celrep.2019.02.098. PMID: 30917305; PMCID: PMC7676307.

Reynhout S, Jansen S, Haesen D, van Belle S, de Munnik SA, Bongers EMHF, Schieving JH, Marcelis C, Amiel J, Rio M, Mclaughlin H, Ladda R, Sell S, Kriek M, Peeters-Scholte CMPCD, Terhal PA, van Gassen KL, Verbeek N, Henry S, Scott Schwoerer J, Malik S, Revencu N, Ferreira CR, Macnamara E, Braakman HMH, Brimble E, Ruzhnikov MRZ, Wagner M, **Harrer P**, Wieczorek D, Kuechler A, Tziperman B, Barel O, de Vries BBA, Gordon CT, Janssens V, Vissers LELM. ***De Novo Mutations Affecting the Catalytic α Subunit of PP2A, PPP2CA, Cause Syndromic Intellectual Disability Resembling Other PP2A-Related Neurodevelopmental Disorders***. *Am J Hum Genet*. 2019 Jan 3;104(1):139-156. doi: 10.1016/j.ajhg.2018.12.002. Epub 2018 Dec 27. Erratum in: *Am J Hum Genet*. 2019 Feb 7;104(2):357. PMID: 30595372; PMCID: PMC6323609.

Lebenslauf

Philip Wolfgang Harrer

09.01.1991

Schulbildung und Studium

2014 - 2020 **Medizinstudium (Klinischer Abschnitt)**

Technische Universität München

2011 - 2014 **Medizinstudium (Vorklinischer Abschnitt)**

Ludwig-Maximilians-Universität München

2001 - 2010 **Abitur (Allgemeine Hochschulreife)**

Nellenburg-Gymnasium Stockach

Promotion

Seit 2017

Ph.D.

Institut für Neurogenomik, Helmholtz Zentrum München

Institut für Humangenetik, Technische Universität München

„Molecular analysis of movement disorders – genomic and epigenomic approaches“

Prof. Dr. Juliane Winkelmann

Seit 2015

Dr. med.

Friedrich-Baur-Institut an der Neurologischen Klinik und

Poliklinik, Ludwig-Maximilians-Universität München

“Untersuchungen zur Pathophysiologie der PRDM12-assoziierten angeborene Schmerzunempfindlichkeit“

Prof. Dr. Jan Senderek