

Aus der Klinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie  
(Univ.-Prof. Dr. med. M. P. Schön)  
der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

# **Die Rolle von Nicastrin in der Pigmentierung**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizinischen Fakultät der  
Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von

**Matthias Andreas Hermasch**

aus

Werne

Göttingen 2022

Dekan: Prof. Dr. med. W. Brück

### **Betreuungsausschuss**

Betreuer: Univ.-Prof. Dr. med. J. A. Frank

Ko-Betreuer: PD Dr. rer. nat. R. Dosch

### **Prüfungskommission**

Referent: Univ.-Prof. Dr. med. J. A. Frank

Korreferent: Prof. Dr. med. I. Bogeski

Promotor: Prof. Dr. med. R. Dressel

Datum der mündlichen Prüfung: 20.12.2022

Hiermit erkläre ich, die Dissertation mit dem Titel "Die Rolle von Nicastrin in der Pigmentierung" eigenständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Göttingen, den

.....

(Unterschrift)

**Im Rahmen dieser Dissertation sind die nachfolgend aufgeführten Publikationen, Vorträge und Poster-Präsentationen entstanden.**

Publikationen

---

**Hermasch MA**, Frank J (2019): Hereditäre Hauttumorsyndrome. *Hautarzt* 70, 490-496

**Hermasch MA**, Schön MP, Betz RC, Frank J (2019): Zwei Frauen mit Haarverlust. *J Dtsch Dermatol Ges* 17, 845-847

**Hermasch MA\***, Schnabel V\*, Schön MP, Fischer J, Frank J (2020): Schmerzhaftige Hautschwellung nach Wasserkontakt. *J Dtsch Dermatol Ges* 18, 764-768

**Hermasch MA**, Schön MP, Frank J (2021): Comorbid acne inversa and Dowling-Degos disease due to a single NCSTN mutation: is there enough evidence? *Br J Dermatol* 184, 374

**Hermasch MA\***, Janning H\*, Schnabel V\*, Muschalek W, Bennemann A, Schön MP, Betz RC, Dosch R, Frank J (2021): Nicastrin deficiency and depigmentation – all about tyrosinase? *J Investig Dermatol* 141, 1331-1334

Schnabel V\*, **Hermasch MA\***, Schön MP, Betz RC, Frank J (2021): Eine Frau mit hyperpigmentierten Maculae und Papeln. *J Dtsch Dermatol Ges* 19, 1655-1659

Muschalek W\*, **Hermasch MA\***, Schön MP, Frank J (2022): Eine Frau mit Blasen und Photosensitivität. *J Dtsch Dermatol Ges* 20, 358-361

**Hermasch MA**, Janning H, Perera RP, Schnabel V, Rostam N, Ramos-Gomes F, Muschalek W, Bennemann A, Alves F, Ralser DJ, Betz RC, Schön MP, Dosch R, Frank J (2022): Evolutionary distinct roles of  $\gamma$ -secretase subunit nicastrin in zebrafish and humans. *J Dermatol Sci* 105, 80-87

\* geteilte Erstautorenschaft

## Vorträge

---

- 26.01.2019 Die Rolle der  $\gamma$ -Sekretase in der Pigmentierung.  
*Fotodermatologie Symposium 2019*  
*Klinik für Dermatologie und Venerologie, Universitätsmedizin Rostock*
- 31.08.2019 Die Rolle von Nicastrin in der Pigmentierung.  
*91. Jahrestagung der Norddeutschen Dermatologischen Gesellschaft*  
*Warnemünde, Deutschland*
- 11.03.2020 Morpholino-mediated knockdown of  $\gamma$ -secretase-subunit Nicastrin causes hypopigmentation due to dysfunctional melanoblast migration, differentiation and distribution.  
*47. Jahrestagung der Arbeitsgemeinschaft Dermatologische Forschung*  
*Berlin, Deutschland*  
(Zugesagt, jedoch ausgefallen aufgrund des COVID-19-Lockdowns)
- 26.02.2022 Morpholino-mediated knockdown of  $\gamma$ -secretase-subunit Nicastrin causes hypopigmentation due to disturbed melanoblast development and indicates evolutionarily distinct roles in zebrafish and humans  
*48. Jahrestagung der Arbeitsgemeinschaft Dermatologische Forschung*  
*Berlin, Deutschland (Online Kongress)*

## Poster-Präsentationen

---

- 30.01.2020 Morpholino-mediated knockdown of  $\gamma$ -secretase-subunit Nicastrin causes hypopigmentation due to dysfunctional melanoblast migration, differentiation and distribution.  
*Winter School der Arbeitsgemeinschaft Dermatologischer Forschung*  
*Schneefernerhaus, Garmisch-Partenkirchen, Deutschland*
- 11.03.2020 Morpholino-mediated knockdown of  $\gamma$ -secretase-subunit Nicastrin causes hypopigmentation due to dysfunctional melanoblast migration, differentiation and distribution.  
*47. Jahrestagung der Arbeitsgemeinschaft Dermatologische Forschung*  
*Berlin, Deutschland*  
(Zugesagt, jedoch ausgefallen aufgrund des COVID-19-Lockdowns)
- 28.08.2021 Evolutionarily distinct roles of  $\gamma$ -secretase subunit nicastrin in zebrafish and humans  
*92. Jahrestagung der Norddeutschen Dermatologischen Gesellschaft*  
*Warnemünde, Deutschland*
- 26.02.2022 Morpholino-mediated knockdown of  $\gamma$ -secretase-subunit Nicastrin causes hypopigmentation due to disturbed melanoblast development and indicates evolutionarily distinct roles in zebrafish and humans  
*48. Jahrestagung der Arbeitsgemeinschaft Dermatologische Forschung*  
*Berlin, Deutschland (Online Kongress)*

# Inhaltsverzeichnis

<b>Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>III</b>
<b>Tabellenverzeichnis.....</b>	<b>IV</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>V</b>
<b>1 Einleitung .....</b>	<b>1</b>
1.1 Pigmentierung.....	1
1.1.1 Die Entwicklung der Melanozyten.....	1
1.1.2 Die Funktion der Melanozyten.....	2
1.1.3 Das Melanin.....	3
1.2 Pigmentierungsstörungen .....	4
1.2.1 Retikuläre Hyperpigmentierungserkrankungen.....	4
1.2.2 Morbus Dowling-Degos .....	6
1.3 Die Notch-Signalroute .....	8
1.4 $\gamma$ -Sekretase.....	10
1.4.1 APH-1.....	12
1.4.2 PSEN .....	12
1.4.3 Pen-2 .....	13
1.4.4 NCSTN .....	15
1.5 Ziele der Doktorarbeit .....	15
1.5.1 Zebrafischstudien.....	15
1.5.2 Fragestellungen.....	17
<b>2 Material und Methoden.....</b>	<b>18</b>
2.1 Material .....	18
2.1.1 Primer .....	22
2.1.2 Morpholinos .....	23
2.1.3 Puffer und Medien.....	23
2.1.4 Sequenzen und Mutationen.....	24
2.2 Methoden .....	26
2.2.1 Zebrafische .....	26
2.2.2 Morpholino-Injektionen .....	27
2.2.3 Grundlegende Labortechniken .....	28
2.2.4 Klonierung und Mutagenese .....	31
2.2.5 In-vivo-Bildgebung.....	34
2.2.6 Weiterführende Experimente.....	35
2.2.7 Auswertung und Statistik.....	37

<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b> .....	<b>40</b>
3.1	Hypopigmentierung durch <i>ncstn</i> -Knockdown .....	40
3.1.1	Phänotypen .....	40
3.1.2	Statistische Auswertung .....	42
3.2	Phänotypreversion der MO-vermittelten Hypopigmentierung durch <i>ncstn</i> -RNA-Ko- Injektion .....	43
3.2.1	Phänotypen .....	43
3.2.2	Statistische Auswertung .....	45
3.3	Phänotypreversion der MO-vermittelten Hypopigmentierung durch NCSTN-RNA-Ko- Injektion .....	46
3.3.1	Phänotypen .....	46
3.3.2	Statistische Auswertung .....	47
3.4	Phänotypreversion der MO-vermittelten Hypopigmentierung durch Behandlung mit mutierter NCSTN-RNA .....	48
3.4.1	Phänotyp nach Behandlung mit NCSTN-Mutation c.497C>A .....	48
3.4.2	Phänotyp nach Behandlung mit NCSTN-Mutation c.278delC .....	50
3.4.3	Phänotyp nach Behandlung mit NCSTN-Mutation c.1101+1G>A .....	52
3.4.4	Phänotyp nach Behandlung mit NCSTN-Mutation c.632C>G .....	54
3.5	Morphologie der Melanophoren beim Wildtyp im Vergleich zum <i>ncstn</i> -Knockdown .....	56
3.5.1	Breite der Melanophoren .....	56
3.5.2	Zelllänge der Melanophoren .....	58
3.5.3	Flächenausdehnung der Melanophoren .....	60
<b>4</b>	<b>Diskussion</b> .....	<b>62</b>
4.1	<i>ncstn</i> -Defizienz im Zebrafisch .....	63
4.2	NCSTN-Defizienz im Menschen .....	65
4.3	Der Zebrafisch als Modell zur Erforschung humaner Pigmentierungsstörungen .....	68
4.3.1	Kurative Phänotyp-Reversion mit Zebrafisch- und humaner RNA .....	68
4.3.2	Exploration der Effekte humaner NCSTN-Mutationen im Zebrafisch .....	69
4.4	Vergleich der Auswirkungen einer <i>ncstn</i> /NCSTN-Dysfunktion im Zebrafisch und Menschen – ein preliminäres Resümee .....	71
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>73</b>
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis</b> .....	<b>74</b>

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Melanozyten-Ontogenese des Menschen mit Expression charakteristischer Differenzierungsmarker. ....	2
Abbildung 2: Melanogenese des Menschen. ....	4
Abbildung 3: Klinik und Histologie des Morbus Dowling-Degos. ....	8
Abbildung 4: Der Notch-Signalweg. ....	10
Abbildung 5: $\gamma$ -Sekretase-Proteasekomplex mit seinen vier Untereinheiten. ....	11
Abbildung 6: Ontogenese der Melanophoren mit Expression charakteristischer Differenzierungsmarker im Zebrafisch. ....	16
Abbildung 7: Definierter Bereich zur Melanophorenzählung in der Zebrafischlarve. ....	38
Abbildung 8: Beispiel für die Vermessung eines Melanophoren. ....	38
Abbildung 9: MO-vermittelter <i>ncstn</i> -Knockdown im Zebrafisch. ....	41
Abbildung 10: MO-vermittelter <i>ncstn</i> -Knockdown im Zebrafisch. ....	42
Abbildung 11: Statistische Auswertung der Melanophoren-Anzahl nach MO-vermitteltem <i>ncstn</i> -Knockdown im Zebrafisch. ....	43
Abbildung 12: Phänotypreversion mit <i>ncstn</i> -RNA im Zebrafisch. ....	44
Abbildung 13: Statistische Auswertung der Melanophoren-Anzahl nach Phänotypreversion mittels <i>ncstn</i> -RNA im Zebrafisch. ....	45
Abbildung 14: Phänotypreversion mit humaner NCSTN-RNA im Zebrafisch. ....	47
Abbildung 15: Statistische Auswertung der Melanophoren-Anzahl nach Phänotypreversion mittels humaner NCSTN-RNA im Zebrafisch. ....	48
Abbildung 16: Behandlung der <i>ncstn</i> -MO-Zebrafischembryonen mit NCSTN-RNA-c.497C>A. ...	49
Abbildung 17: Statistische Auswertung der Melanophoren-Anzahl nach Behandlung mit NCSTN-RNA-c.497C>A. ....	50
Abbildung 18: Behandlung der <i>ncstn</i> -MO-Zebrafischembryonen mit NCSTN-RNA-c.278delC. ....	51
Abbildung 19: Statistische Auswertung der Melanophoren-Anzahl nach Behandlung mit NCSTN-RNA-c.278delC. ....	52
Abbildung 20: Behandlung der <i>ncstn</i> -MO-Zebrafischembryonen mit NCSTN-RNA-c.1101+1G>A. ....	53
Abbildung 21: Statistische Auswertung der Melanophoren-Anzahl nach Behandlung mit NCSTN-RNA-c.1101+1G>A. ....	54
Abbildung 22: Behandlung der <i>ncstn</i> -MO-Zebrafischembryonen mit NCSTN-RNA-c.632C>G. ....	55
Abbildung 23 Statistische Auswertung der Melanophoren-Anzahl nach Behandlung mit NCSTN-RNA-c.632C>G. ....	56
Abbildung 24: Breite der Melanophoren des Wildtyps und <i>ncstn</i> -Knockdowns im Zeitraum von 48 - 70 hpf. ....	57
Abbildung 25: Breite der Melanophoren des Wildtyps und <i>ncstn</i> -Knockdowns im Zeitraum von 72 - 96 hpf. ....	58
Abbildung 26: Länge der Melanophoren des Wildtyps und <i>ncstn</i> -Knockdowns im Zeitraum von 48 - 70 hpf. ....	59
Abbildung 27: Länge der Melanophoren des Wildtyps und <i>ncstn</i> -Knockdowns im Zeitraum von 72 - 96 hpf. ....	59
Abbildung 28: Flächenausdehnung der Melanophoren des Wildtyps und <i>ncstn</i> -Knockdowns im Zeitraum von 48 - 70 hpf. ....	60
Abbildung 29: Flächenausdehnung der Melanophoren des Wildtyps und <i>ncstn</i> -Knockdowns im Zeitraum von 72 - 96 hpf. ....	61



## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Übersicht erworbener und hereditärer retikulärer Pigmentierungsstörungen.....	5
Tabelle 2: Varianten des Morbus Dowling-Degos .....	7
Tabelle 3: Verbrauchsmaterialien .....	18
Tabelle 4: Geräte .....	19
Tabelle 5: Chemikalien .....	20
Tabelle 6: Reaktionssysteme.....	21
Tabelle 7: Software und Datenbanken.....	21
Tabelle 8: Primer zur Amplifikation des <i>NCSTN/ncstn</i> -Gens und vier spezifischer Mutanten.....	22
Tabelle 9: Morpholinos .....	23
Tabelle 10: Referenzsequenzen.....	24
Tabelle 11: <i>NCSTN</i> -Mutationen .....	24
Tabelle 12: Verdünnung der Morpholinos.....	35
Tabelle 13: Verdünnung der RNA .....	35

## Abkürzungsverzeichnis

5-MP-MO	<i>5-mispair morpholino</i>
AI	Akne inversa
APH-1	<i>anterior pharynx defective 1</i>
bp	Basenpaare
Co-MOo	<i>control morpholino</i> (Kontrollmorpholino)
DHI	5,6-Dihydroxyindol
DHICA	5,6-Dihydroxyindol-2-Carbonsäure
DNA	<i>desoxyribonucleic acid</i> (Desoxyribonukleinsäure)
DOPA	L-3,4-Dihydroxyphenylalanin
FAD	<i>familiar alzheimer disease</i> (familiärer Morbus Alzheimer)
FAI	Familiäre Akne inversa
hpf	<i>hours post fertilization</i> (Stunden nach Fertilisation)
IHG	Idiopathische Hypomelanosis guttata
KRT5	Keratin 5
MITF	Mikrophthalmie-assoziiierter Transkriptionsfaktor
MO	Morpholino
NCSTN	Nicastrin
ncstn	Zebrafisch-Homolog des humanen NCSTN
OE-PCR	<i>overlap extension polymerase chain reaction</i> (Überlappende-Extensions-Polymerasekettenreaktion)
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> (Polymerasekettenreaktion)
Pen-2	<i>presenilin enhancer 2</i> (Präsenilin-Verstärker-2)
POFUT1	Protein-O-Fucosyltransferase-1
POGLUT1	Protein-O-Glucosyltransferase-1
PSEN	<i>presenilin</i> (Präsenilin)
RHD	<i>reticulate hyperpigmentation disorder</i> (Retikuläre Hyperpigmentierungserkrankung)
RNA	<i>ribonucleic acid</i> (Ribonukleinsäure)
RT	Raumtemperatur
SDM	<i>site-directed mutagenesis</i> (Ortspezifische Mutagenese)
TYR	Tyrosinase
TYRP1	<i>tyrosin-related protein 1</i> (DHICA-Oxidase)
TYRP2/DCT	<i>tyrosin-related protein 2</i> (DOPAchrom-Tautomerase)

# 1 Einleitung

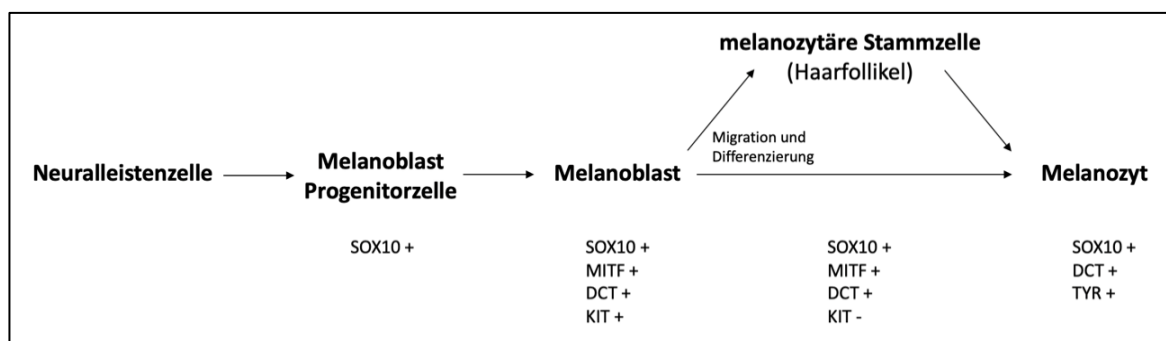
## 1.1 Pigmentierung

Die Pigmentierung und deren Regulation ist ein komplexer biologischer Prozess, der von verschiedenen Faktoren beeinflusst wird. In diesem Rahmen wird der resultierende individuelle Phänotyp vor allem durch genetische Heterogenität und multifaktorielle Umwelteinflüsse bestimmt. Die Pigmentierung prägt aber nicht nur das äußere Erscheinungsbild, sondern bietet auch einen Schutz vor potentiell schädlicher ultravioletter (UV) Strahlung. Die Grundlage der Pigmentierung bilden der Farbstoff Melanin (Pigment) und die farbstoffsynthetisierenden Melanozyten (Pigmentzellen). Neben der Haut sind diese auch in anderen Geweben des Körpers zu finden, wo sie wichtige Funktionen wahrnehmen.

### 1.1.1 Die Entwicklung der Melanozyten

Die Entwicklung der Melanozyten beginnt in den embryonalen Neuralleistenzellen des Neuroektoderms und wird durch die Expression des Mikrophthalmie-assoziierten Transkriptionsfaktors (MITF) zentral gesteuert (Goding 2007). Die mit der MITF-Expression assoziierten melanozytären Entwicklungsschritte (siehe Abbildung 1) werden von mehreren Transkriptionsfaktoren beeinflusst und kontrolliert (Baxter et al. 2010). Diese Regulationsmechanismen sind bis heute noch nicht vollständig erforscht. Es wird jedoch angenommen, dass neben PAX3, SOX10, SOX9, SOX2, ZIC3 und SNAIL2 noch weitere, bisher unbekannte Transkriptionsfaktoren die MITF-Expression beeinflussen (Mort et al. 2015). Nach Expression des Tyrosinkinase-Rezeptors (KIT) und der Dopachrom-Tautomerase (DCT) durch die in der Neuralleiste befindlichen Progenitorzellen werden diese zu Melanoblasten, die in ihre Zielgewebe migrieren (Cramer 1991). Hierzu gehören neben der Epidermis und dem Haarfollikel auch die Uvea, das Innenohr, Herz, der Knochen und die weiche Hirnhaut (Goldgeier et al. 1984; Nichols und Reams 1960; Steel und Barkway 1989; Yajima und Larue 2008). Die in die Haarfollikel ausgewanderten Melanoblasten differenzieren nicht nur zu Melanozyten, sondern auch zu melanozytären Stammzellen (Nishimura et al. 2005). Diese melanozytären Stammzellen können sich zur Erneuerung teilen oder zu Transitzellen differenzieren, welche sich dann wiederum zu Melanozyten weiterentwickeln (Goding 2007). Diese Prozesse werden unter anderem durch den Notch- und Wnt-Signalweg gesteuert (Goding 2007; Moriyama et al. 2006; Mort et al. 2015). Ist die Entwicklung und Migration der

Melanozyten abgeschlossen, beginnt die Pigmentzelle mit der Produktion des Melanins (siehe Sektion 1.1.3).



**Abbildung 1: Melanozyten-Ontogenese des Menschen mit Expression charakteristischer Differenzierungsmarker.** Neuralleistenzellen differenzieren im ersten Schritt zu SOX10-positiven (+) melanoblastären Progenitorzellen, die anschließend zu Melanoblasten (SOX10-, MITF-, DCT- und KIT-positiv) weiterdifferenzieren. Diese migrieren in ihre jeweiligen Zielgewebe, wo sie sich entweder zu Melanozyten (SOX10-, DCT- und TYP-positiv) weiterentwickeln oder zu melanozytären Stammzellen (SOX10-, MITF-, DCT-positiv und KIT-negativ), die im Haarfollikel lokalisiert sind und sich erneuern oder über weitere Zwischenschritte zu Melanozyten ausreifen können. Modifiziert nach Mort et al. (2015) - CC BY 3.0.

### 1.1.2 Die Funktion der Melanozyten

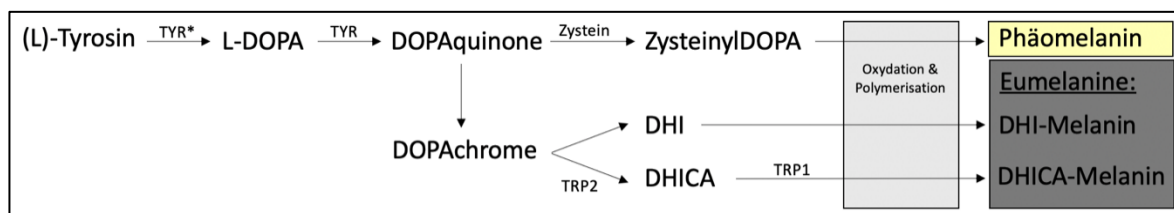
Die Hauptaufgabe der Melanozyten ist die Pigment-Synthese (Melanogenese) und dessen Weitergabe an die umliegenden Keratinozyten in der Epidermis (Costin und Hearing 2007). Dort sind die Melanozyten im Stratum basale lokalisiert, wo sie mit ihren Zellkörpern der Basalmembran aufliegen (Abdallah et al. 2017). Ihre dendritischen Fortsätze ermöglichen es ihnen, das Melanin vom Stratum basale aus an die umliegenden Keratinozyten abzugeben (Park et al. 2009). Hierbei versorgt ein Melanozyt innerhalb einer sogenannten „epidermalen Melanin-Einheit“ etwa 40 Keratinozyten (Fitzpatrick und Breathnach 1963). Ungeachtet der Hautpigmentierung finden sich bei allen Menschen eine vergleichbar große Menge an Melanozyten, wobei diese etwa 10% der Zellen in der basalen Epidermis ausmachen (Haass und Herlyn 2005). Die Stärke der Hautpigmentierung und der Haare hängt von der Aktivität der Melanogenese und der Weitergabe des Pigments an die umliegenden Keratinozyten ab (Jimbow et al. 1976). Diese Prozesse sind auf der einen Seite genetisch determiniert, auf der anderen Seite durch Stressfaktoren wie zum Beispiel einer UV-Exposition induzierbar (Jimbow et al. 1976). In den Melanozyten wird das Pigment in Melanosomen gespeichert, die ebenfalls über die dendritischen Zellfortsätze in die umgebenden Keratinozyten geschleust werden (Park et al. 2009). Diese lagern sich wie eine Schutzkappe dem Zellkern auf, um ihn vor UV-Strahlung zu schützen (Jimbow et al. 1976).

Erst kürzlich wurde entdeckt, dass die Melanozyten neben der Melanogenese auch eine Rolle im Immunsystem spielen (Gasque und Jaffar-Bandjee 2015). Mit ihrer dendritischen Morphologie, der Erkennung von Pathogenen über Mustererkennungsrezeptoren mit anschließender Phagozytose, Antigenpräsentation (über MHC-II, CD40, ICAM1) und Zytokinproduktion (IL-1/3/6/8, TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ ) weisen sie eine Ähnlichkeit zu den Langerhans-Zellen auf, wobei letztere jedoch embryologisch dem hämatopoetischen System entstammen, (Gasque und Jaffar-Bandjee 2015; Mackintosh 2001; Plonka et al. 2009).

### 1.1.3 Das Melanin

Unter dem Oberbegriff Melanin werden das braun-schwärzliche Eumelanin und hell-gelbliche Phäomelanin zusammengefasst (Riley 1997). Melanin absorbiert bis zu 99,9% des schädlichen UV-Lichts und wandelt es in Wärme um (Meredith und Riesz 2004). Um seine Schutzfunktion in der Haut ausüben zu können, wird es in spezialisierten intrazellulären Vesikeln, den Melanosomen, gespeichert und von den Melanozyten an die umgebenden Zellen abgegeben (Jimbow et al. 1976). Darüber hinaus wird angenommen, dass Melanin als Antioxidans auch chemoprotektive Eigenschaften besitzt (Meyskens et al. 2004).

Während der Melanogenese finden in den Melanosomen eine Reihe biochemischer Prozesse statt, in deren Rahmen aus der Aminosäure (L)-Tyrosin verschiedene Melaninvarianten synthetisiert werden (siehe Abbildung 2) (Seiji und Fitzpatrick 1961). Im ersten Schritt wird (L)-Tyrosin durch das Schlüsselenzym Tyrosinase (TYR) zu L-3,4-Dihydroxyphenylalanin (DOPA) hydroxiliert und anschließend zu DOPAquinon oxidiert (Fitzpatrick et al. 1967). Diese zentralen und geschwindigkeitsbestimmenden Schritte der Melanin-Synthese unterliegen einer Vielzahl regulatorischer Einflüsse (Fitzpatrick et al. 1967). Abhängig von der Anwesenheit von Thiolen (z.B. Zystein) teilt sich der Syntheseweg der zwei Melaninformen auf. Ist Zystein vorhanden, wird DOPAquinon zu ZysteinyldOPA umgesetzt, das nachfolgend spontan zum gelblichen Phäomelanin oxidiert und polymerisiert (Hearing 2011). Stehen für die Reaktion keine Thiole zur Verfügung, zyklisiert das DOPA spontan zu DOPAchrom (Hearing 2011). DOPAchrom wiederum kann sich entweder spontan zum schwarzen DHI- (5,6-Dihydroxyindol) Melanin umwandeln oder es bildet sich unter Einfluss der DCT und der DHICA-Oxidase (*tyrosin-related protein 1*, TRP1) das bräunliche DHICA- (5,6-Dihydroxyindol-2-Carbonsäure) Melanin (Eumelanin) (Simon et al. 2009; Slominski et al. 2004). In der menschlichen Haut sind alle Varianten des Melanins anzutreffen, wobei nur der prozentuale Anteil des Eumelanins für den Grad der Pigmentierung verantwortlich ist (Slominski et al. 2004; Yamaguchi et al. 2007).



**Abbildung 2: Melanogenese des Menschen.** (L)-Tyrosin wird durch die TYR im ersten Schritt zu L-DOPA und anschließend zu DOPAquinone umgewandelt (geschwindigkeitsbestimmender Schritt\*). DOPAquinone wird in Anwesenheit von Zystein zu ZysteinylDOPA umgesetzt. Steht kein Zystein zur Verfügung, zyklisiert es spontan zu DOPAchrome, das durch die TRP2 zu DHICA prozessiert wird. DOPAchrome kann sich jedoch auch spontan in DHI umwandeln. Sowohl ZysteinylDOPA als auch DHI und DHICA oxydieren und polymerisieren zu den drei Formen des Melanins (Phäomelanin, DHI-Melanin und DHICA-Melanin). Basierend auf Simon et al. (2009).

## 1.2 Pigmentierungsstörungen

Phänotypisch äußern sich zelluläre Defekte im Rahmen der melanozytären Entwicklung und Melanogenese in Form verschiedener Pigmentierungsstörungen (Synonym: Pigmentierungserkrankungen). Unterschieden werden erworbene und hereditäre Formen, die sich mit einer Hypo- und/oder Hyperpigmentierung manifestieren können.

Bei den hereditären Pigmentierungsstörungen wird formalgenetisch zwischen Erkrankungen mit autosomal-dominanter, autosomal-rezessiver und gonosomaler Vererbung unterschieden. In dieser Dissertation liegt der Fokus auf den hereditären, autosomal-dominant vererbten Hyperpigmentierungserkrankungen, weshalb auf die anderen Formen nicht näher eingegangen wird.

Hyperpigmentierung bezeichnet eine verstärkte Färbung der Haut und/oder Schleimhaut, die durch eine Vielzahl endo- und exogener Faktoren hervorgerufen werden kann und auf eine übermäßige Melanineinlagerung im Gewebe zurückzuführen ist (Muller et al. 2012). Anhand des klinischen Erscheinungsbildes können Hyperpigmentierungserkrankungen in lokalisierte, diffuse und retikuläre Formen unterteilt werden (Giehl und Braun-Falco 2010).

### 1.2.1 Retikuläre Hyperpigmentierungserkrankungen

Retikuläre Hyperpigmentierungserkrankungen (RHDs; siehe Tabelle 1) sind durch eine netzartig angeordnete, hell- bis grau-bräunliche Pigmentablagerung gekennzeichnet (Giehl und Braun-Falco 2010). Die für alle Mitmenschen sichtbare Verfärbung der Haut kann bei den Betroffenen einerseits ein ästhetisches Problem darstellen. Andererseits kann sie auch zu einem Verlust der Lebensqualität auf Grund des Meidens sozialer Kreise/Aktivitäten führen und mit

Komplikationen durch Begleiterkrankungen im Rahmen übergeordneter genetischer Syndrome assoziiert sein (Giehl und Braun-Falco 2010).

Erworbene RPDs haben unterschiedliche (multifaktorielle) Ursachen. Sie können medikamentös, postinflammatorisch, hormonell und/oder durch eine Intoxikation bedingt sein sowie durch eine andere Erkrankung (z. B. Morbus Addison) hervorgerufen werden (Banba et al. 1999; Dereure 2001; Stulberg et al. 2003). Da der Fokus dieser Arbeit auf den hereditären Formen liegt, werden wir im Folgenden nicht weiter auf die erworbenen Erkrankungen eingehen.

Hereditäre RPDs beruhen auf genetischen Veränderungen (Mutationen) und reflektieren eine Gruppe seltener Genodermatosen (Giehl und Braun-Falco 2010). Neben sporadisch (durch de novo-Mutationen) auftretenden Fällen liegt bei den meisten dieser Erkrankungen ein autosomal-dominanter Erbgang vor (Sardana et al. 2013). Bei einigen der hereditären RPDs konnten die verantwortlichen Gene bereits identifiziert werden. Zu diesen gehören *ADAM10* und *DSRAD* bei der retikulären Akropigmentierung vom Typ Kitamura bzw. Dohi, *Keratin 14* bei der Dermatopathia pigmentosa reticularis sowie *Keratin 5 (KRT5)*, *Protein-O-Fucosyltransferase-1 (POFUT1)*, *Protein-O-Glucosyltransferase-1 (POGLUT1)* und *PSENEN* beim Morbus Dowling-Degos (DDD). Hingegen sind die Gendefekte des Haber-Syndroms und der X-chromosomalen retikulären Pigmentierungsstörung bisher noch nicht bekannt (siehe Tabelle 1). Da die klinische Unterscheidung der verschiedenen Krankheitsbilder schwierig ist, sollten in der Diagnostik molekulargenetische Untersuchungstechniken zur Anwendung kommen (Muller et al. 2009).

Die häufigste und bisher am besten untersuchte RPD ist der DDD (Muller et al. 2012). Im Rahmen dieser Dissertation wurde der DDD als Modellerkrankung zur Erforschung von Pigmentierungsprozessen und der damit assoziierten Krankheitsbildern herangezogen.

**Tabelle 1: Übersicht erworbener und hereditärer retikulärer Pigmentierungsstörungen**

<b>Erworbene retikuläre Pigmentierungserkrankungen</b>	<b>Hereditäre retikuläre Pigmentierungserkrankungen</b>
Acanthosis nigricans	Retikuläre Akropigmentierung Typ Kitamura
Konfluierende retikuläre Papillomatose	Retikuläre Akropigmentierung Typ Dohi
Prurigo pigmentosa	Dermatopathia pigmentosa reticularis
Urticaria pigmentosa	Haber-Syndrom
Retikuläre erythematöse Muzinose	X-chromosomale retikuläre Pigmentierungsstörung

Terra-firma-artige Dermato­se	Morbus Dowling-Degos
-------------------------------	----------------------

Basierend auf Sardana et al. (2013).

### 1.2.2 Morbus Dowling-Degos

Der DDD repräsentiert eine klinisch und genetisch heterogene autosomal-dominant vererbte RPD (siehe Tabelle 2).

Die Erkrankung wurde erstmalig von Dowling und Freudenthal (1938) beschrieben und später durch Degos und Ossipowski (1954) als retikuläre Pigmentierungserkrankung der Flexuren bezeichnet.

Müller et al. (2012) konnten zeigen, dass der DDD innerhalb der RPDs mit ca. 30% der häufigste Vertreter ist, und dass das mittlere Alter bei Erstmanifestation 24,5 Jahre beträgt. Hierbei sind Frauen mit bis zu ca. 70% öfter betroffen als Männer, wobei die Erkrankung in allen Ethnien auftritt.

Klinisch manifestiert sich der DDD mit hyperpigmentierten Maculae und flachen Papeln, hauptsächlich in den großen Flexuren und Körperfalten. Es wurden jedoch auch Fälle beschrieben, bei denen die Extremitäten und/oder die Halsregion betroffen waren (siehe Abbildung 3) (Kim et al. 1999; Mohanty et al. 2019).

Differentialdiagnostisch kommen sowohl erworbene als auch hereditäre RPDs in Betracht. Unter den erworbenen Formen sollten die Acanthosis nigricans, konfluierende retikuläre Papillomatose, Prurigo pigmentosa, retikuläre erythematöse Muzinose und Terra-firma-artige Dermato­se abgegrenzt werden (siehe Tabelle 1). Die zu unterscheidenden erblichen Formen umfassen die retikuläre Akropigmentierung vom Typ Kitamura und Typ Dohi, das Haber-Syndrom, die Dermatopathia pigmentosa reticularis und die X-chromosomale retikuläre Pigmentierungsstörung (siehe Tabelle 1) (Sardana et al. 2013).

Neben der Klinik kann zur Diagnostik eine histologische Untersuchung herangezogen werden. Beim DDD zeigt sich hierbei typischerweise ein tiefengerichtetes Wachstum fingerförmiger Epithelstränge mit einer Hyperpigmentierung basaler Keratinozyten (siehe Abbildung 3). Die Haarfollikel sind dilatiert und hyperkeratotisch (Müller et al. 2012). Liegt auch eine Akantholyse vor, ist dies hinweisend auf eine ursprünglich als eigenständige Entität unter dem Namen Morbus Galli-Galli klassifizierte Variante des DDD (Sprecher et al. 2007).

Neben der histologischen Untersuchung spielt heutzutage die molekulargenetische Analyse eine zentrale diagnostische Rolle, da bereits vier krankheitsverursachende Gene gefunden wurden, die mit teils charakteristischen Phänotypen einhergehen (siehe Tabelle 2). Im Jahr 2006 konnten



Betz et al. (2006) erstmalig Mutationen im *KRT5*-Gen nachweisen, einem wichtigen Protein der basalen epidermalen Keratinozyten. Im Jahr 2013 entdeckten Li et al. (2013) Mutationen im *POFUT1*-Gen, das für die Protein-O-Fucosyltransferase-1 kodiert und eine wichtige Rolle in der posttranslationalen Modifizierung von NOTCH-Proteinen spielt. Betroffene Patienten zeigten auch Hyperpigmentierungen an den Handinnenflächen und Fußsohlen (Betz 2017; Li et al. 2013). Im darauf folgenden Jahr konnten Basmanav et al. (2014) weitere Mutationen im *POGLUT1*-Gen nachweisen, das für die Protein-O-Glucosyltransferase-1 kodiert und ebenso für Proteinmodifikationen innerhalb der NOTCH-Signalroute verantwortlich ist. Diese Patienten zeigten die typischen Hyperpigmentierungen insbesondere an den Streckseiten der Extremitäten (Basmanav et al. 2014; Betz 2017). Im Jahr 2017 konnten Ralser et al. (2017) mit *PSENEN* das bislang vierte krankheitsverursachende Gen identifizieren. Es kodiert für die  $\gamma$ -Sekretase-Untereinheit Pen-2 und kann bei Betroffenen neben der Hyperpigmentierung bei suszeptiblen Patienten (starker Nikotingenuss; Übergewicht; Hyperglykämie) auch eine familiäre Form der Akne inversa (FAI) hervorrufen (Ralser et al. 2017).

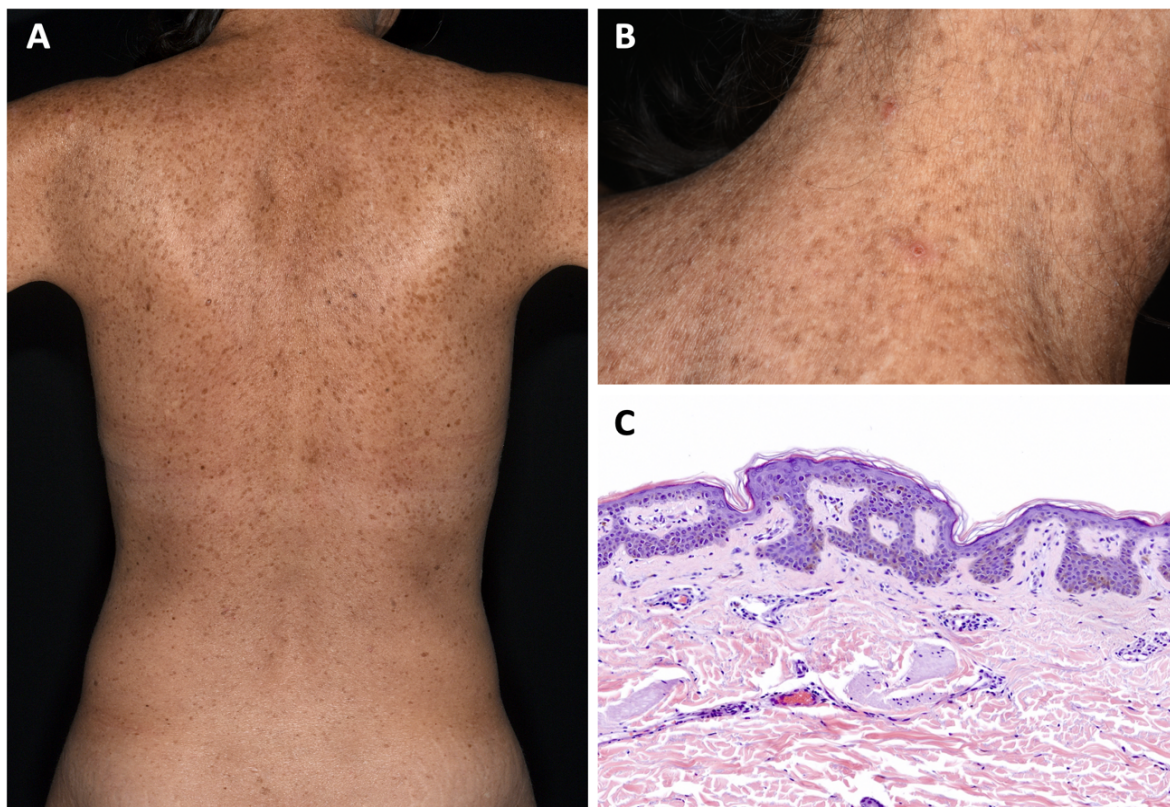
Bisher gibt es keine effektive Behandlung des DDD. Derzeitige Therapiestrategien beinhalten das Auftragen harnstoff- und/oder retinoidhaltiger Topika sowie einer Lasertherapie.

Gemeinsam ist den Genen *KRT5*, *POGLUT1*, *POFUT1* und *PSENEN*, dass sie wichtige Bestandteile der NOTCH-Signalroute sind. Dieser entwicklungs geschichtlich konservierte Signalweg spielt eine wichtige Rolle in der Zell-Zell-Kommunikation und der Zellproliferation (Artavanis-Tsakonas et al. 1999).

**Tabelle 2: Varianten des Morbus Dowling-Degos**

DDD - Subtyp	OMIM-Nummer	Betroffenes Gen	Klinisch hauptsächlich betroffene Areale	Referenz
DDD Typ 1	179850	KRT5	Flexuren, große Körperfalten	Betz et al. (2006)
	613736	PSENEN	Flexuren, große Körperfalten und familiäre Akne inversa bei suszeptiblen Patienten	Ralser et al. (2017)
DDD Typ 2	615327	POFUT1	Hand- und Fußflächen	Li et al. (2013)
DDD Typ 3	615674	unbekannt	unbekannt	unbekannt
DDD Typ 4	615696	POGLUT1	Extremitäten, Beugeseiten-unabhängig	Basmanav et al. (2014)

Die vier bisher bekannten Formen des DDD mit Registrierungsnummer in der Datenbank Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM), betroffenem Gen und der jeweils vorherrschenden klinischen Symptomatik sowie der Referenz der Erstbeschreibung.



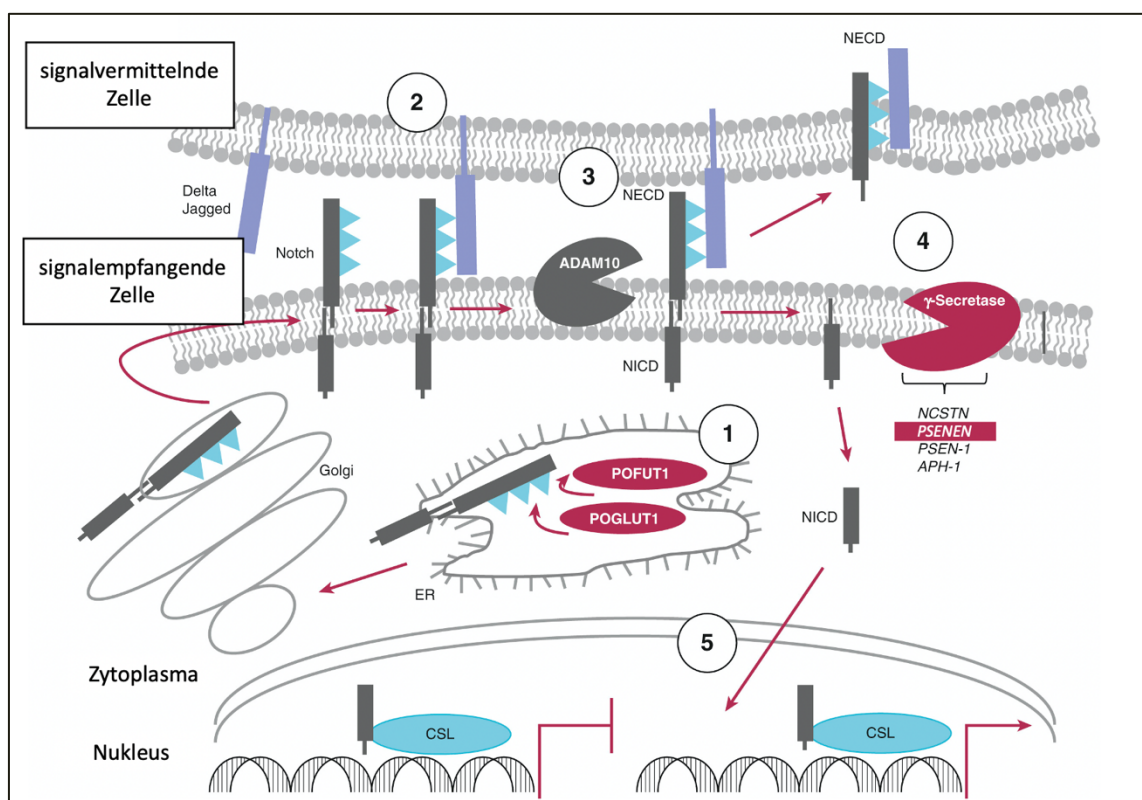
**Abbildung 3: Klinik und Histologie des Morbus Dowling-Degos.** (A) Makulopapulöse Hyperpigmentierungen am Rücken. (B) Makulopapulöse Hyperpigmentierungen an Hals und Nacken. (C) Längliches und verschmälertes tiefengerichtetes Wachstum der Epidermis mit basaler Hyperpigmentierung und subepidermale Infiltrat. Die Verwendung erfolgt mit freundlicher Genehmigung der Klinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie der Universitätsmedizin Göttingen.

### 1.3 Die Notch-Signalroute

Die Notch-Signalroute nimmt eine zentrale Rolle in der Kommunikation benachbarter Zellen ein (Artavanis-Tsakonas et al. 1999). Beteiligt sind der namensgebende Notch-Rezeptor, dessen Liganden und mehrere Enzyme. Die im Rahmen der Prozessierung anfallenden intra- und extrazellulären Spaltprodukte vermitteln extrazelluläre Signale an den Zellkern (siehe Abbildung 4). Neben der Regulation der Pigmentierung nimmt die Signalroute eine bedeutsame Funktion in der embryonalen Entwicklung neuronaler (Gaiano und Fishell 2002), vaskulärer (Liu et al. 2003), kardialer (Grego-Bessa et al. 2007), pankreatischer (Murtaugh et al. 2003), T-zellulärer (Laky und Fowlkes 2008) und zytoskelettaler (Lai 2004) Gewebe ein.

Vor Expression des Notch-Rezeptors an der Oberfläche signalrezeptierender Zellen wird dieser posttranslational durch POFUT1 und POGLUT1 im endoplasmatischen Retikulum modifiziert (Munro und Freeman 2000; Shao et al. 2002). Beim Menschen wurden bisher vier verschiedene Notch-Rezeptoren beschrieben (Liu et al. 2014). Nach Aktivierung des Notch-Rezeptors durch einen seiner Liganden spaltet ADAM10, eine Metalloprotease aus der ADAM-Proteinfamilie, die extrazelluläre Domäne ab (Lai 2004; van Tetering et al. 2009). Diese als NECD (*notch extracellular domain*) bezeichnete Domäne verbleibt nach der Spaltung am Liganden und wird durch die signalvermittelnde Zelle aufgenommen und abgebaut (Hansson et al. 2010). Nach der Spaltung durch ADAM10 wird der verbliebene Teil des Notch-Rezeptors intramembranös durch die  $\gamma$ -Sekretase gespalten, wobei der als NICD (*notch intracellular domain*) bezeichnete intrazellulär gelegene Anteil des Rezeptors in das Zytosol freigegeben wird. Im Nukleus interagiert NICD unter anderem mit dem Transkriptionsfaktor CSL, der die Expression zahlreicher Zielgene reguliert (Frank et al. 2018; Luca et al. 2015).

Im Rahmen der Pigmentierung spielt der Notch-Signalweg insbesondere in der Entwicklung melanozytärer Stammzellen und Melanoblasten eine wichtige Rolle (Moriyama et al. 2006). Wie bereits unter 1.2.1 und 1.2.2 beschrieben können molekulare Defekte innerhalb dieser Signalroute zu einer fehlerhaften Pigmentierung und somit zu verschiedenen Pigmentierungserkrankungen führen. Die zentrale Funktion des Signalwegs zeigt sich insbesondere beim DDD, dem eine Dysfunktion von Proteinen der Notch-Signalroute zu Grunde liegen (siehe Abbildung 4). Erst kürzlich konnte Ralser et al. (2017) zeigen, dass Mutationen im *PSENEN*-Gen mit dem DDD Typ 1 assoziiert sein können und betroffene Patienten ein zusätzliches Risiko zur Entwicklung einer FAI haben.



**Abbildung 4: Der Notch-Signalweg.** Die im Rahmen der Pathogenese des DDD bedeutsamen Proteine sind rot unterlegt hervorgehoben. (1) Notch-Rezeptor-Proteine werden posttranslational im endoplasmatischen Retikulum (ER) durch POFUT1 und POGLUT1 modifiziert. (2) Der Signalweg wird aktiviert, wenn Notch-Liganden (unter anderem Delta-like, Jagged), die von der signalvermittelnden Zelle exprimiert werden, an den Notch-Rezeptor binden. Nachfolgend kommt es zu zwei proteolytischen Spaltungen. (3) ADAM10 katalysiert die Abspaltung des extrazellulären Teils des Notch-Rezeptors, wodurch die extrazelluläre Notch-Domäne (NECD) freigesetzt wird. (4) Der  $\gamma$ -Sekretase-Komplex katalysiert die intramembranöse Spaltung, was zur Freisetzung der intrazellulären Notch-Domäne (NICD) in das Zytoplasma führt (NICD). (5) Die NICD transloziert in den Nucleus, wo sie mit dem Transkriptionsfaktor CSL interagiert und hierdurch die Expression verschiedener Zielgene reguliert. Modifiziert nach Frank et al. (2018). Die Verwendung erfolgt mit freundlicher Genehmigung von Elsevier.

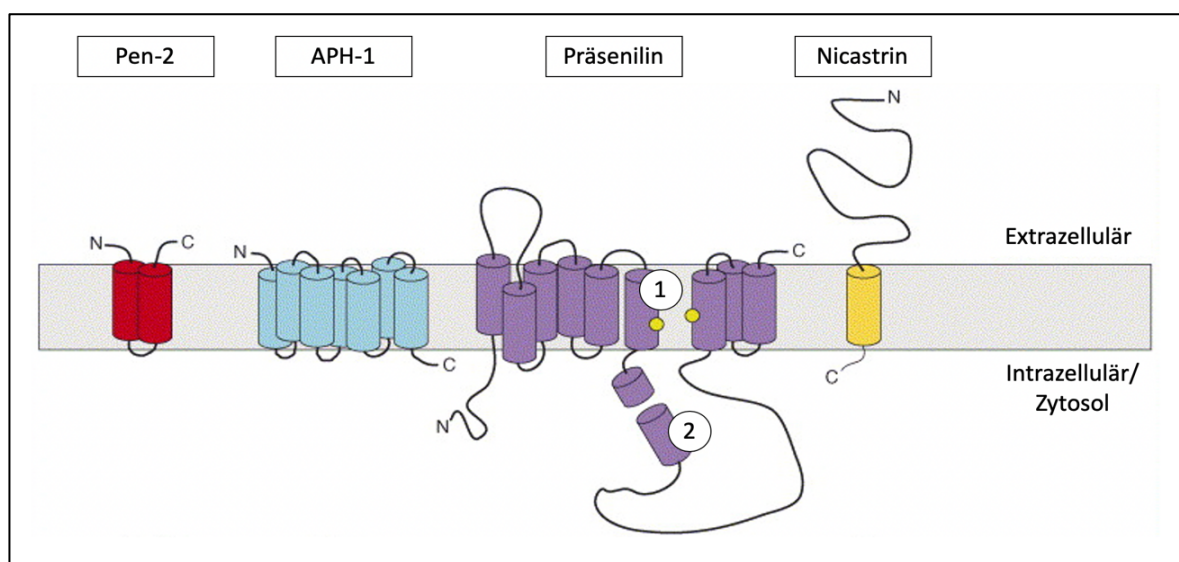
## 1.4 $\gamma$ -Sekretase

Die  $\gamma$ -Sekretase ist als Proteasekomplex an vielen biologischen Prozessen des Körpers beteiligt und spaltet neben Notch mindestens 90 weitere Membranproteine vom Typ 1 (Kopan und Ilagan 2004; Wolfe 2020). Darunter befindet sich auch das Amyloid Precursor Protein, welches bei einer Fehlfunktionen des Spaltungsprozesses zu  $\beta$ -Amyloid-Plaques umgewandelt wird, das mit einer familiären Form des Morbus Alzheimer assoziiert ist (Wolfe 2019). Da jedoch in dieser Dissertation der Fokus auf der Notch-Signalroute liegt, werden wir auf die weiteren Proteine nicht näher eingehen.

Die  $\gamma$ -Sekretase ist ein integrales Membranprotein mit 19 Transmembrandomänen, das aus vier verschiedenen Untereinheiten besteht (Lu et al. 2014; Lundkvist und Naslund 2007). Zu diesen gehören die Proteine anterior pharynx-defective 1 (APH-1; siehe Sektion 1.4.1), Präsenilin (*presenilin*; PSEN, siehe Sektion 1.4.2) Präsenilin-Verstärker-2 (*presenilin enhancer 2*; Pen-2; siehe Sektion 1.4.3), und Nicastrin (NCSTN; siehe Sektion 1.4.4) (siehe Abbildung 5) (Kaether et al. 2006). Gemeinsam lagern sich diese Untereinheiten zu einem Komplex zusammen, der in der Plasmamembran seine Zielstrukturen erkennen und proteolytisch spalten kann (Kimberly et al. 2003). PSEN bildet die katalytische Untereinheit der  $\gamma$ -Sekretase und muss zur Aktivierung zunächst endoproteolytisch durch Pen-2 gespalten werden (Kimberly et al. 2003). NCSTN spielt eine wichtige Rolle in der Substraterkennung und -bindung, APH-1 in der Substratprozessierung (Gertsik et al. 2014).

Über die Plasmamembran hinaus ist die  $\gamma$ -Sekretase auch im Mitochondrium exprimiert, wo es wahrscheinlich eine regulatorische Funktion im Rahmen der Apoptose ausübt (Capell et al. 2005; Hansson et al. 2004).

Im Folgenden werden die vier Untereinheiten und ihre spezifischen Aufgaben im Detail vorgestellt, ebenso wie Erkrankungen, die mit einer Dysfunktion einzelner Untereinheiten assoziiert sind.



**Abbildung 5:  $\gamma$ -Sekretase-Proteasekomplex mit seinen vier Untereinheiten.** Dargestellt sind Pen-2 (rot), APH-1 (blau), PSEN (lila) und NCSTN (gelb). (1) Katalytisches Zentrum der Protease. (2) An dieser Stelle wird die Protease endoproteolytisch durch Pen-2 gespalten und somit in seine aktive Form überführt. Modifiziert nach Lundkvist und Naslund (2007). Die Verwendung erfolgt mit freundlicher Genehmigung von Elsevier.

### 1.4.1 APH-1

APH-1 liegt beim Menschen in zwei homologen Formen vor, APH-1A und APH-1B (Francis et al. 2002). In der Maus wurde darüber hinaus ein weiteres Homolog gefunden, Aph-1c, das jedoch beim Menschen nicht vorkommt (Hebert et al. 2004). Von APH-1A gibt es zwei Spleißvarianten, APH-1aL und APH-1aS (Shirotani et al. 2004; Zhang et al. 2014). Die Isomere weisen sieben Transmembrandomänen auf, wobei das N-terminale Ende sich extrazellulär befindet und das C-terminale Ende intrazellulär lokalisiert ist (Fortna et al. 2004). Im  $\gamma$ -Sekretase-Komplex ist APH-1 für die Stabilität verantwortlich und dient als Grundgerüst (Gertsik et al. 2014).

Die ursprüngliche Annahme, dass Mutationen in *APH-1B* eine Rolle in der Entwicklung des Morbus Alzheimer spielen, konnte kürzlich widerlegt werden (Zhang et al. 2020). Bisher wurden beim Menschen keine Erkrankungen beschrieben, die mit Mutationen im *APH-1*-Gen assoziiert sind.

### 1.4.2 PSEN

PSEN liegt beim Menschen in zwei Isoformen vor, Präsenilin 1 (PSEN1) und Präsenilin 2 (PSEN2) und hat jeweils neun Transmembrandomänen (Li et al. 2000). Zur Aktivierung wird diese Aspartat-Protease durch Pen-2 (siehe Sektion 1.4.3) zwischen den Transmembrandomänen 6 und 7 endoproteolytisch gespalten (Takasugi et al. 2003). Hierbei wird PSEN in zwei Fragmente geteilt: PSEN-CTF (Präsenilin C-terminales Fragment) und PSEN-NTF (Präsenilin N-terminales Fragment) (siehe Abbildung 5) (Takasugi et al. 2003). Nach der Spaltung liegen die beiden Anteile als Heterodimer vor (Podlisny et al. 1997).

Bisher wurden mehr als 150 *PSEN*-Mutationen beschrieben, die zu einer familiären Form des Morbus Alzheimer (FAD) führen und mehrheitlich im *PSEN1*-Homolog auftreten (Vetrivel et al. 2006). Darüber hinaus wurden *PSEN*-Mutationen auch bei der familiären Akne Inversa (FAI) (Wang et al. 2010), dilatativen Kardiomyopathie (Li et al. 2006) und frontotemporalen Demenz (Dermaut et al. 2004) beschrieben. Bisher sind keine humanen hereditären Pigmentierungserkrankungen bekannt, die auf Mutationen in *PSEN1/PSEN2* zurückzuführen sind. Jedoch berichteten Nornes et al. (2009) und Jiang et al. (2018) über einen Pigmentierungsphänotyp im Zebrafischmodell, der den Gruppen im Zusammenhang mit Experimenten zur Erforschung des Morbus Alzheimer aufgefallen war und auf einer Dysfunktion von PSEN2 beruhte.

### 1.4.3 Pen-2

Pen-2 wird durch das *PSENEN*-Gen kodiert. Mit einer Länge von 101 Aminosäuren und zwei Transmembrandomänen ist es die kleinste der vier Untereinheiten (Crystal et al. 2003). Seine Hauptaufgabe liegt in der endoproteolytischen Spaltung von PSEN1/2, wodurch diese in ihre aktiven Formen überführt werden. Daneben konnte gezeigt werden, dass ein *PSENEN*-Knockdown mit einem deutlichen Aktivitätsverlust der  $\gamma$ -Sekretase verbunden ist (Takasugi et al. 2003). Über die Endoproteolyse hinaus nimmt Pen-2 auch weitere Funktionen innerhalb des  $\gamma$ -Sekretase-Komplexes wahr. Diese konnten jedoch bis heute noch nicht vollständig entschlüsselt werden und machen einen Teil derzeitiger wissenschaftlicher Bemühungen aus (Gertsik et al. 2014).

Erstmals im Jahr 2010 wurden Mutationen im *PSENEN*-Gen mit dem Krankheitsbild der FAI assoziiert (Pink et al. 2011; Wang et al. 2010), das im folgenden Kapitel näher vorgestellt wird (siehe Sektion 1.4.3.1). Im Jahr 2016 wiesen Zhou et al. (2016) erstmalig auf eine mögliche molekulargenetische Assoziation zwischen FAI und DDD hin, nachdem sie bei von beiden Erkrankungen Betroffenen *PSENEN*-Mutationen identifizieren konnten. Hieran anknüpfend widmeten sich Ralser et al. (2017) der weiteren Untersuchung von *PSENEN* und dessen Rolle in der Pigmentierung. Neben der Sequenzierung des *PSENEN*-Gens bei Patienten mit DDD bedienten sie sich eines in-vivo-Modells, dem Zebrafisch (*Danio rerio*). Es gelang ihnen darzustellen, dass eine *PSENEN*-Mutation in der Keimbahn beim Menschen primär mit dem Phänotyp des DDD assoziiert ist. Nur bei Vorliegen weiterer multifaktorieller Suszeptibilitätsfaktoren wie starkem Nikotingenuss, Übergewicht und Hyperglykämie besteht für die Anlageträger offensichtlich ein erhöhtes Risiko, auch an einer FAI zu erkranken (Ralser et al. 2017).

#### 1.4.3.1 Akne Inversa

Die Akne inversa (AI; Synonyme: Hidradenitis suppurativa, Akne conglobata, *apocrine acne*) ist eine multifaktorielle chronische Erkrankung, die mit einer Entzündung der Talgdrüsen einhergeht (Jemec 2012). Grundsätzlich wird zwischen einer erworbenen und familiären Form (FAI) unterschieden.

Epidemiologisch wird eine regional variierende Prävalenz von 0,03 bis 4% angenommen, wobei Frauen ca. dreimal häufiger betroffen sind als Männer (Pinter et al. 2020). Das Erstmanifestationsalter liegt in der zweiten und dritten Lebensdekade (Jemec 2012).

Klinisch manifestiert sich die FAI vor allem in Hautarealen, die reich an apokrinen Drüsen sind, insbesondere in den Axillen sowie in der Inguinal- und Anogenitalregion (Kurzen et al. 2008).

Die Patienten weisen schmerzhafte und tiefreichende entzündliche Hautveränderungen auf, die sich zu Abszessen entwickeln können (Jemec 2012; Slade et al. 2003). In der derzeitigen Klassifikation nach Hurley finden sich im Stadium I einzelne, voneinander abgrenzbare Abszesse. Im Stadium II sind die Abszesse zwar klinisch voneinander getrennt, in den tieferen Hautlagen jedoch durch Fisteln miteinander verbunden, und es kann zur Narbenentwicklung kommen. Im Stadium III treten die Abszesse flächenhaft auf, und die Patienten weisen stets Fisteln und Narben auf (Jemec 2012; Slade et al. 2003).

Differentialdiagnostisch kommen eitrige Entzündungen wie Furunkel, Karbunkel und Abszesse sowie granulomatöse Erkrankungen wie die kutane Sarkoidose und Tuberkulose (besonders die im Perianalbereich lokalisierte *Tuberculosis cutis colliquativa*) in Betracht. Darüber hinaus sollten auch Analfisteln, ein Pilonidalsinus, eine tiefe Trichophytide, ein Lymphogranuloma inguinale und eine Aktinomykose berücksichtigt werden (Lam et al. 2007; Sabat et al. 2017).

In der Diagnostik ist eine ausführliche Familien- und Genussmittelanamnese unverzichtbar, da bis zu 30% der Betroffenen eine familiäre Häufung und oftmals einen übermäßigen Nikotinkonsum aufweisen. Die klinische Inspektion mit Palpation und Sondierung von Fisteln sowie die Bestimmung des Body-Mass-Indexes können durch Ultraschall- und MRT-Untersuchungen zur Erfassung der Tiefenausdehnung komplementiert werden. (Jemec 2012; Ralser et al. 2017).

Die Therapie der AI ist schwierig. Neben antiseptischen und adstringierenden Lokalmaßnahmen sowie der systemischen Gabe von Antibiotika, Retinoiden und Immunmodulatoren erfolgt in höheren Krankheitsstadien oftmals eine chirurgische Behandlung. Gewichtsreduktion, eine gesunde Lebensführung und Ernährung sowie der Verzicht auf Tabak sollten begleitend angeraten werden (Sabat et al. 2017).

Auf Grund der beobachteten familiären Häufung wurde schon früh eine genetische Prädisposition vermutet (Jansen et al. 2001). Im Jahr 2006 konnten Gao et al. (2006) die chromosomalen Loci krankheitsassoziierter Gene näher eingrenzen. In den darauffolgenden Jahren gelang dann bei einer autosomal-dominant vererbten Variante der FAI die Identifikation von Mutationen in den Genen *PSENEN* (*Online Mendelian Inheritance in Man*; OMIM 613736), *PSEN1* (OMIM 613737) und *NCSTN* (OMIM 142690), die jeweils für Untereinheiten der  $\gamma$ -Sekretase kodieren (Li et al. 2017; Pink et al. 2011; Ralser et al. 2017; Wang et al. 2010; Zhou et al. 2016). So wurden bisher insgesamt 32 Mutationen beschrieben, hierunter 25 in der Untereinheit NCSTN (Wu et al. 2018).



#### 1.4.4 NCSTN

Das 709 Aminosäuren lange Glykoprotein NCSTN wird durch das gleichnamige *NCSTN*-Gen kodiert und besitzt eine Transmembrandomäne, dessen N-terminales Ende sich extrazellulär befindet, während sein C-terminales Ende intrazellulär lokalisiert ist (Yu et al. 2000). Bevor es sich mit den Untereinheiten PSEN und Pen-2 zusammenlagert interagiert NCSTN zur Bildung eines stabilen Grundgerüsts im  $\gamma$ -Sekretase-Komplex zunächst mit APH-1 (LaVoie et al. 2003). Daneben kommt ihm eine Funktion bei intrazellulären Transportprozessen zu (Zhang et al. 2005). Die Substraterkennung und -bindung, unter anderem von Notch und APP, erfolgt N-terminal über spezifische Erkennungssequenzen an den Aminosäurepositionen 312 - 340 und an Aminosäure Glu333 (Dries et al. 2009; Shah et al. 2005). Im Jahr 2011 konnten Pamren et al. (2011) zeigen, dass NCSTN neben der Substratbindung auch eine entscheidende Rolle in der Substratselektion zukommt.

Es ist unzweifelhaft, dass *NCSTN*-Mutationen mit der FAI assoziiert sind (siehe Sektion 1.4.3.1). Des Weiteren postulierten Duchatelet et al., dass *NCSTN*-Varianten im Zusammenhang mit dem PASH-Syndrom stehen, das sich neben der AI auch mit Akne und Pyoderma gangraenosum manifestiert (Duchatelet et al. 2015). Eine pathogenetische Bedeutung in der Entstehung einer Frühform des Morbus Alzheimer wird angenommen, ist jedoch bis heute nicht abschließend geklärt (Dermaut et al. 2002; Helisalmi et al. 2004; Orlacchio et al. 2002). Ebenso soll eine *NCSTN*-Defizienz zu progressiven neurodegenerativen Prozessen und Gedächtnisverlust führen (Tabuchi et al. 2009).

### 1.5 Ziele der Doktorarbeit

Zur Charakterisierung der Rolle von NCSTN in der Pigmentierung haben wir in vitro- und in vivo-Untersuchungen an einem Zebrafisch-Modell durchgeführt, die im folgenden Abschnitt 1.5.1 beschrieben werden.

#### 1.5.1 Zebrafischstudien

Der Zebrafisch (Zebrafisch) ist ein in der Grundlagenforschung gerne verwendeter Modellorganismus, insbesondere um Fragestellungen in der Genetik und Entwicklungsbiologie nachzugehen (Lieschke und Currie 2007).

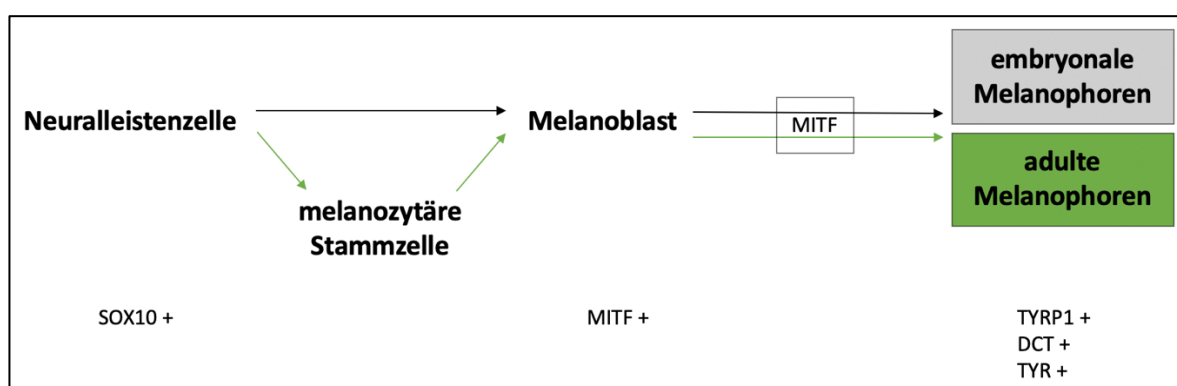
Beheimatet ist dieser Schwarmfisch in langsam fließenden oder stehenden Gewässern im Stromgebiet des Ganges, unter anderem in Pakistan, Nordindien und Bangladesch (Engeszer et al. 2007). Die adulten Fische haben einen schlanken und langgestreckten Körper mit einer Länge von bis zu 5 cm (Arunachalam et al. 2013; Spence et al. 2008). Die durchschnittliche

Generationszeit liegt bei circa drei Monaten, wobei weibliche Fische in der Lage sind, alle zwei bis drei Tage hunderte von Eiern zu legen. Die Proteine des Zebrafisches werden durch mehr als 26.000 Gene kodiert, von denen etwa 70% Homologien mit den korrespondierenden menschlichen Genen aufweisen (Howe et al. 2013).

Drei verschiedene Pigmentzelltypen prägen die für das charakteristische Aussehen der Zebrafische verantwortliche Pigmentierung: die Melanophoren (Melanozyten des Zebrafisches), Iridophoren und Xanthophoren (Mort et al. 2015). In dieser Dissertation liegt der Fokus auf den Melanophoren, weshalb wir auf die beiden anderen Zelltypen nicht näher eingehen werden. Anders als beim Menschen (siehe Sektion 1.1.1) werden in der Ontogenese der Melanophoren zwei Zelltypen unterschieden (siehe Abbildung 6).

Zum einen Melanophoren, die für das Pigmentierungsmuster in den embryonalen Stadien verantwortlich sind. Diese Melanophoren gehen aus Melanoblasten hervor, die direkt den Neuralleistenzellen entstammen (Hultman et al. 2009). Zum anderen Melanophoren, die das adulte Pigmentierungsmuster prägen. Diese entwickeln sich aus einer melanoblastären Zwischenstufe der Neuralleistenzellen, den melanozytären Stammzellen (Budi et al. 2011; Dooley et al. 2013).

Die menschliche *NCSTN*-Sequenz stimmt zu 56% mit der des Zebrafisches überein (Lim et al. 2015). Die funktionell bedeutsamen humanen Substraterkennungssequenzen sind auch im Zebrafisch konserviert. Daher wird angenommen, dass *ncstn* (NCSTN-Homolog im Zebrafisch) als Untereinheit des  $\gamma$ -Sekretase-Komplexes im Zebrafisch dieselben Aufgaben wahrnimmt wie im Menschen (Lim et al. 2015). Lim et al. (2015) konnten zeigen, dass *ncstn* zu allen Entwicklungszeitpunkten im Embryo exprimiert wird.



**Abbildung 6: Ontogenese der Melanophoren mit Expression charakteristischer Differenzierungsmarker im Zebrafisch.** Zwei Typen von Melanophoren werden unterschieden. Zum einen embryonale Melanophoren (grau), die sich direkt aus Melanoblasten der Neuralleistenzellen entwickeln (schwarze Pfeile). Zum anderen adulte Melanophoren (grün), die sich ebenfalls aus Neuralleistenzellen entwickeln, jedoch zunächst in melanozytäre

Stammzellen differenzieren, bevor sie zu Melanoblasten und anschließend zu adulten Melanophoren weiterdifferenzieren (grüne Pfeile). Die Entwicklung der Melanoblasten zu Melanophoren wird jeweils durch die Expression von MITF reguliert. Modifiziert nach Mort et al. (2015) - CC BY 3.0.

### 1.5.2 Fragestellungen

Im Rahmen dieser Dissertation wollten wir die folgenden Fragen beantworten:

1. Ist eine *ncstn*-Defizienz im Zebrafisch mit einem Pigmentierungsphänotyp assoziiert?
2. Wodurch wird dieser Pigmentierungsphänotyp verursacht?
3. Lässt sich der Phänotyp durch eine Behandlung mittels (Ko-)Injektion von Zebrafisch- bzw. humaner *NCSTN/ncstn*-RNA umkehren?
4. Hat die Injektion mutierter humaner *NCSTN*-RNA Auswirkungen auf den Pigmentierungsphänotyp des Zebrafisches?
5. Kann durch die Ko-Injektion mutierter humaner *NCSTN*-RNA der Pigmentierungsphänotyp umgekehrt werden?

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

Tabelle 3: Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterial	Hersteller
Pipettenspitzen 0,5 µl - 20 µl weiß	Brand, Wertheim, Deutschland
Pipettenspitzen 200 µl gelb	Sarstedt AG, Nümbrecht, Deutschland
Pipettenspitzen 1000 µl blau	Sarstedt AG, Nümbrecht, Deutschland
Biosphere® Filterspitzen 0,5 µl – 2 µl	Sarstedt AG, Nümbrecht, Deutschland
Biosphere® Filterspitzen 2 µl – 20 µl	Sarstedt AG, Nümbrecht, Deutschland
Biosphere® Filterspitzen 100 µl – 1000 µl	Sarstedt AG, Nümbrecht, Deutschland
Eppendorf Safe-Lock Reagenzgefäße 0,5 ml	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Eppendorf Safe-Lock Reagenzgefäße 1,5 ml	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Eppendorf Safe-Lock Reagenzgefäße 2,0 ml	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
PCR Reagenzgefäße 0,2 ml, farblos	Brand, Wertheim, Deutschland
PCR Reagenzgefäßdeckel, farblos	Brand, Wertheim, Deutschland
Petrischalen 92 mm x 16 mm mit Nocken	Sarstedt AG, Nümbrecht, Deutschland
Borosilikat-Kapillarglas GB100F-8P mit Filament und feuerpolierten Enden	Science Products, Hofheim am Taunus, Deutschland
CELLSTAR® Polypropylen Röhrchen 15 ml, 17/120 mm, konischer Boden	Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich
Röhrchen 14 ml, 18/95 mm, runder Boden mit Belüftungsstopfen	Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich
Mikro-Schraubröhre 1,5 ml	Sarstedt AG, Nümbrecht, Deutschland
Pasteur Pipetten 3 ml	Sarstedt AG, Nümbrecht, Deutschland
Messpipetten, SILBERBRAND ETERNA, Typ 3, Klasse B, 2 ml	Brand, Wertheim, Deutschland
Messpipetten, SILBERBRAND ETERNA, Typ 3, Klasse B, 10 ml	Brand, Wertheim, Deutschland

Messpipetten, SILBERBRAND ETERNA, Typ 3, Klasse B, 20 ml	Brand, Wertheim, Deutschland
Labortücher weiß, 20,5 cm x 20 cm	Kimberly-Clark Professional, Koblenz, Deutschland
Purple Nitrile-Extra, puderfreie Handschuhe, L	Halyard, Alpharetta, GA, USA
Pipettenspitzen, Microloader 0,5 µl – 20 µl	Eppendorf, Hamburg, Deutschland

Tabelle 4: Geräte

Gerät	Hersteller
Arium pro	Sartorius, Göttingen, Deutschland
AxioCam MRc	Carl Zeiss, Oberkochen, Deutschland
Brutschrank BM 400	Memmert, Schwabach, Deutschland
Chemi Doc	Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA
Digitaler Timer und Stoppuhr	TFA Dostmann, Wertheim-Reicholzheim, Deutschland
Eismaschine ZBE 70-35	ZIEGRA Eismaschinen, Isernhagen, Deutschland
Elektrophoresekammer E-H6	Febikon Labortechnik, Wermelskirchen, Deutschland
EMS-1 Controller	Carl Zeiss, Oberkochen, Deutschland
FKU 1800 Index 11A	Liebherr, Bulle, Schweiz
HERAfreeze Ultratiefkühlschrank	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Inkubator MIR-254	Sanyo, Moriguchi, Japan
Kaltlichtquelle KL 2500	Carl Zeiss, Oberkochen, Deutschland
Micropipette Puller P-97 Flaming/Brown	Sutter Instrument, Novato, SA, USA
Mikrozentrifuge Micro Star 17	VWR International, Radnor, PA, USA
Mini Electrophoresis Power Supply E143	Consort, Turnhout, Belgien
Mini-Zentrifuge C1008-G myfuge	Benchmark Scientific, Sayreville, NJ, USA
MODEL C-DSD230	Nikon, Minato, Japan

Multitron Standard	Infors, Bottmingen, Schweiz
NanoDrop 2000c	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
NU-72	Konrad Benda, Wiesloch, Deutschland
Pipette Pipetman G P1000G	Gilson, Middleton, WI, USA
Pipette Pipetman G P200G	Gilson, Middleton, WI, USA
Pipette Pipetman G P20G	Gilson, Middleton, WI, USA
Pipette Pipetman G P2G	Gilson, Middleton, WI, USA
Pneumatic PicoPump SYS-PV 820	World Precision Instruments, Sarasota, FL, USA
Portable Pipet-Aid® XP Pipette Controller	Drummond Scientific, Broomall, PA, USA
Premium GNP 2356	Liebherr, Bulle, Schweiz
Privileg 8018 Mikrowelle	Whirlpool, Benton Harbor, MI, USA
Professional TRIO Thermocycler	Biometra, Göttingen, Deutschland
Sorvall RC-5B Plus Superspeed Centrifuge	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
SteREO Lumar.V12	Carl Zeiss, Oberkochen, Deutschland
SYCOP 3 Control Panel	Carl Zeiss, Oberkochen, Deutschland
ThermoStat plus	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Varioklav 135 S	HP Medizintechnik, Oberschleißheim, Deutschland
Vortex-Genie 2	Scientific Industries, Bohemia, NY; USA
Airyscan LSM880	Carl Zeiss, Oberkochen, Deutschland

Tabelle 5: Chemikalien

Chemikalie	Hersteller
Agarose Standard	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Borsäure	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Calciumchlorid	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Chloroform	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland

Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ethidiumbromid 0,5%	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ethanol	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Isopropanol	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Kaliumchlorid	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Methylenblau	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Magnesiumsulfat	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natriumchlorid	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Phenol Red Lösung 0,5%	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Tris(hydroxymethyl)aminomethan	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
DNA/RNA-Leiter	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA

**Tabelle 6: Reaktionssysteme**

<b>Reaktionssystem</b>	<b>Hersteller</b>
GeneJET Plasmid Miniprep Kit	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Illustra RNAspin Mini	GE Healthcare, Chicago, IL, USA
NucleoBond Xtra Midi	Macherey-Nagel, Düren, Deutschland
Nucleopin Gel and PCR Clean Up	Macherey-Nagel, Düren, Deutschland

**Tabelle 7: Software und Datenbanken**

<b>Software/Datenbank</b>	<b>Hersteller/Internetadresse</b>
AxioVision Rel. 4.7	Carl Zeiss, Oberkochen, Deutschland
ClustalW	<a href="http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/">http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/</a>
Endnote X9	Clarivate Analytics, Philadelphia, PA, USA
Ensembl	<a href="http://www.ensembl.org">http://www.ensembl.org</a>
ImageJ	National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA
Microsoft Office 2019	Microsoft, Redmond, WA, USA
NCBI	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov">http://www.ncbi.nlm.nih.gov</a>

SnapGene®	GSL Biotech, San Diego, CA, USA
Zfin	<a href="http://www.zfin.org">http://www.zfin.org</a>
GraphPad PRISM	GraphPad Software, San Diego, CA, USA

### 2.1.1 Primer

Als Primer werden Oligonukleotidstrukturen bezeichnet, die sich komplementär an einzelsträngige DNA-Sequenzen anlagern. Mit ihrer am 3'-Ende lokalisierten Hydroxylgruppe dienen sie als Startpunkt für DNA-replizierende Enzyme (Chuang et al. 2013).

In den durchgeführten Experimenten und den damit verbundenen Vorbereitungen wurden die in Tabelle 8 dargestellten Primer verwendet. Diese wurden von der Firma Eurofins Genomics (Ebersberg, Deutschland) hergestellt.

**Tabelle 8: Primer zur Amplifikation des *NCSTN/ncstn*-Gens und vier spezifischer Mutanten**

Gen	Primernamen	Sequenz von 5' nach 3'
<i>ncstn</i>	dNCSTN-FW	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTAATGGAGAA TTTAATATCAATAAACTGCGTTCAGC
	dNCSTN-RV	GGGGACCACITTTGTACAAGAAAGCTGGGTTTCAGTAGGT CGTCGTGGGC
<i>NCSTN</i>	hNCSTN-FW	TCTTTTTCGAGGATCATGGCTACGGCAGGGGGTG
	hNCSTN-RV	CGAATCGATGGGATCTCAGTATGACACAGCTCCTGGC
<i>NCSTN</i> Mutation 1	hNCSTN-M1-FW	TCAGCACCAACCTTCCGACTATGTGCCATGCAG
	hNCSTN-M1-RV	CTGCATGGCACATAGTCGGAAGGTTGGTGCTGA
<i>NCSTN</i> Mutation 2	hNCSTN-M2-FW	GAGAAATACAGTGGAAATTAGCTGGGCAATGGTTTGGC
	hNCSTN-M2-RV	GCCAAACCATTGCCAGCTAATTCCACTGTATTTCTC
<i>NCSTN</i> Mutation 3	hNCSTN-M3-FW	ATGGCCCCAACCCCTTACATGGTTCTGCTGGA
	hNCSTN-M3-RV	TCCAGCAGAACCATGTAAGGGGGTTGGGGCCAT
<i>NCSTN</i> Mutation 4	hNCSTN-M4-FW	CTTCTTTCAAGGGGTGGCCITTAAGAACITTCATTAGAGCTT TG
	hNCSTN-M4-RV	GTTCITTAAGGCCACCCCTTGAAAGAAGACAAACATGACAT TGC



Die dargestellten Primer wurden entweder für das humane (h) oder Zebrafisch (d)-Gen und die vier Mutationen (M1 – M4) entworfen. Es handelt sich jeweils um Primerpaare in 5'-3'-Orientierung (*forward*, FW) und 3'-5'-Orientierung (*reverse*, RV). Die Sequenzen wurden mit den Buchstabencodes für Adenin (A), Guanin (G), Cytosin (C) und Thymin (T) verschlüsselt.

### 2.1.2 Morpholinos

Morpholinos (MO) sind synthetisch hergestellte Nukleinsäure-Analoga und wurden 1997 von Summerton und Weller (1997) entwickelt. Mit einer Länge von ca. 25 Basenpaaren binden diese intrazellulär an die jeweilig komplementäre mRNA-Sequenz und stören deren Expression durch Hemmung der Translation als auch durch Modifizierung des Spleißens. Die Translationsinhibition der kodierenden Sequenz wird durch Bindung des Morpholinos an die Initiationssequenz der mRNA und eine damit verbundene Dysfunktion des ribosomalen Initiationskomplexes vermittelt (Summerton und Weller 1997). Das Spleißen der prä-mRNA kann durch Morpholinos ebenfalls gestört werden und so zur Bildung fehlerhafter mRNAs führen (Morcos 2007). Die in Tabelle 9 dargestellten Morpholinos wurden uns als Lyophilisate von der Firma Gene Tools (Philomath, OR, USA) geliefert. Um eine 5 mM Stammlösung herzustellen wurden sie in destilliertem Wasser gelöst.

**Tabelle 9: Morpholinos**

Bezeichnung	MO-Sequenz von 5' nach 3'
<i>nicastrin</i> -Morpholino ( <i>ncstn</i> -MO)	ATCTTCCTCATTACAGATCAGCGG
5-mispair-Morpholino (5-MP-MO)	ATGTTGCTCATTGACACATCAGCGG
Kontrollmorpholino (Co-MO)	CCTCTACCTCAGTTACAATTTATA

### 2.1.3 Puffer und Medien

Das E3 Medium setzt sich aus 5 mM NaCl, 0,17 mM KCl, 0,33 mM CaCl<sub>2</sub>, 0,33 mM MgCl<sub>2</sub> und 0,00001% Methylenblau zusammen. Der pH-Wert von 7,2 wurde mit NaOH eingestellt. Wenn farbloses (weißes) E3 Medium erforderlich war, wurde kein Methylenblau hinzugegeben.

Der Tris-Borat-EDTA Puffer (TBE) wurde für die Agarose-Gelelektrophorese verwendet. Die Stammlösung setzt sich aus 89 mM TRIS, 89 mM Borsäure und 2 mM EDTA-Na<sub>2</sub> in destilliertem Wasser zusammen. Der pH-Wert lag bei 8,5 und wurde mit NaOH eingestellt.

## 2.1.4 Sequenzen und Mutationen

### 2.1.4.1 Referenzsequenzen

**Tabelle 10: Referenzsequenzen**

Gen	Organismus	Referenznummer	Quelle
<i>nicastrin</i>	Zebrafisch	NM_001009556.1.	<a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov">https://www.ncbi.nlm.nih.gov</a>
<i>Nicastrin</i>	Mensch	ENST00000294785.10	<a href="http://www.ensembl.org">http://www.ensembl.org</a>

### 2.1.4.2 Nicastrin Mutationen

Wir klonierten bereits bekannte und publizierte humane Mutationen im humanen *NCSTN*-Gen, um deren Effekte hinsichtlich der Pigmentierung zu untersuchen. Hierzu wählten wir vier verschiedene Mutationsklassen aus (siehe Tabelle 11). Die erste Mutation (p.S166X; Mutation 1) ist eine Unsinn (*nonsense*)-Mutation (*nonsense mutation*), bei der es durch eine Einzelnukleotidsubstitution zum Wechsel einer Aminosäure zu einem präterminales Stop-Kodon kommt und somit die Transkription/Translation unterbricht. Bei Mutation p.93Lfs\*15 (Mutation 2) handelt es sich um eine rahmenverschiebende Deletionsmutation (*frameshift mutation*), die durch den Verlust einer Nukleotidbase hervorgerufen wird. Bei Mutation 3 resultiert aus einer Einzelnukleotidsubstitution in Intron Neun ein Verlust von 34 Aminosäuren (p.E333\_Q367del) im sich anschließenden kodierenden Bereich (Exon Neun), der wiederum zu einer Spleißstellen-Mutation (*splice site mutation*) führt. Bei der vierten Mutation, p.P211R, kommt es durch eine Einzelnukleotidsubstitution (Punktmutation) zu einem Aminosäurenwechsel und somit einer sinnverändernden (*missense*)-Mutation (*missense mutation*).

**Tabelle 11: NCSTN-Mutationen**

	Mutation	Nukleotid-substitution	Mutationskategorie	Referenz
<b>M1</b>	p.S166X	c.497C>A	Unsinn-Mutation ( <i>nonsense mutation</i> )	Ma et al. (2014)
<b>M2</b>	p.93Lfs*15	c.278delC	Rahmenverschiebende Mutation ( <i>frameshift mutation</i> )	Wu et al. (2018)
<b>M3</b>	p.E333_Q367del	c.1101+1G>A	Spleißstellen-Mutation ( <i>splice-site mutation</i> )	Pink et al. (2011)

<b>M4</b>	p.P211R	c.632C>G	Sinnverändernde Mutation ( <i>missense mutation</i> )	Li et al. (2011)
-----------	---------	----------	--	------------------

Die vier Mutationen (M1 – M4) sind auf posttranslationeller (Mutation) und transkriptioneller (Nukleotidsubstitution) Ebene angegeben. Die Veränderungen der betroffenen Proteine (Zahl) auf translationalen Ebene sind wie folgend dargestellt: Serin (S), Prolin (P), Arginin (R), Glutaminsäure (Q) Stopp-Kodon (X), Stop-Kodon 15 Aminosäuren nach Nukleotidveränderung (Lfs\*15). Die jeweilige Nukleotidsubstitution ist mit ihrer genauen Lokalisation (Zahl) als Wechsel (>) oder Deletion (del) dargestellt. In der rechten Spalte sind die Erstbeschreiber der jeweiligen Mutation zitiert.

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Zebrafische

Als Zebrafisch-Wildtyp wurde ein Hybrid aus der AB- und TLF-Linie verwendet (ABxTLF).

#### 2.2.1.1 Haltung der adulten Zebrafische

Die Haltung der Zebrafische unterlag den aktuellen Tierschutzgesetzen sowie Tierhaltungsvorschriften und wurde von Herrn PD Dr. rer. nat. Roland Dosch aus dem Institut für Humangenetik in Göttingen überwacht. Die Fische selbst wurden von ausgebildeten Tierärzten und Tierpflegern sowie technischen Laborassistenten und Wissenschaftlern aus der Arbeitsgruppe von Herrn PD Dr. rer. nat. Dosch gepflegt. Die Aquarien waren an ein Licht- und zirkulierendes Wassersystem angebunden. Somit wurden konstante Wassereigenschaften (Wassertemperatur 26,5 - 28,0 °C, pH 7,2 - 8,0, Leitfähigkeit 480 – 650 µS/cm) und ein regelmäßiger Tag-/Nacht-Rhythmus (12 Stunden hell, 12 Stunden dunkel, Wechsel um 08:00 Uhr) gewährleistet. Die Fische wurden zweimal täglich mit Flockenfutter sowie Krebstieren gefüttert.

Alle an den Zebrafischembryonen durchgeführten Experimente unterlagen den Richtlinien des Tierschutzes und der Tierhaltung und wurden an Zebrafischembryonen durchgeführt, die nicht älter als 5 Tage (120 Stunden nach Fertilisation (hpf)) waren. Somit bedurften die Untersuchungen keines Votums durch eine Ethikkommission.

#### 2.2.1.2 Gewinnung von Zebrafischembryonen

Um befruchtete Zebrafischeier im Einzellstadium zu erhalten, wurden über Nacht jeweils ein männlicher und weiblicher adulter Zebrafisch in einem Laichbecken, voneinander durch ein Gitter getrennt, zusammengebracht. Mit Einsetzen der Helligkeit am folgenden Morgen wurde die räumliche Trennung der Zebrafischpaare aufgehoben, sodass die Paarung stattfinden konnte. Die befruchteten Eier fielen durch ein Gitter und wurden nach 15 min gesammelt und in Petrischalen mit E3-Medium zur Injektionsstation transportiert.

#### 2.2.1.3 Inkubation und Pflege der Embryonen

Nach den Injektionen wurden die Embryonen in Petrischalen mit E3-Medium überführt und in einem Inkubator bei 27,5 °C gelagert. Es erfolgten regelmäßige Kontrollen nach sechs, 24, 48, 72, 96 und 120 Stunden, bei denen die Eischalen der geschlüpften Embryonen sowie tote und dysplastische Embryonen entfernt wurden. Das E3-Medium wurde nach 48 Stunden und/oder bei Verunreinigung gewechselt.

## 2.2.2 Morpholino-Injektionen

### 2.2.2.1 Herstellung der Injektionsnadeln

Zur Herstellung der Injektionsnadeln wurden ein Micropipette Puller (Sutter Instrument, Novato, SA, USA) und Borosilikat-Kapillarglas (Science Products, Hofheim am Taunus, Deutschland) verwendet. Die parallele Erhitzung und Streckung des Kapillarglases wurde mit standardisierten Einstellungen durchgeführt.

### 2.2.2.2 Vorbereitung der Injektionslösung

Die als Lyophilisate geleaferten MOs wurden zur Herstellung einer 5 mM Stammlösung in destilliertem Wasser gelöst und anschließend als Injektionslösung verwendet. Zur Verdünnung der Injektionslösung wurden ausschließlich destilliertes Wasser und Phenolrot hinzugefügt. Vor der Injektion wurde diese für 10 min bei 60 °C erwärmt und anschließend für 5 min bei 12.000 g zentrifugiert.

### 2.2.2.3 Herstellung der Injektionsrampe

Damit die Injektionen an den Embryonen sicher und effizient durchgeführt werden konnten, wurden Injektionsrampen aus 2%iger Agarose verwendet. Hierzu wurde die Agaroselösung in Petrischalen gegossen und mit Plastikmatrices auf der Oberfläche überdeckt. Diese wurde nach der Aushärtung der Agarose bei Raumtemperatur (RT) entfernt. Die somit hergestellten Rampen erleichtern die Aufreihung der Embryonen und schaffen ausreichend Stabilität und ein Widerlager während der Injektion.

### 2.2.2.4 Injektion des Morpholinos

Nach Befüllung der Injektionsnadeln mit 5 µl der Injektionslösung wurden die noch verschlossenen Spitzen der Injektionsnadeln unter mikroskopischer Sicht mit einer feinen Pinzette abgebrochen. Die korrekte Applikationsmenge von 2 nl pro Injektion wurde anschließend in einem Öltropfen auf einem Deckglas mit Messeinheiten bestimmt. Hierbei wurden die Injektionsdauer und der Injektionsdruck am Injektor (World Precision Instruments, PV 820, Pneumatic PicoPump) angepasst. Die Injektionen erfolgten freihändig in einem Winkel von 45 ° an nebeneinander aufgereihten Embryonen im Einzellstadium. Nach Positionierung der Nadelspitze im Zentrum des Embryos wurde der Injektionsvorgang durch das Drücken eines Fußpedals ausgelöst. Die Entfernung der Nadel erfolgte im gleichen Winkel wie die Insertion.

### 2.2.2.5 Injektion von RNA

Die Injektion von RNA wurde wie die Injektion mit MOs durchgeführt (siehe Sektion 2.2.2.4), wobei die Besonderheit in deren Instabilität bei Raumtemperatur liegt. Hierfür wurde die RNA bis zum Zeitpunkt der Injektion auf Eis gekühlt gelagert, bevor sie dann in die Injektionsnadeln überführt, kalibriert und injiziert wurde. Wurden während eines Experiments sowohl ein MO als auch RNA injiziert, so wurden hierbei mit zwei unterschiedlichen Nadeln zwei voneinander getrennte Injektionen im selben Embryo durchgeführt.

## 2.2.3 Grundlegende Labortechniken

### 2.2.3.1 DNA-Isolation aus Zebrafischgewebe

Zur Gewinnung der Zebrafisch-DNA wurden 50 bis 100 Zebrafischembryonen 24 hpf in einem 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß mit 0,5 ml Trizol lysiert und mit einer Kanüle homogenisiert. Nach einer Inkubation von 5 min bei RT erfolgte eine Zentrifugation für 5 min bei 12.000 g und 4 °C. Der klare Überstand wurde in einem neuen 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß mit 100 µl Chloroform für 5 min bei RT inkubiert und zur Phasentrennung anschließend für 10 min bei 4 °C und 12.000 g zentrifugiert. Die wässrige Phase wurde in ein neues 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Zur Präzipitation der RNA wurden 1 µl blaues/RNase-freies Glykogen (5-10 µg/µl) und 250 µl Isopropanol hinzugefügt und für 10 min bei RT inkubiert. Der Überstand wurde nach einer 10-minütigen Zentrifugation bei 4 °C und 12.000 g entfernt, sodass nur der Rückstand der RNA verblieb. Dessen Reinigung erfolgte durch das Hinzufügen von 500 µl EtOH und einer 5-minütigen Zentrifugation bei 7500 g und 4 °C. Die RNA wurde in 20-30 µl RNase-freiem Wasser resuspendiert und für 10 min bei 55 °C inkubiert. Im nächsten Schritt wurden 8 µl der RNA, 1 µl 10x DNase-Puffer, 0,5 µl RiboLock/RNase OUT und 0,5 µl DNase für 30 min bei 30 °C inkubiert. Anschließend erfolgte eine 10-minütige Inkubation mit 1 µl STOP-Lösung bei 65 °C. Die Konzentration der RNA wurde nun mittels Nanodrop bestimmt. Anschließend wurde mit der RNA-Extraktion fortgefahren. Hierbei wurden 20 µl RNase-freies Wasser und 30 µl Chloroform hinzugefügt, und es erfolgte eine 10-minütige Zentrifugation bei 4 °C und 7.500 g. Die obere der beiden Phasen wurde in ein neues 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß mit 15 µl Ammoniumacetat (5 M) und 100 µl EtOH (absolut) überführt und bei -20 °C für 2 Stunden inkubiert. Nach Zentrifugation der Reagenz für 5 min bei maximaler Geschwindigkeit und 4 °C wurde vor der Wiederholung dieser Zentrifugation 1 µl EtOH (70%) hinzugefügt. Die RNA wurde anschließend in 9 µl RNase-freiem Wasser resuspendiert. Im letzten Schritt erfolgte die reverse Transkription, bei der RNA zu DNA umgeschrieben wird. Hierzu wurden zuerst 7 µl RNase-freies Wasser, 2 µl der RNA, 2 µl dNTPs

und 1  $\mu\text{l}$  eines beliebigen Hexamers (100  $\mu\text{l}/\mu\text{l}$ ) in einem 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß gemischt. Dieses Gemisch wurde für 5 min auf 65 °C erhitzt und anschließend auf Eis gekühlt. Anschließend wurden 4  $\mu\text{l}$  5xFS-Puffer, 2  $\mu\text{l}$  DTT (0,1 M) und 1  $\mu\text{l}$  RiboLock hinzugefügt und 2 min bei 25 °C inkubiert. Nach Zugabe von 1  $\mu\text{l}$  Superscript-II-RT erfolgte eine erste Inkubation über 10 min bei 25 °C und nachfolgend eine zweite Inkubation bei 42 °C über 50 min. Diese Reaktion wurde durch Erhitzen auf 70 °C für 15 min beendet. Zuletzt wurde die DNA-Konzentration mittels NanoDrop bestimmt.

### 2.2.3.2 Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerasekettenreaktion (*polymerase chain reaction*; PCR) dient der selektiven und exponentiellen Vervielfältigung von Abschnitten der DNA und besteht grundlegend aus drei sich wiederholenden Reaktionsschritten (Erlich 1989). Im ersten Reaktionsschritt erfolgt eine Hitzedenaturierung der doppelsträngigen DNA. Folgend lagern sich während der Hybridisierung zwei Primer an den zu replizierenden Abschnitt an. Im letzten Schritt, der Elongation, beginnt an den Primern die Neusynthese des Komplementärstranges (Mullis et al. 1986).

Grundlegend erfolgte initial eine längere Denaturierungsphase von ca. 3 min bei 98 °C, bei der die Wasserstoffbrücken der Ausgangs-DNA getrennt wurden und sie so in ihre Einzelstränge aufgespalten wurde. Während der sich wiederholenden Hitzedenaturierungszyklen waren in diesem Reaktionsschritt 15 s ausreichend. Die Hybridisierung erfolgte für 15 s bei ca. 55 °C. Diese Temperatur war abhängig von den jeweiligen Schmelzpunkten der beiden Primer. Die benötigte Zeit der Elongation betrug in der Regel 15 s, war jedoch von der Länge des neu zu synthetisierenden Abschnitts abhängig und fand bei 72 °C statt. Das 35 bis 50-fache Wiederholen dieser Zyklen vervielfältigte den von den zwei Primern umschriebenen DNA-Abschnitt exponentiell. War die erforderliche Anzahl an Zyklen erreicht, wurde die Reaktionslösung nochmals für 10 min auf 72 °C erhitzt und die Reaktion wurde anschließend bei 20 °C pausiert.

Jede Reaktionslösung setzte sich wie folgt zusammen: 25  $\mu\text{l}$  CloneAmp HiFi PCR Premix, 21  $\mu\text{l}$  destilliertes Wasser, 1  $\mu\text{l}$  Primer vorwärts, 1  $\mu\text{l}$  Primer rückwärts und 2  $\mu\text{l}$  DNA (100 ng/ $\mu\text{l}$ ). Dieses Standardprogramm wurde je nach Zielsetzung und Eigenschaften der DNA und Primer modifiziert. Die verwendeten Primer sind in Tabelle 8 aufgelistet.

### 2.2.3.3 Sequenzierung

Die zu sequenzierenden DNA-Proben wurden an das Unternehmen Microsynth SeqLab GmbH (Maschmühlenweg 36 in 37081 Göttingen, Deutschland) geschickt. Hierfür wurden 12  $\mu\text{l}$  in ein

1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäße abgefüllt und bei RT gelagert. Die Sequenzierungsergebnisse wurden uns am Folgetag digital übermittelt, woraufhin wir diese mit den Zielsequenzen verglichen.

#### 2.2.3.4 Agarose-Gelelektrophorese und Gelextraktion

Bei der Agarose-Gelelektrophorese werden DNA- und RNA-Stränge durch einen elektrischen Spannungsgradienten ihrer Größe nach aufgetrennt. Die Wanderungsgeschwindigkeit der Fragmente hängt dabei von der Größe, der Gelkonzentration und der angelegten Spannung ab. Letztere betrug zwischen 60 und 80 Volt und wurde über circa 30 min konstant gehalten. Wir verwendeten 0,5 bis 1%ige Agarosegele in TBE mit einem Tropfen Ethidiumbromid. In diese wurde nach Gießen des Gels ein Kamm eingeführt, um die Taschen für die DNA/RNA-Proben zu formen. Vor Start der Elektrophorese wurde der Kamm entfernt und das Gel in eine mit TBE gefüllte Elektrophoresekammer eingebracht. Parallel zum Pipettieren der Proben sowie einem 1x DNA/RNA-Ladepuffer in die jeweiligen Taschen brachten wir in der ersten Tasche einen Größenstandard (1 kb DNA/RNA-Leiter) zur Kontrolle und Orientierung ein. Nach einer Laufzeit von 30 min visualisierten wir die Banden unter UV-Licht einer Emissionswellenlänge von 365 nm und führten eine Fotodokumentation des Bandenmusters durch. Falls erforderlich, konnten selektiv Banden mit einem Skalpell ausgeschnitten und purifiziert werden. Dies erfolgte mit Hilfe eines handelsüblichen Kits (NucleoSpin Gel and PCR Clean-up Kit von Macherey-Nagel). Anschließend wurde die Konzentration der DNA/RNA mittels Nanodrop bestimmt.

#### 2.2.3.5 In-vitro-Transkription

Die in-vitro-Transkription (IVT) dient der Herstellung von RNA auf Grundlage einer DNA-Matrize. Hierzu linearisierten wir in einem ersten Schritt die üblicherweise in einem Ringplasmid vorliegende cDNA. Zu diesem Zweck inkubierten wir 1 µl Plasmid-cDNA (5000 ng/µl), 2 µl 10x Fast Digest Puffer, 1 µl NotI-Enzym und 16 µl destilliertes Wasser bei 37 °C über 2 Stunden. Nach Darstellung der linearisierten DNA durch eine Gelelektrophorese wurde diese anschließend herausgeschnitten und purifiziert (siehe Sektion 2.2.3.4). Die folgende IVT-Reaktion bestand aus 2 µl linearisierter DNA (Konzentration 600 ng), 10 µl 2xNTP/CAP, 2 µl 10x Rxn-Puffer, 2 µl SP6-Enzym und 4 µl destilliertem Wasser. Dieser Reaktionsansatz wurde über 3 Stunden bei 42 °C inkubiert. Um anschließend die Überreste der DNA-Matrize und Enzyme aus der Reaktion zu entfernen, inkubierten wir das Reaktionsgemisch mit 1 µl Turbo-DNase über 15 min bei 37 °C. Im letzten Schritt wurde die RNA mit einem kommerziell erhältlichen Kit (illustra™ Probe Quant G-50 Micro Columns Purification kit von GE



Healthcare) purifiziert. Zur Qualitätssicherung und Dokumentation erfolgten abschließend eine Agarose-Gelelektrophorese und eine Konzentrationsbestimmung mittels Nanodrop.

## 2.2.4 Klonierung und Mutagenese

### 2.2.4.1 Gateway-Klonierung

Bei der Gateway-Klonierung (Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland) werden rekombinante Sequenzen des Bakteriophagen  $\lambda$  genutzt, um DNA Abschnitte durch homologe Rekombination in Vektoren einzufügen. Das Herstellerprotokoll beinhaltet drei grundlegende experimentelle Schritte. Zunächst wurden die jeweiligen Enden der DNA-Zielsequenz mit 25 bp-langen Rekombinationsstellen (im Englischen „attachment sites“, attB) erweitert und amplifiziert. Diese Rekombinationsstellen dienen zum einen der Erkennung durch an der Rekombination beteiligte Enzyme, zum anderen der korrekten Integration in den Donorvektor (pDONR 221). Hierfür wurde eine PCR (siehe Sektion 2.2.3.2) mit Primern (dNCSTN-FW und dNCSTN-RV; siehe Tabelle 8) durchgeführt, die die Rekombinationssequenzen beinhaltete. Im zweiten Schritt wurde die mit den Rekombinationsstellen erweiterte und amplifizierte DNA-Zielsequenz in den Entry Clone eingefügt (BP-Reaktion). Hierfür wurden 1  $\mu$ l BP Clonase, 1  $\mu$ l pDONR 221 (150 ng/ $\mu$ l) und 3  $\mu$ l der DNA-Zielsequenz (50-150 ng/ $\mu$ l) über Nacht bei 25 °C inkubiert. Anschließend wurde die Reaktion über 10 min mit 1  $\mu$ l Proteinase-K bei 37 °C inkubiert. Die nun folgende Transformation von 2,5  $\mu$ l des Ligationsansatzes in 50  $\mu$ l chemisch kompetenten *Escherichia coli*-Bakterien (*E. coli*; DH5 $\alpha$ ) erfolgte mittels Inkubation auf Eis für 30 min. Diese Reaktion wurde einem Hitzeschock von 1 min bei 42 °C unterzogen und unverzüglich danach für 2 min auf Eis gekühlt, anschließend fügten wir 500  $\mu$ l S.O.C.-Medium hinzu. Nach Inkubation im Laborschüttler mit 200 rpm über 45 min bei 37 °C erfolgte ein weiterer Inkubationsschritt mit jeweils 200  $\mu$ l auf Kanamycin-Platten (autoklavierter LB-Agar mit 1:1000 Kanamycin versetzt) bei 37 °C über Nacht. Nach erfolgreicher Transformation wuchsen nun über Nacht Bakterienkolonien heran. Diese Kolonien wurden anschließend mit einer autoklavierten Pipettenspitze aufgenommen und in 2 ml eines Selektionsmediums (Stammlösung: 10 ml LB-Medium und 10  $\mu$ l Ampicillin) über Nacht bei 37 °C im Laborschüttler mit 200 rpm inkubiert. Nachdem sich die Bakterien über Nacht vermehrt hatten, erfolgte am frühen Morgen eine Zentrifugation mit 8.000 g für 2 min. Mit Hilfe eines handelsüblichen Kits (GeneJET Plasmid Miniprep Kit von Thermo Scientific) wurde die Plasmid-DNA gereinigt und anschließend zur Sequenzierung (siehe Sektion 2.2.3.3) verschickt. Hierdurch gewährleisteten wir, dass die korrekte Sequenz im Entry Clone vorhanden war. Im letzten Schritt wurde die Zielsequenz in den Expressions-/Zielvektor (pcsDEST)

überführt (LR-Reaktion). Diese Reaktion beinhaltete 3  $\mu\text{l}$  des pDONR-Vektors, inklusive Zielsequenz (150 ng/ $\mu\text{l}$ ), 1  $\mu\text{l}$  pcsDEST-Vektor (150 ng/ $\mu\text{l}$ ) und 1  $\mu\text{l}$  LR-Clonase-2 und wurde über Nacht bei 25 °C inkubiert. Analog zur Herstellung des Entry-Clones wurde die Reaktion mit 1  $\mu\text{l}$  Proteinase-K bei 37 °C inkubiert, und es erfolgten die gleichen Reaktionsschritte bis hin zur Sequenzierung. Nachdem nun die Zielsequenz durch die Sequenzierung verifiziert worden war, konnte mit der IVT (siehe Sektion 2.2.3.5) zur Herstellung der RNA begonnen werden.

#### 2.2.4.2 In-Fusion-Klonierung

Die Technik der In-Fusion-Klonierung beruht auf einem der Gateway Klonierung ähnelndem Prinzip (siehe Sektion 2.2.4.1), bei der eine Zielsequenz in einen Vektor (pCS2+) eingefügt wird. Auch hierbei beinhaltet das Protokoll des Herstellers drei grundlegende Schritte. Im ersten Schritt erfolgte eine 15-bp-lange Erweiterung an den jeweiligen Enden der Zielsequenz, um diese später in den Vektor einfügen zu können. Hierfür wurde eine PCR (siehe Sektion 2.2.3.2) mit Primern (hNCSTN-FW, hNCSTN-RV; siehe Tabelle 8) durchgeführt, die die Erweiterungen beinhalteten. Nach dem Hinzufügen der Erweiterungen und der Amplifizierung der Zielsequenz wurde auch dieser Schritt durch eine Agarose-Gelelektrophorese (siehe Sektion 2.2.3.4) und anschließende Purifikation mittels Sequenzierung überprüft. Bevor die Zielsequenz und der Vektor zusammengebracht wurden, wurde der Vektor im zweiten Schritt linearisiert. Hierzu wurden 1  $\mu\text{l}$  pCS2+ (5000 ng/ $\mu\text{l}$ ), 2  $\mu\text{l}$  10x Fast Digest Puffer, 2  $\mu\text{l}$  Not-1-Enzym und 15  $\mu\text{l}$  Nuklease-freies Wasser bei 37 °C für 2 Stunden inkubiert. Durch eine Agarose-Gelelektrophorese wurden die linearisierten von den nicht-linearisierten Vektoren getrennt. Die linearisierten Vektoren wurden unter UV-Licht-Sicht herausgeschnitten und mit einem handelsüblichen Kit aufgereinigt (NucleoSpin Gel and PCR Clean-up kit von Macherey-Nagel). Im letzten Schritt, der eigentlichen In-Fusion Reaktion, wurden die Zielsequenz und der linearisierte Vektor zusammengebracht. Hierzu wurden 3  $\mu\text{l}$  Zielsequenz mit den Erweiterungen (200 ng/ $\mu\text{l}$ ), 1  $\mu\text{l}$  linearisierter Vektor (pCS2+) und 1  $\mu\text{l}$  5x In-Fusion-Klonierungs-Enzym über 15 min bei 50 °C inkubiert. Analog der Gateway-Klonierung erfolgte nun die Transformation bis hin zur Überprüfung der erfolgreichen Vektor-Insertionen durch eine Agarose-Gelelektrophorese und Sequenzierung. Nach Bestätigung der Fusion des Vektors mit der Zielsequenz erfolgte die Linearisierung und IVT (siehe Sektion 2.2.3.5), um RNA zu generieren.

#### 2.2.4.3 Ortsspezifische Mutagenese

Die ortsspezifische Mutagenese (*site-directed mutagenesis*; SDM) dient der gezielten Veränderung der DNA (Ling und Robinson 1997). Mit Hilfe von Primern werden Nukleotidbasen

ausgetauscht, eingefügt oder deltiert. Diese Technik ist nicht für größere und zusammenhängende Veränderungen einer Sequenz geeignet, weshalb in diesen Fällen die *overlap-extension*-PCR (OE-PCR; siehe Sektion 2.2.4.4) angewendet wird. Die SDM wurde zur Herstellung der drei *NCSTN*-Mutationen c.632C>G, 278delC, c.497C>A in Tabelle 11 angewendet. Im ersten Schritt wurde eine PCR (siehe Sektion 2.2.3.2) mit Primern angesetzt, die die Veränderung der *NCSTN*-Sequenz beinhaltet (h*NCSTN*-M1-FW/RV, h*NCSTN*-M2-FW/RV, h*NCSTN*-M3-FW/RV; siehe Tabelle 8). Zur Durchführung der PCR wurden 3 µl Rxn-Puffer, 1,8 µl Quick-Solution, 1 µl *NCSTN*-DNA, 0,75 µl Primer FW (100 ng/µl), 0,75 µl Primer RV (100 ng/µl), 6 µl 2,5 mM dNTP mix, 0,7 µl pfu-ultra-Polymerase und 16 µl destilliertes Wasser jeweils angepassten PCR-Zyklen unterzogen. Auf Grund der Länge der *NCSTN*-Sequenz wurden diese wie folgt adaptiert: Die initiale Denaturierungsphase wurde auf 1 min bei 95 °C eingestellt. Die folgenden 17 Zyklen beinhalteten eine Denaturierungsphase von 50 s bei 65 °C, eine Hybridisierungsphase von 50 s bei 65 °C und eine Elongationsphase von 7 min bei 68 °C. Abschließend erfolgte eine terminale Elongationsphase von 7 min bei 68 °C, gefolgt von einer Pause bei 12 °C. Die Reaktionsgefäße wurden anschließend für 2 min auf Eis gelagert, bevor durch das Hinzufügen von 1 µl Dpn-1-Restriktionsenzym (10 U/µl) und einer Inkubation von 60 min bei 37 °C die parentale doppelsträngige DNA verdaut wurde. Bei der nun folgenden Transformierung in *E. coli* und während der folgenden Schritte wurde die gemeinsame Endstrecke der Gateway- und In-Fusion-Klonierungstechnik angewendet (siehe Sektionen 2.2.4.1 und 2.2.4.2). Vor der Herstellung mutierter RNA durch eine IVT (siehe Sektion 2.2.3.5) wurden im letzten Schritt eine Agarose-Gelelektrophorese, DNA-Aufreinigung und -Sequenzierung durchgeführt, um das Gelingen der Mutagenese zu überprüfen.

#### 2.2.4.4 *Overlap-extension*-PCR

Mithilfe der OE-PCR können gezielt Veränderungen in einer DNA-Sequenz generiert werden (Higuchi et al. 1988). Die OE-PCR wurde verwendet, um die Auswirkungen der Mutation c.1101+1G>A (siehe Tabelle 11) zu untersuchen. Da die Mutation in einem nicht-kodierenden DNA-Abschnitt (Intron) liegt, sie jedoch zum Verlust eines größeren Abschnitts im kodierenden Bereich (Exon) der Sequenz führt (p.E333\_Q367del), wurde dieser gezielt deletiert. Bei der Durchführung der OE-PCR wurden drei PCR-Reaktionen hintereinander durchgeführt, wofür vier Primer verwendet wurden (h*NCSTN*-FW/RV und h*NCSTN*-M4 FW/RV; siehe Tabelle 8). Mit Hilfe dieser Primer wurden in den ersten beiden PCR-Reaktionen sich teilweise überlappende Oligonukleotidsequenzen erzeugt, die nach Fusion im Rahmen der dritten PCR zur Generierung der mutierten Zielsequenz führen (Higuchi et al. 1988). Auf Grund der Länge der *NCSTN*-Sequenz wurden die PCR-Zyklen wie bei der Durchführung der SDM

(siehe Sektion 2.2.4.3) angepasst. Die erste PCR wurde mit 25 µl HiFi-Premix, 1 µl hNCSTN-FW, 1 µl hNCSTN-M4-RV, 2 µl NCSTN-DNA und 21 µl destilliertem Wasser durchgeführt. In der zweiten PCR, die für die Erzeugung des Sequenzabschnitts verantwortlich ist, der 3' von der Mutation liegt, verwendeten wir die beiden Primer hNCSTN-M4-FW und hNCSTN-RV. Die PCR-Produkte wurden im dritten Reaktionansatz mit 25 µl HiFi-Premix, 1 µl hNCSTN-FW, 1 µl hNCSTN-RV, 2 µl des Produktes aus der ersten PCR, 2 µl des Produktes aus der zweiten PCR und 19 µl destilliertes Wasser fusioniert und amplifiziert. Die erfolgreiche Fusion wurde durch Sequenzierung des dritten PCR-Produkts verifiziert. Da die hNCSTN-FW/RV-Primer die Rekombinationsstellen für den In-Fusion-Klonierungsschritt beinhalten, konnten wir diese Technik (siehe Sektion 2.2.4.2) nachfolgend anwenden, um die neue mutierte *NCSTN*-Sequenz in einen Vektor einzufügen und RNA herzustellen.

## 2.2.5 In-vivo-Bildgebung

### 2.2.5.1 Lichtmikroskopische Aufnahmen

Zur Dokumentation des Phänotyps der Zebrafischlarven in der Ansicht von kranial und lateral wählten wir die lichtmikroskopische Bildgebung mit Hilfe eines SteREO Lumar.V12 Lichtmikroskops (Carl Zeiss). Für die Fische wurden zwei Petrischalen mit einem 2%igen Agaroseboden (in weißem E3-Medium gelöst) vorbereitet, um einen gleichmäßigen Bildhintergrund zu erhalten. In der einen Petrischale schwammen die Zebrafischlarven auf dem Agaroseboden und konnten so direkt aus kranialer Perspektive fotografiert werden. Zur lateralen Bildaufnahme wurden die Zebrafischlarven in der zweiten Petrischale durch das Hinzufügen von Tricain narkotisiert, sodass sie mit einer Pipette in die laterale Position gedreht werden konnten.

### 2.2.5.2 Bildgebung über 24 Stunden

Um die Entwicklung der Zebrafische und deren Pigmentierung über einen längeren Zeitraum beobachten und dokumentieren zu können, wurden kraniale Aufnahmen in Abständen von 20 min über 24 Stunden angefertigt. Zu diesem Zweck wurden die Embryonen in einer 1,5%igen Low-Melting-Agarose in weißem E3-Medium fixiert. Während des Fixierungsprozesses betäubten wir die Embryonen mit Tricain narkotisiert, überführten sie mit einer Pipette in die noch lauwarme Agarose und positionierten sie. Um die gleichen Umgebungseigenschaften wie im Inkubator gewährleisten zu können (27 °C), wurde das Experiment mit einem Zeiss Airyscan LSM880 Brightfield-Mikroskop durchgeführt, das von einem Inkubator umgeben war. Es wurden jeweils ein Wildtyp- und Knockdown-Embryo

gleichzeitig nebeneinander beobachtet. Diese Experimente wurden im Zeitraum von 48 bis 72 hpf und anschließend von 72 - 96 hpf in einem Dreifachansatz durchgeführt.

## 2.2.6 Weiterführende Experimente

Die zuvor beschriebenen Methoden zur Generierung humaner und Zebrafisch-NCSTN/ncstn-RNA dienen der Vorbereitung der nachfolgend beschriebenen Experimente.

### 2.2.6.1 Bestimmung der korrekten MO- und RNA-Konzentration

Zur Vermeidung toxischer Effekte mussten wir zunächst die maximal tolerable Menge/Konzentration der MOs evaluieren. Hierzu injizierten wir jeweils 2 nl MO in verschiedenen zuvor definierten Verdünnungsstufen in die Zebrafischlarven und verglichen die Effekte desselben Vorgangs bei einer unbehandelten Wildtyp-Zebrafischlarve über jeweils 120 hpf (siehe Tabelle 12).

**Tabelle 12: Verdünnung der Morpholinos**

	<b>Unverdünnt</b>	<b>Verdünnung 1:3</b>	<b>Verdünnung 1:10</b>	<b>Verdünnung 1:20</b>
<b>Phenolrot (µl)</b>	0,5	0,5	0,5	0,5
<b>MO (µl)</b>	10	2	1	1
<b>Destilliertes Wasser (µl)</b>	0	3,5	8,5	18,5

Auch die in einigen Experimenten verwendete RNA wurde in absteigenden Verdünnungsstufen in die Embryonen injiziert. Es erfolgte ebenfalls eine Beobachtung und ein Vergleich mit den Effekten beim Wildtyp über 120 hpf. Die Verdünnung erfolgte mit RNase-freiem Wasser und Phenolrot. Da die RNAs für jedes Experiment in einer Konzentration von etwa 600 ng/µl vorlagen, wurden die folgenden Verdünnungsstufen gewählt: 600, 200, und 60 ng/µl (siehe Tabelle 13).

**Tabelle 13: Verdünnung der RNA**

	<b>ca. 600 ng/µl</b>	<b>200 ng/µl</b>	<b>60 ng/µl</b>
<b>Phenolrot (µl)</b>	0,5	0,5	0,5
<b>RNA (600 ng/µl) (µl)</b>	10	2	1
<b>RNase-freies Wasser (µl)</b>	0	3,5	8,5

#### 2.2.6.2 Morpholino-vermittelter *ncstn*-Knockdown

Zur Herunterregulation von *ncstn* wurden befruchtete Zebrafischeier im Einzellstadium mit verschiedenen Morpholinos behandelt. Neben dem *ncstn*-MO verwendeten wir drei verschiedene Kontrollen: den Wildtyp, einen Co-MO und einen 5-MP-MO. Es wurden jeweils Injektionen mit 2 nl der Morpholinos in einer Verdünnung von 1:10 durchgeführt (siehe Tabelle 12). Nach der Injektion wurden die Embryonen in einem Inkubator bis zum Zeitpunkt 120 hpf gehalten, gepflegt und beobachtet. Dann erfolgte eine Fotodokumentation mit dem Lichtmikroskop.

#### 2.2.6.3 Phänotyp Reversion mit *ncstn*-RNA

Um den Phänotyp der Zebrafische nach Morpholino-vermitteltem *ncstn*-Knockdown zu revertieren, injizierten wir simultan *ncstn*-RNA. Zu diesem Zweck führten wir zwei Injektionen mit angepassten Volumina durch, wodurch eine Volumenüberlastung der Embryonen verhindert wurde. Die erste Injektion wurde mit 1 nl MO (Verdünnung 1:5) durchgeführt, die zweite mit 1 nl unverdünnter *ncstn*-RNA. Wir verwendeten mehrere aufeinander aufbauende Kontrollen. Im ersten Schritt überprüften wir die phänotypischen Effekte einer ausschließlichen *ncstn*-RNA-Injektion auf den Wildtyp. Im zweiten Schritt untersuchten wir die Effekte einer simultanen Injektion des 5-MP-Morpholinos und der *ncstn*-RNA auf Wildtyp-Embryonen. Anschließend wurde der Knockdown mittels Injektion des *ncstn*-MO wiederholt. Dies war erforderlich, um im nächsten Schritt den Effekt einer beliebigen RNA-Ko-Injektion auf den Knockdown-Phänotyp zu evaluieren. Hierzu verwendeten wir GFP-RNA. Im letzten experimentellen Schritt wurde die GFP-RNA durch *ncstn*-RNA ersetzt, um die eigentliche Phänotyp-Reversion zu bewirken. Danach wurden die Embryonen in einem Inkubator bis zum Zeitpunkt 120 hpf gehalten, gepflegt und beobachtet, und es erfolgte eine Fotodokumentation mit dem Lichtmikroskop.

#### 2.2.6.4 Phänotyp Reversion mit NCSTN-RNA

In Analogie zum zuvor beschriebenen Experiment der Phänotyp-Reversion mittels Ko-Injektion von *ncstn*-RNA des Zebrafischs evaluierten wir nun, ob wir durch die Ko-Injektion menschlicher NCSTN-RNA die phänotypischen Effekte des Morpholino-vermittelten *ncstn*-Knockdowns umkehren konnten. Wie in Abschnitt 2.2.6.3 beschrieben erfolgten wiederum zwei Injektionen, eine erste mit 1 nl Morpholino (Verdünnung 1:5), und die zweite mit 1 nl

unverdünnter Wildtyp NCSTN-RNA. Die hierbei verwendeten Kontrollen entsprachen ebenfalls den in Abschnitt 2.2.6.3 bereits beschriebenen.

#### 2.2.6.5 Behandlung mit mutierter NCSTN-RNA

Nach den Reversionsexperimenten mit humaner (NCSTN) und Zebrafisch (*ncstn*)-RNA sollte im nächsten Schritt der Phänotyp des MO-vermittelten *ncstn*-Knockdowns nach simultaner Injektion menschlicher mutierter NCSTN-RNA evaluiert werden. Hierzu erfolgten wiederum zwei Injektionen: Die erste mit 1 nl des MO (Verdünnung 1:5) und die zweite unverdünnt mit jeweils 1 nl der mutierten NCSTN-RNA, wobei wir vier verschiedene RNAs ko-injizierten, die jeweils eine zuvor veröffentlichte humane NCSTN-Mutation enthielt (siehe Tabelle 11). Der weitere experimentelle Ansatz gestaltete sich in Analogie zu dem in den Abschnitten 2.2.6.3 und 2.2.6.4 beschriebenen Versuchsablauf. Zunächst wurde der Phänotyp des Wildtyps mit dem des MO-vermittelten *ncstn*-Knockdowns verglichen. Anschließend wurde letzterer durch NCSTN-RNA revertiert. Nun erfolgten simultane Injektionen von *ncstn*-MO und der jeweilig mutierten NCSTN-RNA (M1-M4; siehe Tabelle 11). Danach wurden die Embryonen wiederum bis zum Zeitpunkt 120 hpf in einem Inkubator gehalten, gepflegt und beobachtet, und es erfolgte anschließend eine Fotodokumentation mit dem Lichtmikroskop.

### 2.2.7 Auswertung und Statistik

#### 2.2.7.1 Melanophoren im Kopfbereich

Die Auszählung der Melanophoren und Erfassung ihres Verteilungsmusters erfolgte nach Fotodokumentation aus kranialer Sicht in einem einheitlich definierten Körperareal im Kopf-/Halsbereich der Zebrafischlarven mittels ImageJ. Zellen, die auf den Linien des Messfeldes lagen, wurden mitgezählt. Im Rahmen der *ncstn*-Knockdown-Experimente (siehe Sektion 2.2.6.2) wurden jeweils 20 Fische pro Gruppe ausgewertet. Bezüglich der drei Reversionsexperimente (siehe Sektionen 2.2.6.3 - 2.2.6.5) wurden jeweils 10 Fische pro Gruppe ausgewertet. Alle Daten wurden in einer Excel-Tabelle zusammengefasst und anschließend mit GraphPad Prism grafisch dargestellt.

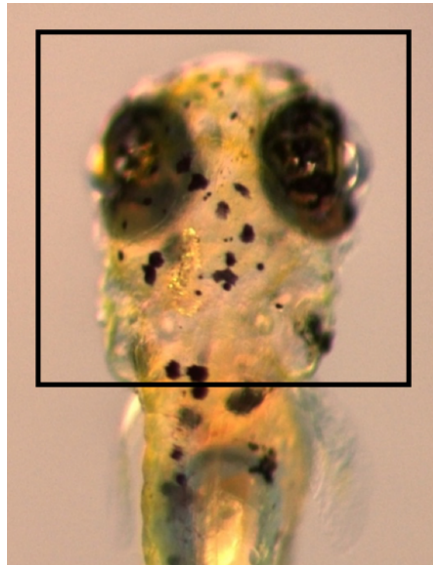


Abbildung 7: Definierter Bereich zur Melanophorenzählung in der Zebrafischlarve.

#### 2.2.7.2 Größe und Fläche der Melanophoren

In die Auswertung gingen zum einen die maximale Zellbreite (horizontal; siehe Abbildung 8a), die maximale Zelllänge (vertikal; siehe Abbildung 8b) und die Zellflächenausdehnung aus der kranialen Perspektive ein (Umrandung; siehe Abbildung 8c). Dies wurde mit ImageJ ausgewertet. Die Daten wurden in einer Excel-Tabelle dokumentiert und mit Graphpad Prism graphisch dargestellt.

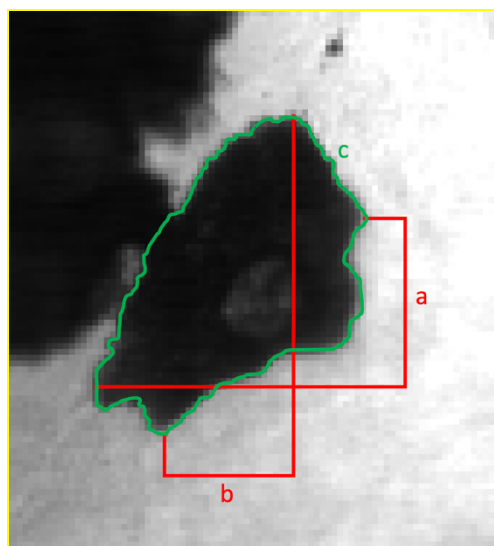


Abbildung 8: Beispiel für die Vermessung eines Melanophoren.



### 2.2.7.3 Statistische Auswertung

Alle Experimente wurden in einem Dreifachansatz durchgeführt. Dementsprechend führten wir auch alle Zellzählungen und -vermessungen im Dreifachansatz durch. Bei den Zellzählungen im zuvor definierten kranialen Areal (hierzu die Abschnitte 3.1.2, 3.2.2, 3.3.2, 3.4.1.1, 3.4.2.2, 3.4.3.2 und 3.4.4.2) führten wir eine einfache Varianzanalyse (*one-way ANOVA*), den D'Agostinos-Pearson Omnibus-Test und den Tukey Post-Hoc-Test zur Signifikanzberechnung durch. Die Graphen weisen den jeweiligen Mittelwert und die Standardabweichung aus.

Die Zellmessungen (siehe Sektionen 3.5.1 - 3.5.3) wurden mit der zweifachen Varianzanalyse (*two-way ANOVA*), dem D'Agostinos-Pearson Omnibus-Test und Šidák Post-Hoc-Test statistisch ausgewertet. Die Graphen weisen den jeweiligen Mittelwert und den Standardfehler aus.

Das Signifikanzniveau wurde durch den p-Wert angegeben und graphisch in Form von Sternen dargestellt.

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Hypopigmentierung durch *ncstn*-Knockdown

#### 3.1.1 Phänotypen

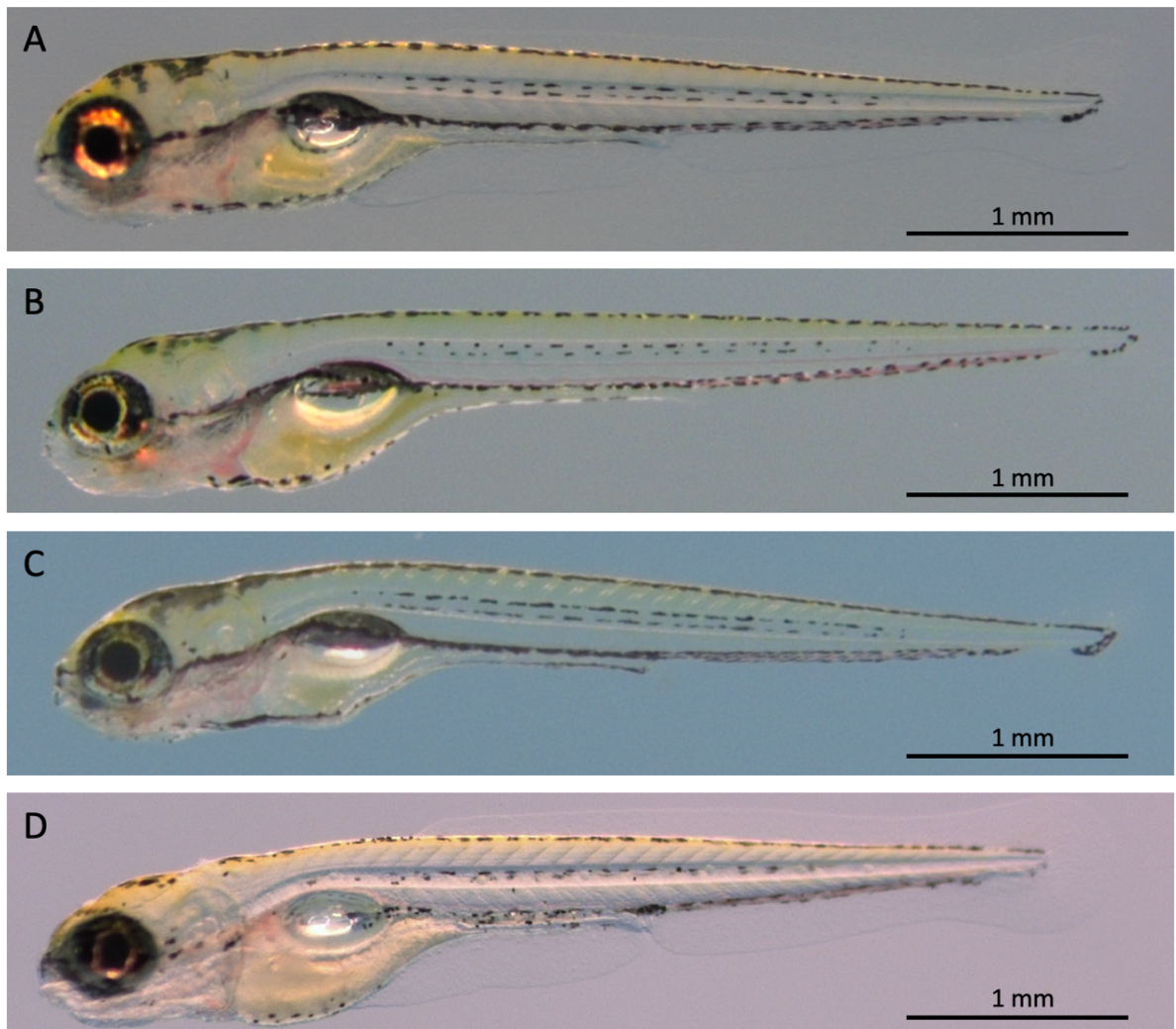
Die Wildtyp-Zebrafischlarve (120 hpf) reflektiert das physiologische Pigmentierungsmuster (Normopigmentierung) und somit den Phänotyp der ersten von drei Kontrollgruppen des Experiments. In der lateralen Perspektive zeigt sich eine deutliche Pigmentierung in allen Körperregionen, insbesondere um die Schwimmblase und in den kranialen, dorsalen und ventralen Arealen (siehe Abbildung 9A). Sie erscheint kräftig, homogen, regelmäßig und orientiert sich an gegebenen anatomischen Strukturen. In der kranialen Perspektive imponiert eine ringförmige Anordnung der Melanophoren, die sich nach kaudal verengt und strangförmig fortsetzt (siehe Abbildung 10A). Die pigmentierten Zellen lassen sich in diesem Areal gut darstellen, da sich ihre Form, Färbung und Anordnung deutlich von den umliegenden Strukturen abhebt. Sie zeigen beim Wildtyp eine homogenes Bild hinsichtlich ihrer Form, Verteilung, Größe und Farbe.

Der mit dem Co-Mo behandelte Zebrafisch diente als zweite Kontrollgruppe und zeigt in der lateralen Perspektive (siehe Abbildung 9B) ein nahezu mit dem Wildtyp identisches Pigmentierungsmuster. Die Melanophoren weisen in den kranialen, dorsalen und ventralen Arealen eine regelmäßige Anordnung und homogene Verteilung auf. Sie lassen sich in der kranialen Perspektive gut voneinander abgrenzen und sind hinsichtlich ihrer Größe, Farbe und Form gleichmäßig ausgebildet (siehe Abbildung 10B).

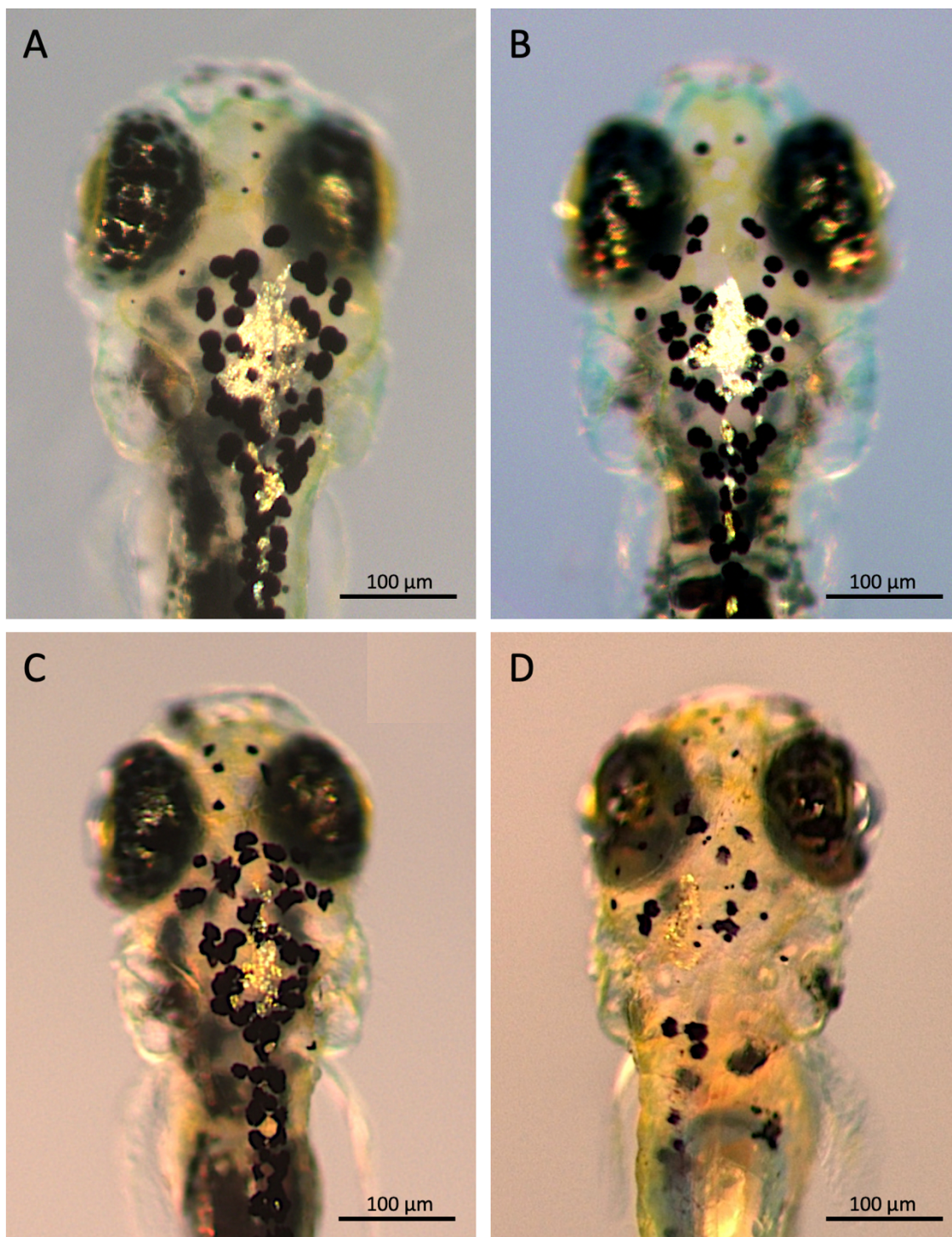
Der 5-MP-Mo stellt die spezifischste der drei Kontrollen dar. In der lateralen Ansicht zeigen sich im Vergleich zum Wildtyp und Co-Mo keine Pigmentierungsabweichungen (siehe Abbildung 9C). Auch sind keine Effekt auf Form, Größe und Farbe der Melanophoren zu erkennen.

Im Vergleich zu den drei zuvor beschriebenen Kontrollgruppen imponieren die mit dem *ncstn*-MO behandelten Zebrafische durch eine deutliche Hypopigmentierung. In der lateralen Perspektive ist die physiologische Orientierung der Melanophoren entlang anatomischer Strukturen und ihre regelmäßige Anordnung aufgehoben (siehe Abbildung 9D). Besonders ausgeprägt ist die Hypopigmentierung in den kranialen und ventralen Arealen, ebenso wie an der Schwimmblase, wo sie fast gänzlich aufgehoben ist. In der kranialen Perspektive wird der Verlust der typischen ringförmigen Anordnung mit ihrem schmalen Ausläufern nach kaudal deutlich (siehe Abbildung 10D). Darüber hinaus findet sich eine untypische Lokalisation der

Melanophoren in den kranialen Segmenten. Des Weiteren ist die Anzahl der Melanophoren vermindert, und es zeigen sich Unterschiede bezüglich Form und Größe der Zellen.



**Abbildung 9: MO-vermittelter *ncstn*-Knockdown im Zebrafisch.** Dargestellt sind vier Zebrafische 120 hpf in lateraler Perspektive mit Skalierung. (A) Wildtyp; (B) Injektion von Co-MO; (C) Injektion von 5-MP-MO; (D) Injektion von *ncstn*-MO.

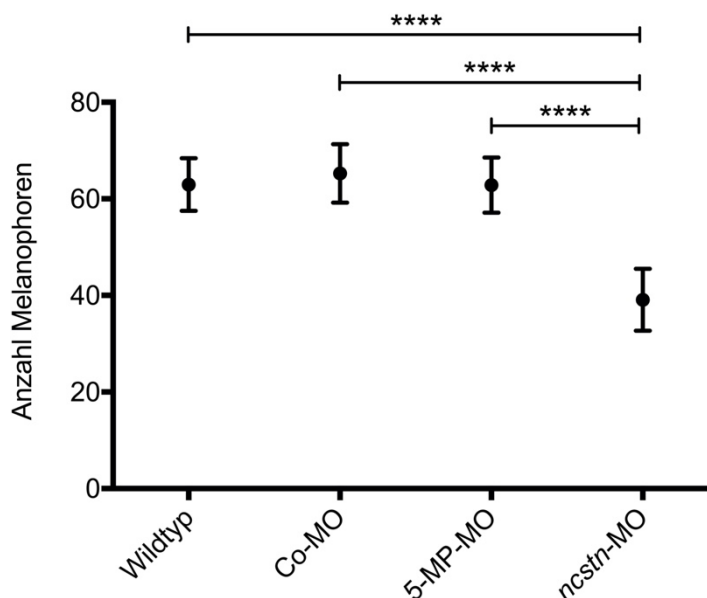


**Abbildung 10: MO-vermittelter *ncstn*-Knockdown im Zebrafisch.** Dargestellt sind vier Zebrafische 120 hpf in kranialer Perspektive mit Skalierung. (A) Wildtyp; (B) Injektion von Co-MO; (C) Injektion von 5-MP-MO; (D) Injektion von *ncstn*-MO.

### 3.1.2 Statistische Auswertung

Die in 3.1.1 phänotypisch miteinander verglichenen Gruppen wurden anschließend in einem definierten kranialen Areal bezüglich der Melanophoren-Anzahl untersucht (siehe Sektion 2.2.7.1) und statistisch ausgewertet (siehe Abbildung 11). Sowohl der Wildtyp (Mittelwert, MW

62,95), als auch der Co-MO (MW 65,25) und 5-MP-MO (MW 62,85) wiesen mehr als 60 Melanophoren auf. Beim *ncstn*-MO hingegen fanden sich im Mittel 39,10 pigmentierte Zellen, und somit im Vergleich zu den drei Kontrollgruppen eine vierfach signifikante Reduktion der Melanophoren ( $p < 0,0001$ ).



**Abbildung 11: Statistische Auswertung der Melanophoren-Anzahl nach MO-vermitteltem *ncstn*-Knockdown im Zebrafisch.** Auf der X-Achse dargestellt sind die vier miteinander verglichenen Gruppen (n = 20 pro Gruppe). Auf der Y-Achse dargestellt ist die Anzahl der Melanophoren im definierten kranialen Bereich der jeweiligen Gruppe als Mittelwert mit Standardabweichung. Vierfach signifikante Reduktion der Melanophoren ( $p < 0,0001$ ) beim *ncstn*-MO.

## 3.2 Phänotypreversion der MO-vermittelten Hypopigmentierung durch *ncstn*-RNA-Ko-Injektion

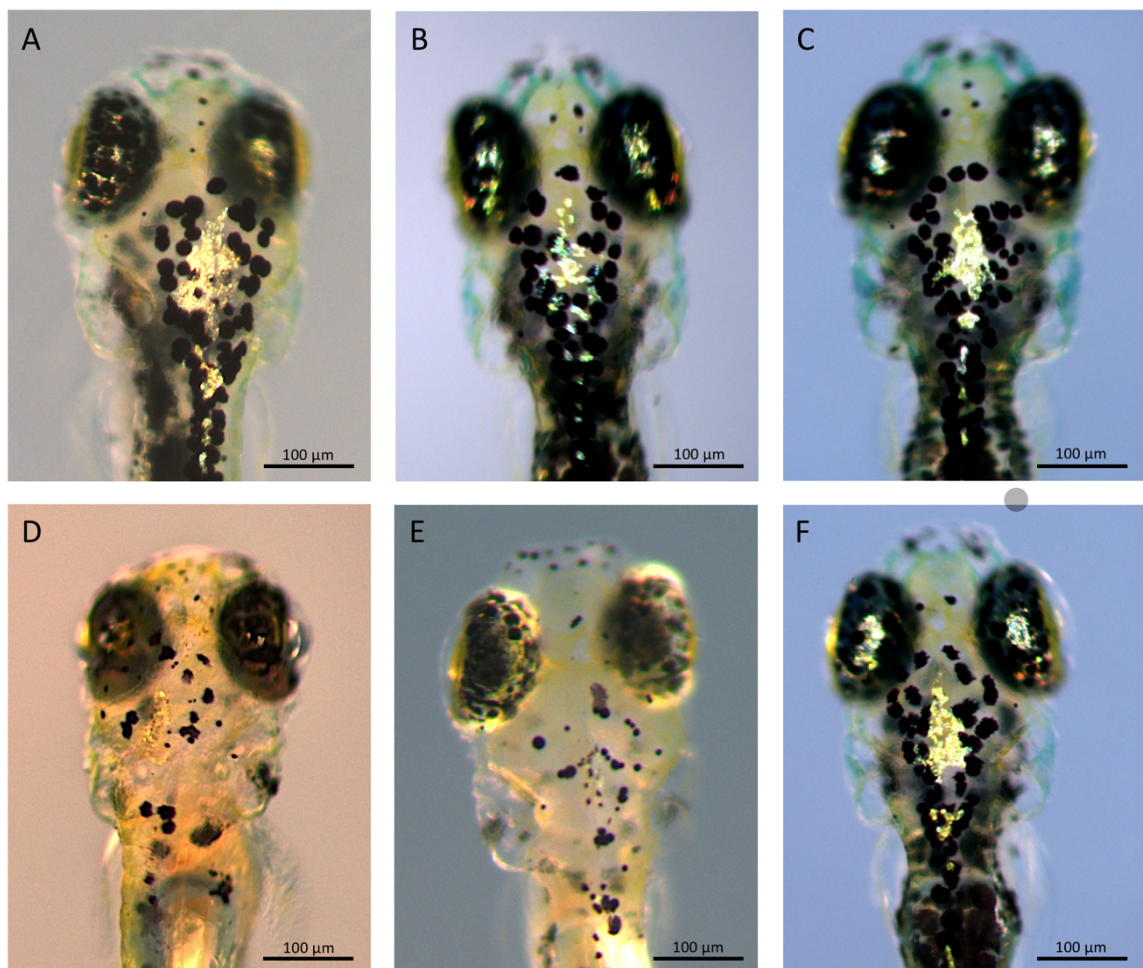
### 3.2.1 Phänotypen

Nach alleiniger Injektion von *ncstn*-RNA (vom Zebrafisch) zeigte sich eine vom Phänotyp des Wildtyps nicht zu unterscheidende regelhafte und ringförmige Anordnung der Melanophoren im kranialen Bereich (siehe Abbildung 12B). Auch deren Form, Größe und Färbung wiesen keine Unterschiede zu denen des Wildtyps auf.

Ebenso fand sich nach Ko-Injektion von *ncstn*-RNA und 5-MP-MO ein physiologisches Pigmentierungsmuster mit regelhaften Melanophoren (siehe Abbildung 12C).

Die Ko-Injektion von *ncstn*-Mo und GFP-RNA bewirkte eine Hypopigmentierung, die dem Phänotyp des Morpholino-vermittelten *ncstn*-Knockdowns entsprach (siehe Abbildung 12E). Die Melanophoren wiesen unterschiedliche Größen und Formen auf, ihre unter physiologischen Bedingungen ringförmige Anordnung war in der kranialen Perspektive nur angedeutet erkennbar.

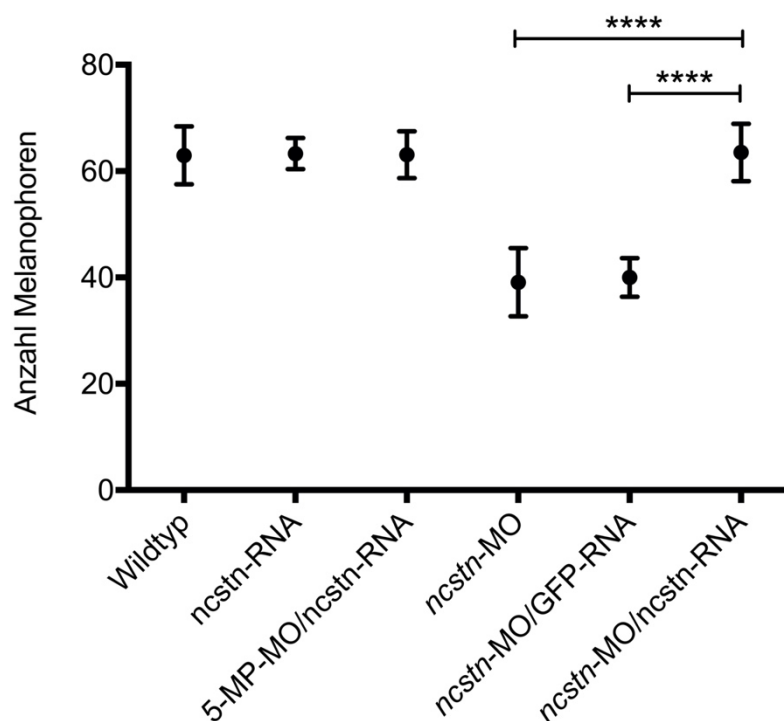
Im letzten Schritt erfolgte die Ko-Injektion von *ncstn*-Mo und *ncstn*-RNA. Phänotypisch zeigte sich in der kranialen Perspektive die physiologische ringförmige Anordnung der Melanophoren. Diese waren in ihrer Form, Größe und Farbe regelhaft und nicht vom Wildtyp zu unterscheiden (siehe Abbildung 12F).



**Abbildung 12: Phänotypreversion mit *ncstn*-RNA im Zebrafisch.** Dargestellt sind sechs Zebrafische 120 hpf in kranialer Perspektive mit Skalierung. (A) Wildtyp; (B) Injektion von *ncstn*-RNA; (C) Ko-Injektion von 5-MP-MO und *ncstn*-RNA; (D) Injektion von *ncstn*-MO; (E) Ko-Injektion von *ncstn*-MO und GFP-RNA; (F) Ko-Injektion *ncstn*-MO und *ncstn*-RNA.

### 3.2.2 Statistische Auswertung

Sowohl die Wildtyp-Fische (MW 62,95), als auch die mittels Injektion von *ncstn*-RNA (MW 63,3) und 5-MP-MO/*ncstn*-RNA (MW 63,1) behandelten Zebrafische wiesen im Messareal im Mittel mehr als 60 Melanophoren auf. Hingegen fand sich im Vergleich dazu nach Injektion des *ncstn*-MO (MW 39,1) und auch nach Ko-Injektion von *ncstn*-MO/GFP-RNA (40,0) eine deutliche Abnahme der Melanophorenzahl. Diese Verminderung konnte durch die Ko-Injektion von *ncstn*-MO/*ncstn*-RNA (MW 63,5) vierfach signifikant revertiert werden ( $p < 0,0001$ ). Diese erfolgreiche Reversion nach Injektion von *ncstn*-RNA wurde auch durch die Ergebnisse der statistischen Auswertung bestätigt (siehe Abbildung 13).



**Abbildung 13: Statistische Auswertung der Melanophoren-Anzahl nach Phänotypreversion mittels *ncstn*-RNA im Zebrafisch.** Auf der X-Achse dargestellt sind die sechs miteinander verglichenen Gruppen ( $n = 20$  beim Wildtyp und *ncstn*-MO; jeweils  $n = 10$  für die Injektionen mit *ncstn*-RNA, 5-MP-MO/*ncstn*-RNA, *ncstn*-MO/GFP-RNA und *ncstn*-MO/*ncstn*-RNA). Auf der Y-Achse dargestellt ist die Anzahl der Melanophoren im definierten kranialen Bereich der jeweiligen Gruppe als Mittelwert mit Standardabweichung. Nach Ko-Injektion von *ncstn*-MO und *ncstn*-RNA konnte die Anzahl der Melanophoren wieder auf das Niveau des Wildtyps zurückgeführt werden.

### 3.3 Phänotypreversion der MO-vermittelten Hypopigmentierung durch NCSTN-RNA-Ko-Injektion

#### 3.3.1 Phänotypen

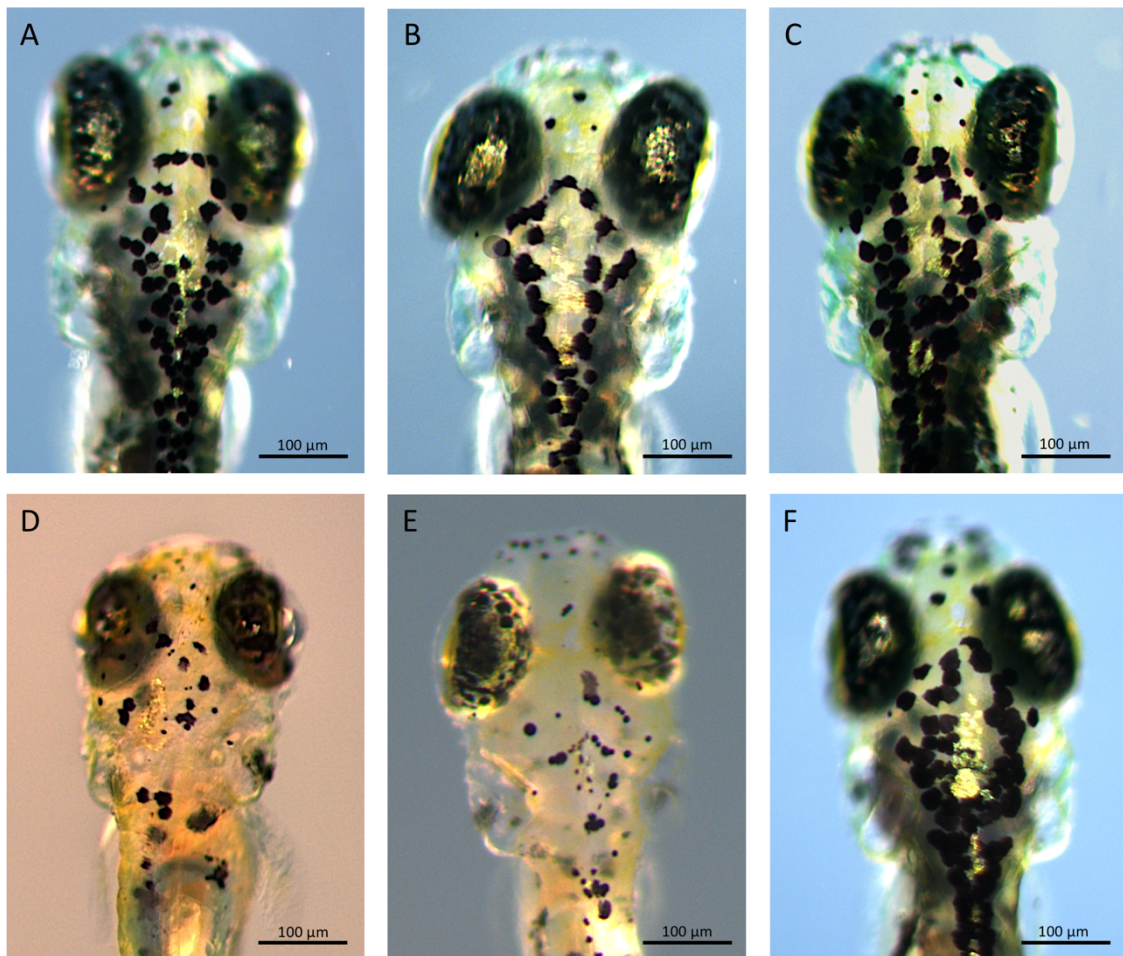
Wie bei den zuvor dargestellten Phänotypreversionsexperimenten mit Ko-Injektion von *ncstn*-RNA zeigte sich nach alleiniger Injektion humaner NCSTN-RNA eine vom Phänotyp des Wildtyps nicht zu unterscheidende regelhafte und ringförmige Anordnung der Melanophoren im kranialen Bereich (siehe Abbildung 14B). Ebenso wiesen auch deren Form, Größe und Färbung keine Unterschiede zu denen des Wildtyps auf.

In Analogie hierzu fand sich nach Ko-Injektion von NCSTN-RNA und 5-MP-MO ein physiologisches Pigmentierungsmuster mit regelhaften Melanophoren (siehe Abbildung 14C).

Auch in dieser Versuchsreihe bewirkte die Ko-Injektion von *ncstn*-MO und GFP-RNA eine Hypopigmentierung, die dem Phänotyp des Morpholino-vermittelten *ncstn*-Knockdowns entsprach (siehe Abbildung 14E). Die Melanophoren wiesen unterschiedliche Größen und Formen auf, ihre unter physiologischen Bedingungen ringförmige Anordnung war in der kranialen Perspektive nur angedeutet erkennbar.

Im letzten Schritt erfolgte die Ko-Injektion von *ncstn*-MO und NCSTN-RNA. Phänotypisch zeigte sich in der kranialen Perspektive die physiologische ringförmige Anordnung der Melanophoren. Diese waren in ihrer Form, Größe und Farbe regelhaft und nicht vom Wildtyp zu unterscheiden (siehe Abbildung 14F).

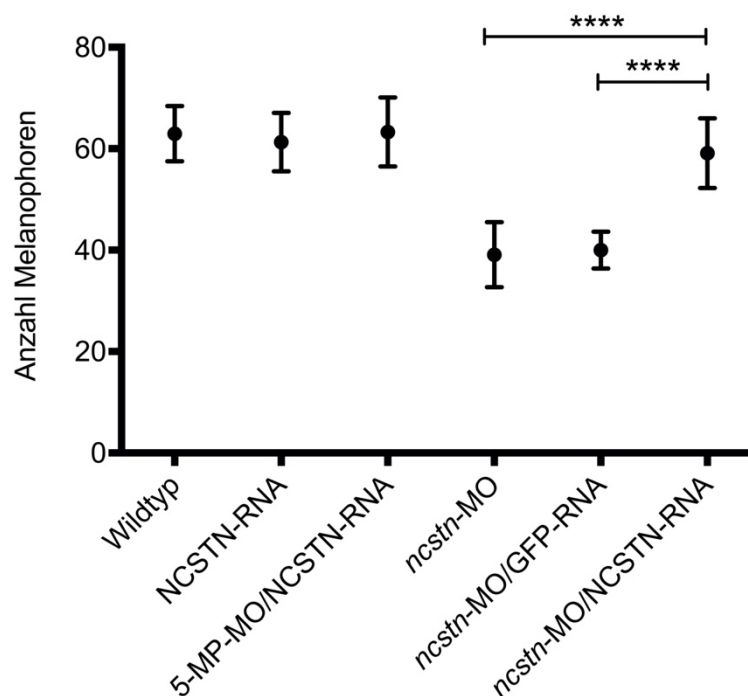




**Abbildung 14: Phänotypversion mit humaner NCSTN-RNA im Zebrafisch.** Dargestellt sind sechs Zebrafische 120 hpf in kranialer Perspektive mit Skalierung. (A) Wildtyp; (B) Injektion von NCSTN-RNA; (C) Ko-Injektion von 5-MP-MO und NCSTN-RNA; (D) Injektion von *ncstn*-MO; (E) Ko-Injektion von *ncstn*-MO und GFP-RNA; (F) Ko-Injektion von *ncstn*-MO und NCSTN-RNA.

### 3.3.2 Statistische Auswertung

Sowohl die Wildtyp-Fische (MW 62,95), als auch die mittels Injektion humaner NCSTN-RNA (MW 61,3) und 5-MP-MO/NCSTN-RNA (MW 63,3) behandelten Zebrafische wiesen im Messareal im Mittel mehr als 60 Melanophoren auf. Hingegen fand sich im Vergleich dazu nach Injektion des *ncstn*-MO (MW 39,1) und auch nach Ko-Injektion von *ncstn*-MO/GFP-RNA (40,0) eine deutliche Abnahme der Melanophorenzahl. Diese Verminderung konnte durch die Ko-Injektion von *ncstn*-MO/NCSTN-RNA (MW 59,1) vierfach signifikant revertiert werden ( $p < 0,0001$ ) (siehe Abbildung 15).



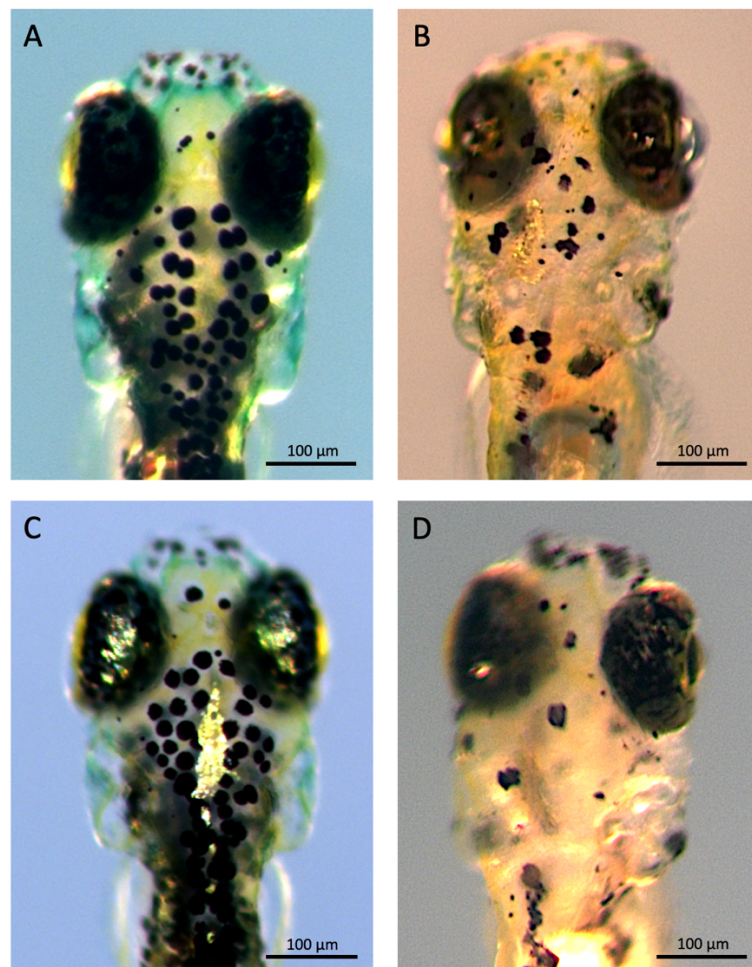
**Abbildung 15: Statistische Auswertung der Melanophoren-Anzahl nach Phänotypreversion mittels humaner NCSTN-RNA im Zebrafisch.** Auf der X-Achse dargestellt sind die sechs miteinander verglichenen Gruppen ( $n = 20$  beim Wildtyp und *ncstn*-MO; jeweils  $n = 10$  für die Injektionen mit NCSTN-RNA, 5-MP-MO/NCSTN-RNA, *ncstn*-MO/GFP-RNA und *ncstn*-MO/NCSTN-RNA). Auf der Y-Achse dargestellt ist die Anzahl der Melanophoren im definierten kranialen Bereich der jeweiligen Gruppe als Mittelwert mit Standardabweichung. Nach Ko-Injektion von *ncstn*-MO und humaner NCSTN-RNA konnte die Anzahl der Melanophoren wieder auf das Niveau des Wildtyps zurückgeführt werden.

### 3.4 Phänotypreversion der MO-vermittelten Hypopigmentierung durch Behandlung mit mutierter NCSTN-RNA

Die vier zuvor in Tabelle 11 beschriebenen humanen *NCSTN*-Mutationen wurden *in vitro* kloniert. Nachfolgend wurde die jeweils durch IVT synthetisierte mutationstragende RNA in *ncstn*-MO-behandelte Zebrafischembryonen ko-injiziert (siehe Sektion 2.2.6.5).

#### 3.4.1 Phänotyp nach Behandlung mit *NCSTN*-Mutation c.497C>A

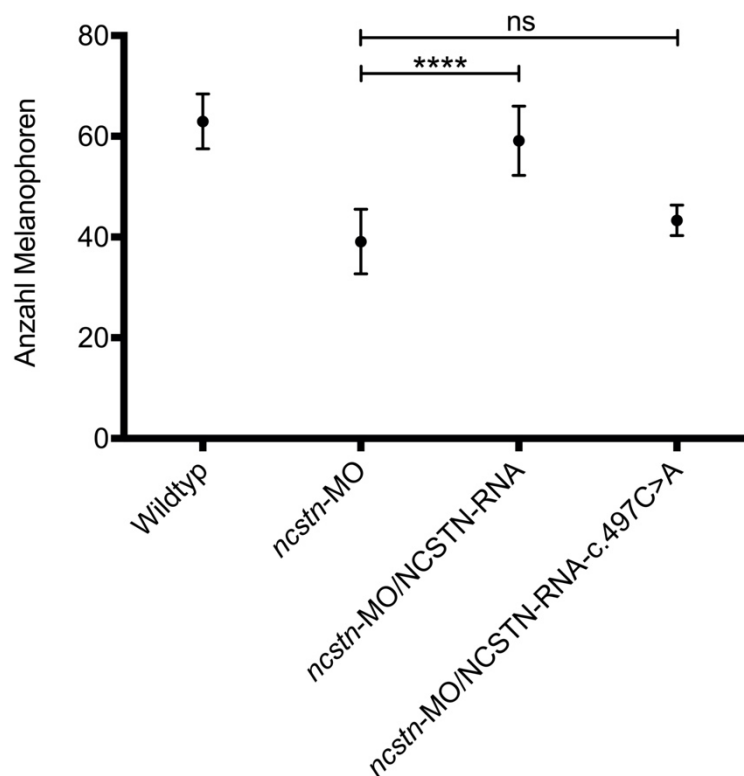
Nach Behandlung der Zebrafischembryonen mittels Ko-Injektion von *ncstn*-MO/NCSTN-RNA-c.497C>A fand sich eine Hypopigmentierung, die der des Phänotyps des MO-vermittelten *ncstn*-Knockdowns entsprach (Abbildung 16D). Die Melanophoren wiesen unterschiedliche Größen und Formen sowie eine variable Färbung auf. Das physiologische Distributionsmuster der Zellen mit normalerweise ringförmiger Anordnung war aufgehoben.



**Abbildung 16: Behandlung der *ncstn*-MO-Zebrafischembryonen mit NCSTN-RNA-c.497C>A.** Dargestellt sind vier Zebrafische 120 hpf in kranialer Perspektive mit Skalierung. (A) Wildtyp; (B) Injektion von *ncstn*-MO; (C) Ko-Injektion von *ncstn*-MO und NCSTN-RNA; (D) Ko-Injektion von *ncstn*-MO und NCSTN-RNA-c.497C>A.

#### 3.4.1.1 Statistische Auswertung

Die Wildtyp-Fische wiesen im Messareal gemittelt mehr als 60 Melanophoren auf (MW 62,95). Hingegen fand sich nach Injektion des *ncstn*-MO eine deutliche Abnahme der Melanophorenzahl (MW 39,1). Diese Verminderung konnte durch die Ko-Injektion von *ncstn*-MO/NCSTN-RNA vierfach signifikant revertiert werden (MW 63,5;  $p < 0,0001$ ). Im Gegensatz hierzu wiesen die Fische nach Ko-Injektion von *ncstn*-MO/NCSTN-RNA-c.497C>A eine Hypopigmentierung auf, die auch numerisch durch eine deutliche Abnahme der Melanophorenzahl (MW 43,3) reflektiert wurde (siehe Abbildung 17).

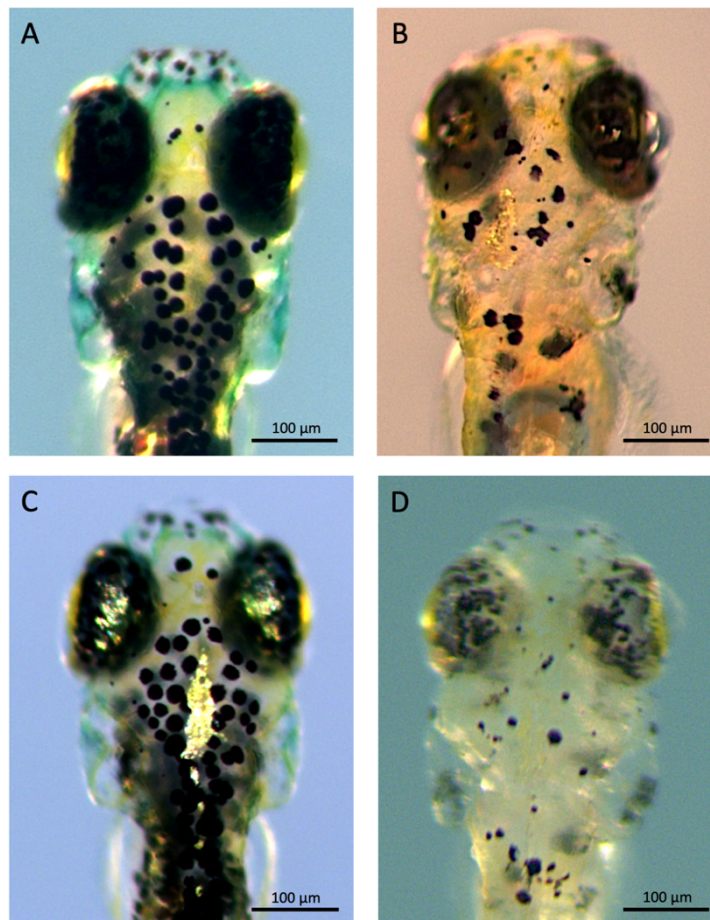


**Abbildung 17: Statistische Auswertung der Melanophoren-Anzahl nach Behandlung mit NCSTN-RNA-c.497C>A.** Auf der X-Achse dargestellt sind die vier miteinander verglichenen Gruppen (n = 20 beim Wildtyp und *ncstn*-MO; jeweils n = 10 für die Injektionen mit *ncstn*-MO/NCSTN-RNA und *ncstn*-MO/NCSTN-RNA-c.497C>A). Auf der Y-Achse dargestellt ist die Anzahl der Melanophoren im definierten kranialen Bereich der jeweiligen Gruppe als Mittelwert mit Standardabweichung. Nach Ko-Injektion von *ncstn*-MO und NCSTN-RNA konnte die Anzahl der Melanophoren wieder auf das Niveau des Wildtyps zurückgeführt werden, während dies mittels Ko-Injektion von *ncstn*-MO/NCSTN-RNA-c.497C>A nicht gelang.

### 3.4.2 Phänotyp nach Behandlung mit NCSTN-Mutation c.278delC

#### 3.4.2.1 Phänotypen

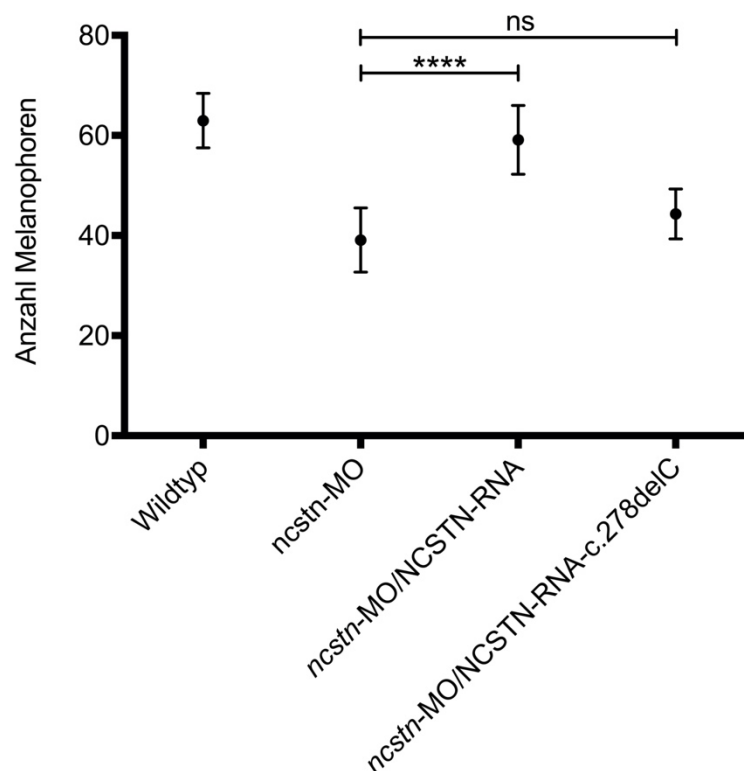
Nach Behandlung der Zebrafischembryonen mittels Ko-Injektion von *ncstn*-MO/NCSTN-RNA-c.278delC fand sich eine Hypopigmentierung, die der des Phänotyps des MO-vermittelten *ncstn*-Knockdowns entsprach (siehe Abbildung 18D). Die Melanophoren wiesen unterschiedliche Größen und Formen sowie eine variable Färbung auf. Das physiologische Distributionsmuster der Zellen mit normalerweise ringförmiger Anordnung war aufgehoben.



**Abbildung 18: Behandlung der *ncstn*-MO-Zebrafischembryonen mit NCSTN-RNA-c.278delC.** Dargestellt sind vier Zebrafische 120 hpf in kranialer Perspektive mit Skalierung. (A) Wildtyp; (B) Injektion von *ncstn*-MO; (C) Ko-Injektion von *ncstn*-MO und NCSTN-RNA; (D) Ko-Injektion von *ncstn*-MO und NCSTN-RNA-c.278delC.

#### 3.4.2.2 Statistische Auswertung

Die Wildtyp-Fische wiesen im Messareal gemittelt mehr als 60 Melanophoren auf (MW 62,95). Hingegen fand sich nach Injektion des *ncstn*-MO eine deutliche Abnahme der Melanophorenzahl (MW 39,1). Diese Verminderung konnte durch die Ko-Injektion von *ncstn*-MO/NCSTN-RNA vierfach signifikant revertiert werden (MW 59,1;  $p < 0,0001$ ). Im Gegensatz hierzu wiesen die Fische nach Ko-Injektion von *ncstn*-MO/NCSTN-RNA-c.278delC eine Hypopigmentierung auf, die auch numerisch durch eine deutliche Abnahme der Melanophorenzahl (MW 44,3) reflektiert wurde (siehe Abbildung 19).

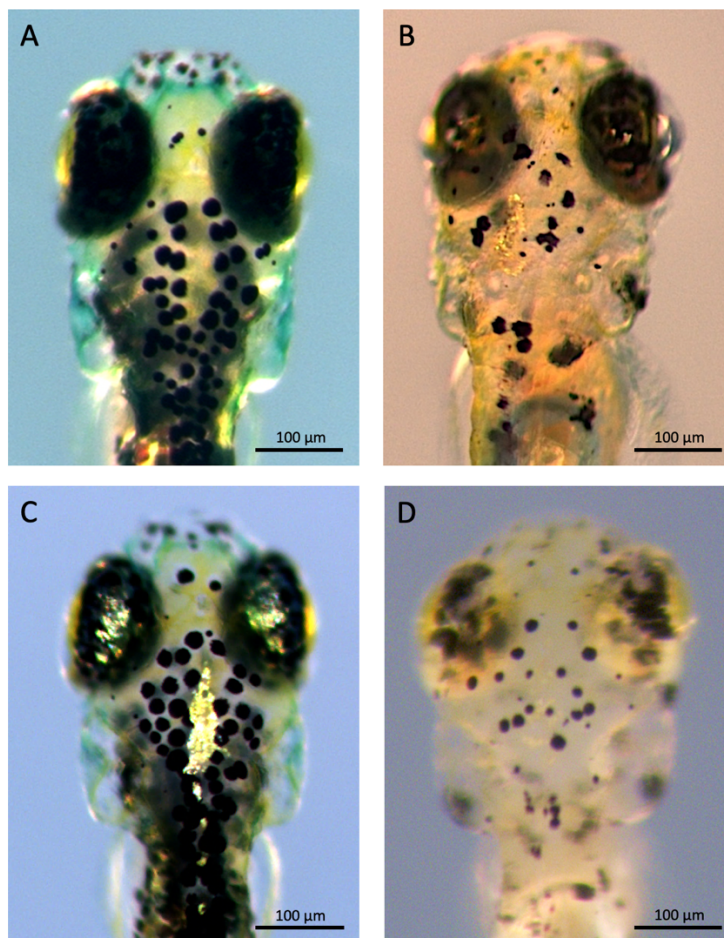


**Abbildung 19: Statistische Auswertung der Melanophoren-Anzahl nach Behandlung mit NCSTN-RNA-c.278delC.** Auf der X-Achse dargestellt sind die vier miteinander verglichenen Gruppen (n = 20 beim Wildtyp und *ncstn*-MO; jeweils n = 10 für die Injektionen mit *ncstn*-MO/NCSTN-RNA und *ncstn*-MO/NCSTN-RNA-c.278delC). Auf der Y-Achse dargestellt ist die Anzahl der Melanophoren im definierten kranialen Bereich der jeweiligen Gruppe als Mittelwert mit Standardabweichung. Nach Ko-Injektion von *ncstn*-MO und NCSTN-RNA konnte die Anzahl der Melanophoren wieder auf das Niveau des Wildtyps zurückgeführt werden, während dies mittels Ko-Injektion von *ncstn*-MO/NCSTN-RNA-c.278delC nicht gelang.

### 3.4.3 Phänotyp nach Behandlung mit NCSTN-Mutation c.1101+1G>A

#### 3.4.3.1 Phänotypen

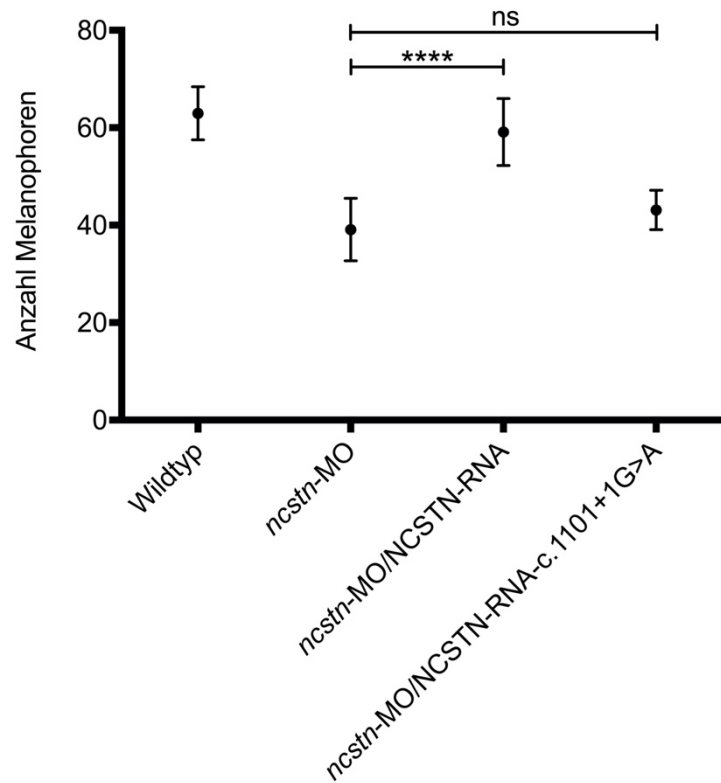
Nach Behandlung der Zebrafischembryonen mittels Ko-Injektion von *ncstn*-MO/NCSTN-RNA-c.1101+1G>A fand sich eine Hypopigmentierung, die der des Phänotyps des MO-vermittelten *ncstn*-Knockdowns entsprach (siehe Abbildung 20D). Die Melanophoren wiesen unterschiedliche Größen und Formen sowie eine variable Färbung auf. Das physiologische Distributionsmuster der Zellen mit normalerweise ringförmiger Anordnung war aufgehoben.



**Abbildung 20: Behandlung der *ncstn*-MO-Zebrafischembryonen mit NCSTN-RNA-c.1101+1G>A.** Dargestellt sind vier Zebrafische 120 hpf in kranialer Perspektive mit Skalierung. (A) Wildtyp; (B) Injektion von *ncstn*-MO; (C) Ko-Injektion von *ncstn*-MO und NCSTN-RNA; (D) Ko-Injektion von *ncstn*-MO und NCSTN-RNA-c.1101+1G>A.

#### 3.4.3.2 Statistische Auswertung

Die Wildtyp-Fische wiesen im Messareal gemittelt mehr als 60 Melanophoren auf (MW 62,95). Hingegen fand sich nach Injektion des *ncstn*-MO eine deutliche Abnahme der Melanophorenzahl (MW 39,1). Diese Verminderung konnte durch die Ko-Injektion von *ncstn*-MO/NCSTN-RNA vierfach signifikant revertiert werden (MW 59,1;  $p < 0,0001$ ). Im Gegensatz hierzu wiesen die Fische nach Ko-Injektion von *ncstn*-MO/NCSTN-RNA-c.1101+1G>A eine Hypopigmentierung auf, die auch numerisch durch eine deutliche Abnahme der Melanophorenzahl (MW 43,1) reflektiert wurde (siehe Abbildung 21).



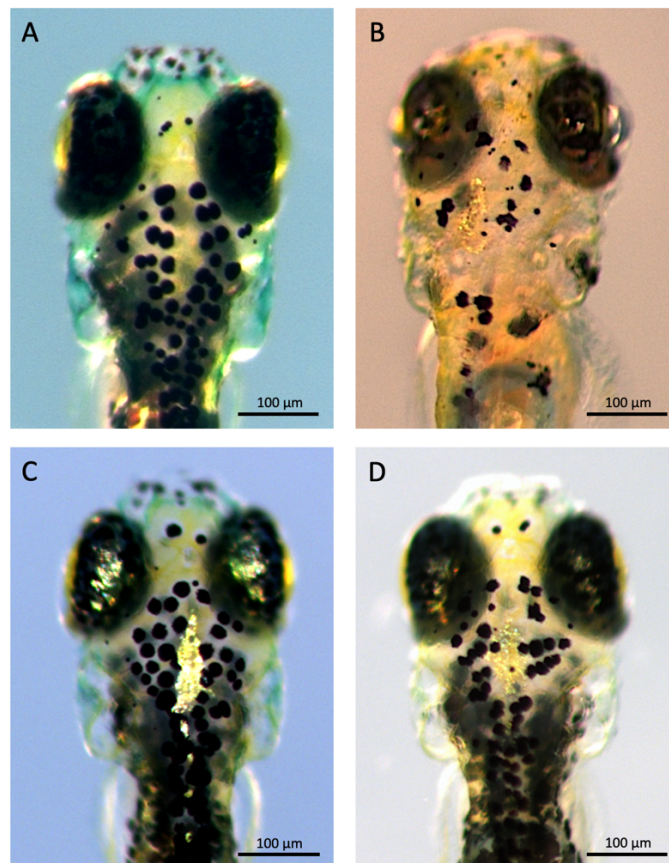
**Abbildung 21: Statistische Auswertung der Melanophoren-Anzahl nach Behandlung mit NCSTN-RNA-c.1101+1G>A.** Auf der X-Achse dargestellt sind die vier miteinander verglichenen Gruppen (n = 20 beim Wildtyp und *ncstrn*-MO; jeweils n = 10 für die Injektionen mit *ncstrn*-MO/NCSTN-RNA und *ncstrn*-MO/NCSTN-RNA-c.278delC). Auf der Y-Achse dargestellt ist die Anzahl der Melanophoren im definierten kranialen Bereich der jeweiligen Gruppe als Mittelwert mit Standardabweichung. Nach Ko-Injektion von *ncstrn*-MO und NCSTN-RNA konnte die Anzahl der Melanophoren wieder auf das Niveau des Wildtyps zurückgeführt werden, während dies mittels Ko-Injektion von *ncstrn*-MO/NCSTN-RNA-c.1101+1G>A nicht gelang.

### 3.4.4 Phänotyp nach Behandlung mit NCSTN-Mutation c.632C>G

#### 3.4.4.1 Phänotypen

Nach Behandlung der Zebrafischembryonen mittels Ko-Injektion von *ncstrn*-MO/NCSTN-RNA-c.632C>G fand sich eine normale Pigmentierung, die der des Wildtyps (siehe Abbildung 22D). Die Melanophoren wiesen eine physiologische Größe, Form und Färbung. Ebenso fand sich ein physiologisches Distributionsmuster der Zellen mit ringförmiger Anordnung.

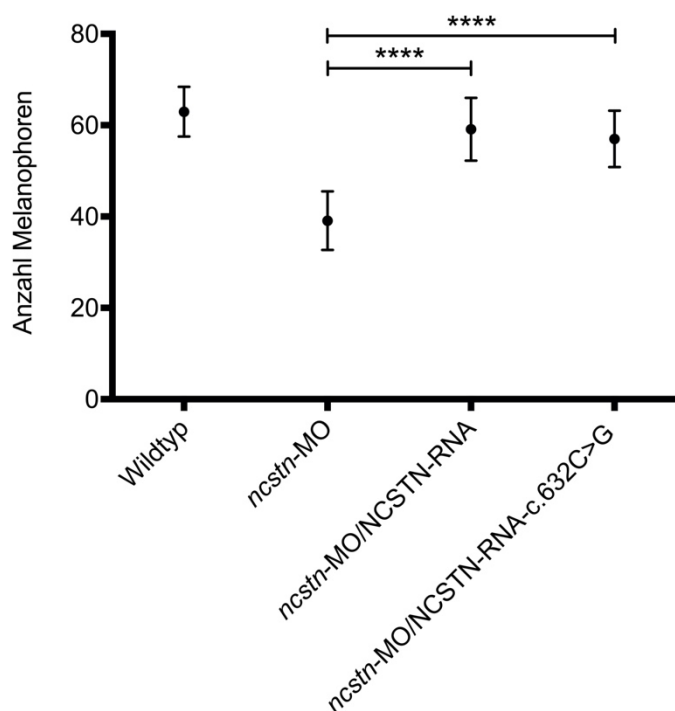




**Abbildung 22: Behandlung der *ncstn*-MO-Zebrafischembryonen mit NCSTN-RNA-c.632C>G.** Dargestellt sind vier Zebrafische 120 hpf in kranialer Perspektive mit Skalierung. (A) Wildtyp; (B) Injektion von *ncstn*-MO; (C) Ko-Injektion von *ncstn*-MO und NCSTN-RNA; (D) Ko-Injektion von *ncstn*-MO und NCSTN-RNA-c.632C>G.

#### 3.4.4.2 Statistische Auswertung

Die Wildtyp-Fische wiesen im Messareal gemittelt mehr als 60 Melanophoren auf (MW 62,95). Hingegen fand sich nach Injektion des *ncstn*-MO eine deutliche Abnahme der Melanophorenzahl (MW 39,1). Diese Verminderung konnte durch die Ko-Injektion von *ncstn*-MO/NCSTN-RNA vierfach signifikant revertiert werden (MW 59,1;  $p < 0,0001$ ). Nach der Ko-Injektion von *ncstn*-MO/NCSTN-RNA-c.632C>G wiesen die Fische wieder eine physiologische Pigmentierung auf, was auch durch eine vierfach signifikante Erhöhung der Melanophorenzahl (MW 57,0) reflektiert wurde (siehe Abbildung 23).



**Abbildung 23** Statistische Auswertung der Melanophoren-Anzahl nach Behandlung mit NCSTN-RNA-c.632C>G. Auf der X-Achse dargestellt sind die vier miteinander verglichenen Gruppen (n = 20 beim Wildtyp und *ncstn*-MO; jeweils n = 10 für die Injektionen mit *ncstn*-MO/NCSTN-RNA und *ncstn*-MO/NCSTN-RNA-c.632C>G). Auf der Y-Achse dargestellt ist die Anzahl der Melanophoren im definierten kranialen Bereich der jeweiligen Gruppe als Mittelwert mit Standardabweichung. Nach Ko-Injektion von *ncstn*-MO und NCSTN-RNA konnte die Anzahl der Melanophoren wieder auf das Niveau des Wildtyps zurückgeführt werden. Dies gelang auch durch Ko-Injektion von *ncstn*-MO/NCSTN-RNA-c.632C>G.

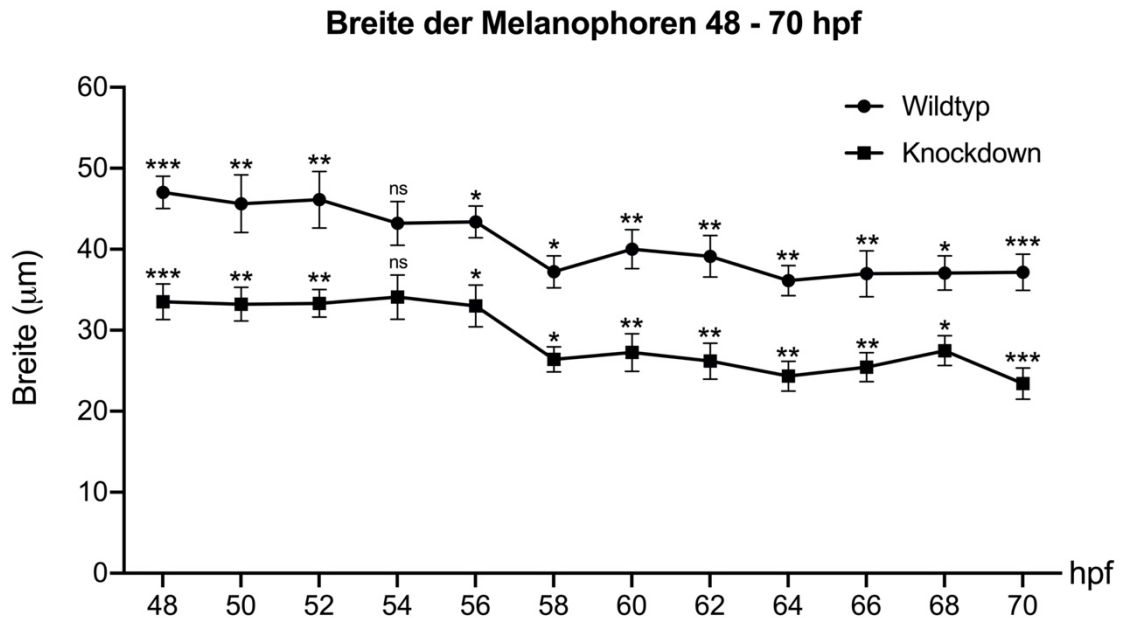
### 3.5 Morphologie der Melanophoren beim Wildtyp im Vergleich zum *ncstn*-Knockdown

Die Melanophoren des Wildtyp-Zebrafisches wiesen im Vergleich zu denen der mit dem MO-vermittelten *ncstn*-Knockdown behandelten Fische Unterschiede hinsichtlich der Breite, Länge und Flächenausdehnung auf. Die Variation der Zellmorphologie wurde in den Zebrafischembryonen im Zeitraum von jeweils 48 - 70 und 72 - 96 hpf untersucht und dokumentiert.

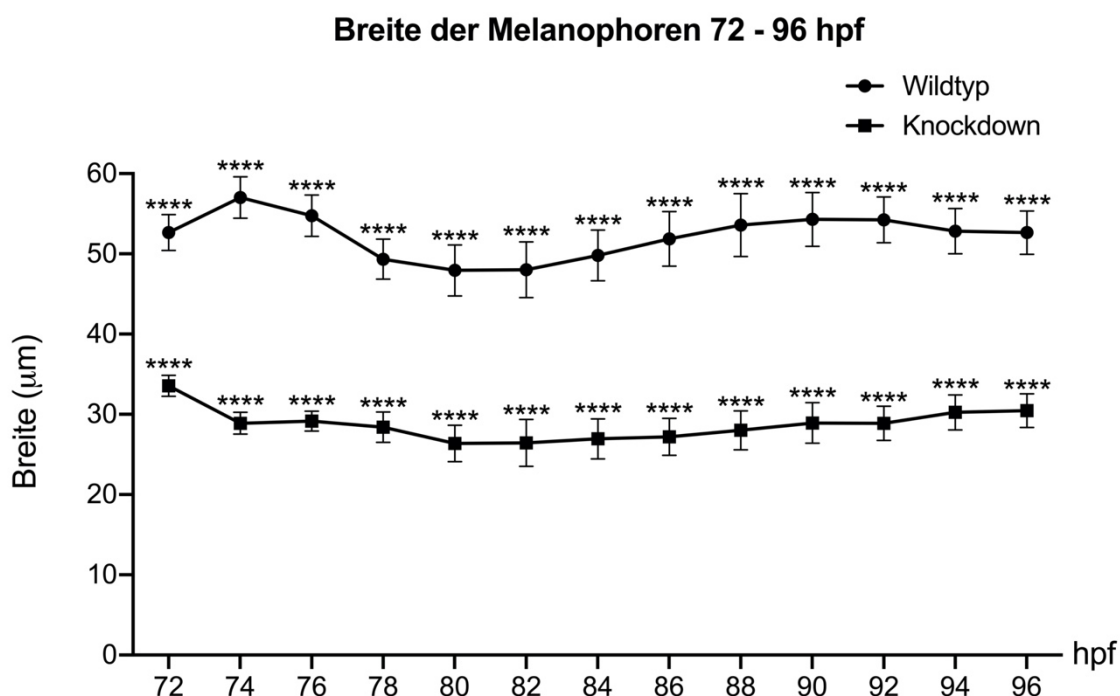
#### 3.5.1 Breite der Melanophoren

Die Breitenzunahme der Melanophoren verlief bei den Wildtyp-Zebrafischen und den Fischen, die mit dem MO-vermittelten *ncstn*-Knockdown behandelt worden waren, nahezu parallel. Die Unterschiede zwischen den beiden Gruppen wurden jedoch mit zunehmender Zeit immer

größer. Sie betragen im Zeitintervall von 48 - 70 hpf etwa 10  $\mu\text{m}$  (siehe Abbildung 24) und zwischen 72 - 96 hpf bis zu 25  $\mu\text{m}$  (siehe Abbildung 25).



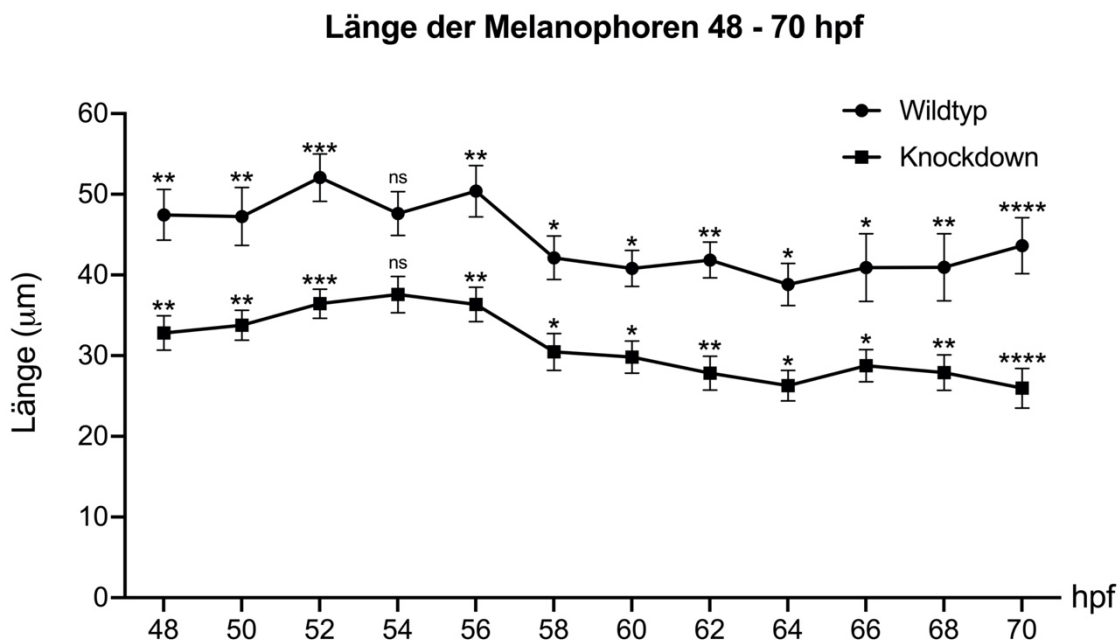
**Abbildung 24: Breite der Melanophoren des Wildtyps und *nctn*-Knockdowns im Zeitraum von 48 - 70 hpf.** Auf der X-Achse sind die jeweiligen Beobachtungszeitpunkte in hpf angegeben. Auf der Y-Achse ist die zum jeweiligen Zeitpunkt gemessene maximale Breite in  $\mu\text{m}$  angegeben. Bei allen Messungen wurden die Mittelwerte und Standardfehler sowie das Signifikanzniveau im Vergleich von Wildtyp zu *nctn*-Knockdown kalkuliert.  $p > 0,05$  - nicht signifikant (ns);  $p < 0,05$  - \*;  $p < 0,01$  - \*\*;  $p < 0,001$  - \*\*\*



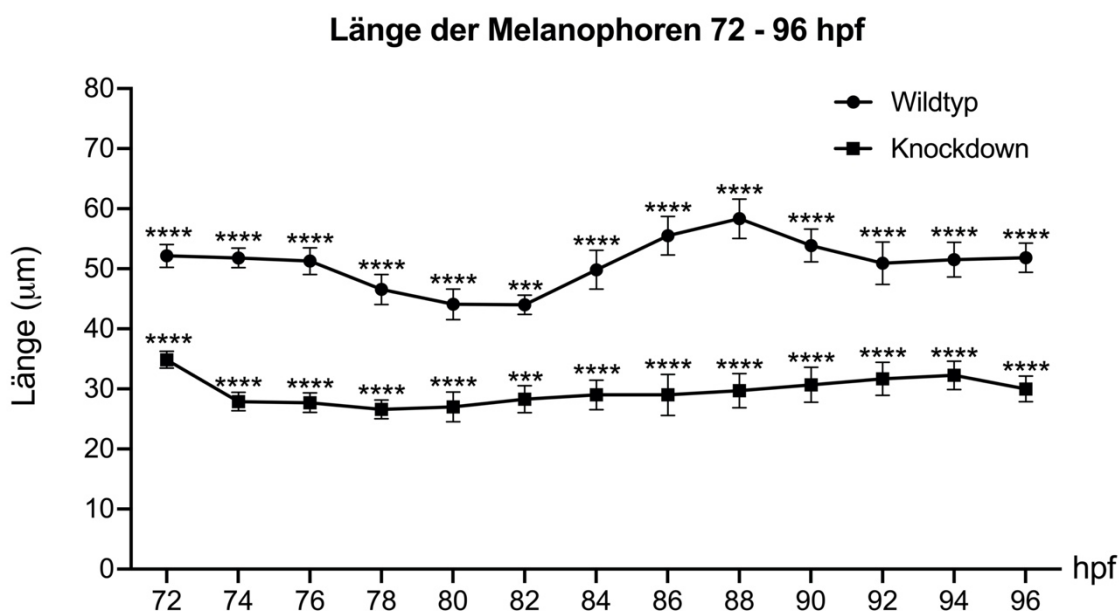
**Abbildung 25: Breite der Melanophoren des Wildtyps und *nctn*-Knockdowns im Zeitraum von 72 - 96 hpf.** Auf der X-Achse sind die jeweiligen Beobachtungszeitpunkte in hpf angegeben. Auf der Y-Achse ist die zum jeweiligen Zeitpunkt gemessene maximale Breite in  $\mu\text{m}$  angegeben. Bei allen Messungen wurden die Mittelwerte und Standardfehler sowie das Signifikanzniveau im Vergleich von Wildtyp zu *nctn*-Knockdown kalkuliert.  $p < 0,0001$  - \*\*\*\*

### 3.5.2 Zelllänge der Melanophoren

Die Längenzunahme der Melanophoren verlief bei den Wildtyp-Zebrafischen und den Fischen, die mit dem MO-vermittelten *nctn*-Knockdown behandelt worden waren, ebenfalls nahezu parallel. Die Unterschiede zwischen den beiden Gruppen wurden jedoch mit zunehmender Zeit immer größer. Sie betragen im Zeitintervall von 48 - 70 hpf etwa  $15 \mu\text{m}$  (siehe Abbildung 26) und zwischen 72 - 96 hpf bis zu  $20 \mu\text{m}$  (siehe Abbildung 27).



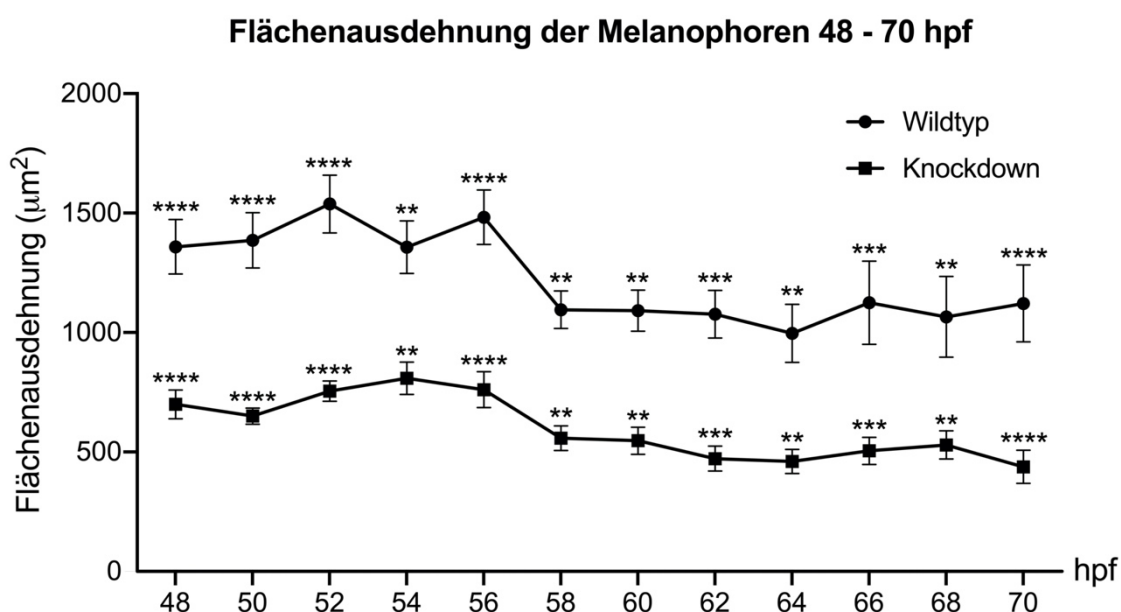
**Abbildung 26: Länge der Melanophoren des Wildtyps und *ncstn*-Knockdowns im Zeitraum von 48 - 70 hpf.** Auf der X-Achse sind die jeweiligen Beobachtungszeitpunkte in hpf angegeben. Auf der Y-Achse ist die zum jeweiligen Zeitpunkt gemessene maximale Breite in  $\mu\text{m}$  angegeben. Bei allen Messungen wurden die Mittelwerte und Standardfehler sowie das Signifikanzniveau im Vergleich von Wildtyp zu *ncstn*-Knockdown kalkuliert.  $p > 0,05$  - nicht signifikant (ns);  $p < 0,05$  - \*;  $p < 0,01$  - \*\*;  $p < 0,001$  - \*\*\*;  $p < 0,0001$  - \*\*\*\*



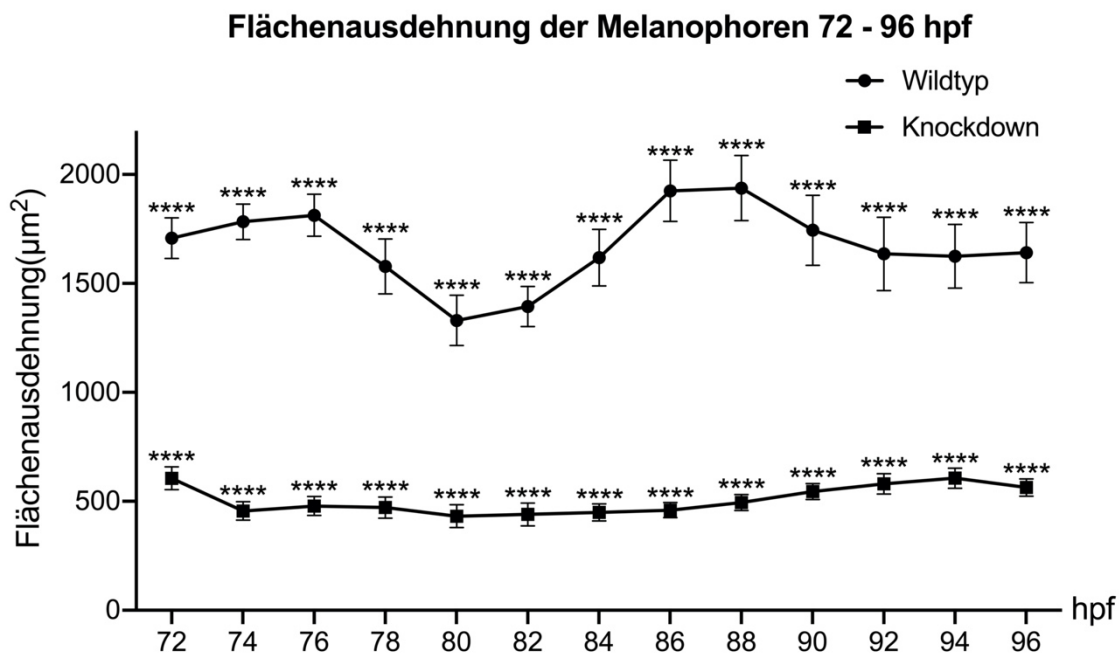
**Abbildung 27: Länge der Melanophoren des Wildtyps und *ncstn*-Knockdowns im Zeitraum von 72 - 96 hpf.** Auf der X-Achse sind die jeweiligen Beobachtungszeitpunkte in hpf angegeben. Auf der Y-Achse ist die zum jeweiligen Zeitpunkt gemessene maximale Breite in  $\mu\text{m}$  angegeben. Bei allen Messungen wurden die Mittelwerte und Standardfehler sowie das Signifikanzniveau im Vergleich von Wildtyp zu *ncstn*-Knockdown kalkuliert.  $p < 0,001$  - \*\*\*;  $p < 0,0001$  - \*\*\*\*

### 3.5.3 Flächenausdehnung der Melanophoren

Die Flächenausdehnung der Melanophoren war bei den Wildtyp-Zebrafischen und den Fischen, die mit dem MO-vermittelten *ncstn*-Knockdown behandelt worden waren, in den ersten 24 hpf etwa identisch (nicht graphisch dargestellt), veränderte sich im weiteren Verlauf der Zellentwicklung jedoch ab dem Zeitpunkt 72 hpf. Die Unterschiede zwischen den beiden Gruppen betragen im Zeitintervall von 48 - 70 hpf etwa  $700 \mu\text{m}^2$  (siehe Abbildung 28) und zwischen 72 - 96 hpf bis zu  $1000 \mu\text{m}^2$  (siehe Abbildung 29).



**Abbildung 28: Flächenausdehnung der Melanophoren des Wildtyps und *ncstn*-Knockdowns im Zeitraum von 48 - 70 hpf.** Auf der X-Achse sind die jeweiligen Beobachtungszeitpunkte in hpf angegeben. Auf der Y-Achse ist die zum jeweiligen Zeitpunkt gemessene maximale Breite in  $\mu\text{m}$  angegeben. Bei allen Messungen wurden die Mittelwerte und Standardfehler sowie das Signifikanzniveau im Vergleich von Wildtyp zu *ncstn*-Knockdown kalkuliert.  $p < 0,01$  - \*\*;  $p < 0,001$  - \*\*\*;  $p < 0,0001$  - \*\*\*\*



**Abbildung 29: Flächenausdehnung der Melanophoren des Wildtyps und *nctn*-Knockdowns im Zeitraum von 72 - 96 hpf.** Auf der X-Achse sind die jeweiligen Beobachtungszeitpunkte in hpf angegeben. Auf der Y-Achse ist die zum jeweiligen Zeitpunkt gemessene maximale Breite in  $\mu\text{m}$  angegeben. Bei allen Messungen wurden die Mittelwerte und Standardfehler sowie das Signifikanzniveau im Vergleich von Wildtyp zu *nctn*-Knockdown kalkuliert.  $p < 0,0001$  - \*\*\*\*

## 4 Diskussion

In der Orchestrierung und Homöostase der Pigmentierung wird die entscheidende Rolle genetischer Faktoren, insbesondere im Rahmen funktionell bedeutsamer molekularer Signalrouten, immer deutlicher. Die Dysfunktion einer oder mehrerer dieser Signalwege führt in aller Regel zu einer Verminderung oder Vermehrung des Pigmentgehalts verschiedener Organe. Die Pigmentierungsvariation und der somit resultierende Phänotyp ist zumeist auf eine gestörte Melanozyten-Ontogenese und/oder fehlerhafte Migration und Distribution der Melanin-produzierenden Zellen zurückzuführen (Giehl und Braun-Falco 2010; Stulberg et al. 2003). An der Haut ist eine derartige Fehlregulation auf Grund ihrer einfachen Zugänglichkeit im Rahmen der klinischen Inspektion sofort erkennbar.

Zu den am besten erforschten Signalrouten, die die individuelle menschliche Hautpigmentierung regulieren, gehört der PKA/cAMP (Proteinkinase A/zyklisches Adenosinmonophosphat)-Signalweg. Diese Signalroute wird durch genetische Polymorphismen im *Melanocortin 1-Rezeptor*-Gen moduliert, die letztendlich entscheidend für die unterschiedliche Pigmentierung einzelner Körperregionen sind. Eine Dysfunktion des PKA/cAMP-Signalwegs beruht somit vornehmlich auf polygenen Ursachen. Weitere wichtige Signalrouten, die einen Einfluss auf die Pigmentierung haben, sind der PKC- $\beta$  (Proteinkinase C-beta)-, MAPK-(*mitogen-activated protein kinase*; MAP-Kinase) und WNT-Signalweg. Alle diese zuvor genannten Signalrouten regulieren die Aktivität des Transkriptionsfaktors MITF, der wiederum die Expression von Enzymen wie Tyrosinase und DHICA-Oxidase in Melanozyten reguliert. Nach Bindung von  $\alpha$ -MSH an den Melanocortin 1-Rezeptor wird eine Signalkaskade aktiviert, die die Melanogenese induziert (D'Mello et al. 2016). Verschiedene monogen vererbte Pigmentierungserkrankungen gehen mit Mutationen in Genen einher, die für wichtige Enzyme innerhalb der zuvor genannten MITF-regulierenden Signalrouten kodieren. Hierzu gehören unter anderem der okulokutane Albinismus Typ I - IV mit Mutationen im *TYR*-, *OCA2*-, *TYRP1*- und *SLC45A2*-Gen und darüber hinaus der Piebaldismus (*KIT*-Gen) und das Waardenburg-Syndrom Typ I - III mit Mutationen im *PAX3*-, *MITF*- und *SNAI2*-Gen (Yamaguchi und Hearing 2014).

Ein in Hinblick auf die Pigmentierung bisher weniger gut untersuchter molekularer Signalweg ist die Notch-Signalroute (siehe Sektion 1.2.2 und Abbildung 4) (Frank et al. 2018). Dies ist insofern verwunderlich, als in den zurückliegenden 15 Jahren zunehmend deutlich wurde, dass zahlreiche monogen vererbte Hyperpigmentierungserkrankungen durch Mutationen in Genen verursacht werden, die für wichtige Proteine innerhalb dieser Signalkaskade kodieren. Zu diesen



gehören insbesondere ADAM10, KRT5, POFUT1, POGLUT1 und PEN2 (Basmanav et al. 2014; Betz et al. 2006; Li et al. 2013; Ralser et al. 2017).

Im Jahr 2017 berichtete unsere Arbeitsgruppe erstmalig über Mutationen im *PSENEN*-Gen, die bei den Betroffenen nicht nur zu einer Pigmentierungserkrankung führten, sondern bei gleichzeitig übergewichtigen und/oder rauchenden Anlageträgern auch mit dem Phänotyp der FAI assoziiert waren (Ralser et al. 2017). Auf Basis dieser bahnbrechenden Erkenntnisse rückte erstmalig die  $\gamma$ -Sekretase als wichtiger Bestandteil der Notch-Signalroute auch in Hinblick auf ihre Rolle in der Orchestrierung bedeutsamer Pigmentierungsprozesse in den Vordergrund (Frank et al. 2018). Da die  $\gamma$ -Sekretase neben PEN2 mit PSEN1/2, APH-1 und NCSTN drei weitere Untereinheiten umfasst, stellte sich uns die Frage, ob diese eventuell auch eine Rolle im Rahmen von Pigmentierungsprozessen im Menschen und in anderen Organismen spielen.

Zum damaligen Zeitpunkt waren keine Zusammenhänge zwischen Mutationen im *PSEN1/2*-, *APH-1*- oder *NCSTN*-Gen und einer hereditären Pigmentierungsstörung beim Menschen bekannt. Jedoch war Nornes et al. (2009) im Rahmen von wissenschaftlichen Untersuchungen zum Morbus Alzheimer aufgefallen, dass eine Defizienz von PSEN2 bei Zebrafischen zu einer Hypopigmentierung führt, auf die sie aber im Rahmen ihrer Arbeit weder näher eingingen, noch diese genauer charakterisierten. Erst durch die Berichte von Ralser et al. (2017) wurde die Bedeutung dieser Beobachtungen auch deutlich, obwohl sie bereits mehr als zehn Jahre zuvor auf eine mögliche Rolle der  $\gamma$ -Sekretase in der Regulierung von Pigmentierungsprozessen hingedeutet hatten.

#### 4.1 ncstn-Defizienz im Zebrafisch

Neben in vitro-Experimenten in verschiedenen Zelllinien und Zellkulturmodellen nehmen in vivo-Untersuchungen an geeigneten Tiermodellen eine Schlüsselposition in der Pigmentierungsforschung ein. Diesbezüglich wurde bisher vornehmlich über Untersuchungen an Mäusen, Ratten, Meerschweinchen und Zebrafischen berichtet (Subburaj et al. 2019).

Das in der hier vorgelegten Dissertationsschrift verwendete Zebrafisch-Modell zeichnet sich durch die einfache und gute Handhabung der Larven und deren charakteristische Transparenz aus. Letztere erleichtert insbesondere die Beobachtung der Melanophoren, die mit dem Lichtmikroskop und ohne weitere Färbungen detektiert und dargestellt werden können, was eine Evaluation der Entwicklung und Homöostase der Pigmentierung ermöglicht.

Im Zebrafisch schalteten wir die Funktion von *ncstn* durch einen MO-vermittelten Knockdown aus. Dies resultierte phänotypisch in einer generalisierten Hypopigmentierung, die in der

kranialen Region der Zebrafischembryonen besonders deutlich ausgeprägt war (siehe Abbildung 9 und Abbildung 10). Obwohl bereits Nornes et al. (2009) im Rahmen ihrer Untersuchungen zum MO-vermittelten Knockdown der  $\gamma$ -Sekretase-Untereinheit *psen2* einen Hypopigmentierungsphänotyp beobachtet hatten, gingen sie der Ursache für diesen Phänotyp nicht weiter nach, da sie dieses Modell primär zur Erforschung neurologischer Veränderungen beim Morbus Alzheimers entwickelt hatten. Ralser et al. (2017) hingegen zogen zur weiteren Charakterisierung der Hypopigmentierung eine Auszählung der Melanophoren im kranialen Anteil der Zebrafischlarven 72 hpf heran und führten zellmorphologische und zelldynamische Messungen der Melanophoren im Schwanzbereich des Zebrafisches von 80 - 104 hpf durch.

Weiterführend entwickelten wir im Rahmen unserer Untersuchungen einen neuen und reproduzierbaren Algorithmus für die Auszählung und detaillierte Charakterisierung der Melanophoren. Hierzu legten wir ein definiertes Messareal fest und analysierten bei allen Fischen den Phänotyp nicht nur hinsichtlich der absoluten Anzahl von Melanophoren im zuvor definierten Gebiet, sondern auch bezüglich der Breite, Länge und Fläche der pigmentierten Zellen und nahmen alle Auswertungen zum Vergleich zwischen Wildtyp und Knockdown in einem Dreifach-Ansatz vor. Hierdurch konnten wir erstmalig aufzeigen, dass der bei den Knockdown-Zebrafischen durchgängig und reproduzierbar beobachtete Hypopigmentierungs-Phänotyp zum einen auf einer Verminderung der absoluten Zahl an Melanophoren gegenüber den Wildtyp-Fischen beruhte, zum anderen aber insbesondere auch auf einer statistisch signifikanten Größenabnahme der im Mittel wesentlich kleineren pigmentierten Zellen bei den Knockdown-Fischen zurückzuführen war (siehe Sektion 3.1).

Gestützt werden unsere zuvor beschriebenen phänotypischen Beobachtungen zu den in-vivo-Effekten einer Morpholino-vermittelten *ncstn*-Defizienz durch unabhängige Untersuchungen von Hsu et al. (2020) in einem weiteren Zebrafisch-Modell und Choi et al. (2020) in einem Maus-Modell. Im Gegensatz zu unseren Untersuchungen berichteten Hsu et al. (2020) jedoch lediglich den Anteil hypopigmentierter Zebrafischembryonen in ihrer Gesamtkohorte von *ncstn*-Knockdown-Fischen. Ähnlich wie bei Nornes et al. (2009) wurde der Hypopigmentierungs-Phänotyp nicht eingehender numerisch oder morphologisch auf Melanophoren-Einzelzelebene charakterisiert. Auch gaben Hsu et al. (2020) keine standardisierten und reproduzierbaren Messparameter an, anhand derer eine Unterscheidung zwischen einer Hypo-, Normo- oder Hyperpigmentierung in ihren Untersuchungen vorgenommen wurde. Überdies ist das phänotypische Merkmal einer Hypopigmentierung auch nicht spezifisch für eine *ncstn*-Defizienz ist, wie bereits aus den Beobachtungen von Nornes et al. (2009), Ralser et al. (2017) und Hsu et al. (2020) deutlich wurde. Vielmehr führt offensichtlich der MO-vermittelte

Knockdown aller  $\gamma$ -Sekretase-Untereinheiten zu mindestens einem gemeinsamen phänotypischen Merkmal: einer Hypo-/Depigmentierung.

Der Notch-Signalweg reguliert sowohl die Zellmorphologie als auch die Zellproliferation und -differenzierung, wobei die Signalübermittlung wesentlich von der Kontaktfläche benachbarter Zellen abhängig ist (Shaya et al. 2017). Somit lassen sich die von uns beobachteten Unterschiede in der Breite, Länge und Flächenausdehnung der Melanophoren während ihrer Entwicklung durch eine Suppression der Notch-Signalkaskade infolge des *ncstn*-Knockdowns erklären, wodurch die Pigmentzellen der Knockdown-Fische weniger Signale erhalten als die Wildtyp-Fische (siehe Sektion 3.5).

Erstmalig konnten wir zeigen, dass eine *ncstn*-Dysfunktion im Zebrafisch auch zur einer Distributionsstörung der Melanophoren führt. Während die im kranialen Segment der Wildtyp-Fische gelegenen Pigmentzellen eine regelmäßige und bei allen Fischen nahezu identische Anordnung aufwiesen, war dieses charakteristische gleichmäßige Verteilungsmuster bei den Melanophoren der *ncstn*-Knockdown-Fische fast vollständig aufgehoben, und es imponierte eine sehr unregelmäßige Anordnung der Melanophoren (siehe Sektion 3.1.1). Unsere Ergebnisse decken sich insofern mit den Beobachtungen von Ralser et al. (2017), die als Konsequenz des MO-vermittelten *psenen*-Knockdowns eine ungerichtete und unstrukturierte Migration und Distribution der Melanophoren beobachten konnten. Da *ncstn* ebenso wie *pen-2* eine Untereinheit des  $\gamma$ -Sekretase-Komplexes darstellt, ist es sehr wahrscheinlich, dass eine Dysfunktion von *ncstn* ebenso deletäre Effekte auf die Melanophorenmigration hat wie die von Ralser et al. (2017) für einen Funktionsverlust von *pen-2* aufgezeigten, was letztendlich in der von uns beobachteten Distributionsstörung der pigmentierten Zellen resultiert.

## 4.2 NCSTN-Defizienz im Menschen

Wie bereits in Sektion 1.4.4 ausgeführt wird NCSTN durch das beim Menschen auf Chromosom 1q23.2 lokalisierte gleichnamige *NCSTN*-Gen kodiert und spielt unter anderem in der Substraterkennung des  $\gamma$ -Sekretase-Komplexes eine zentrale Rolle (Crystal et al. 2003). Bisher wurde dieses Protein insbesondere mit Entwicklungsprozessen verschiedenster Gewebe des Körpers in Verbindung gebracht, was durch unsere Untersuchungen zum Einfluss eines MO-vermittelten *ncstn*-Knockdowns auf die Ontogenese der Melanophoren im Zebrafisch bekräftigt wird.

Da NCSTN eine Untereinheit der  $\gamma$ -Sekretase ist, der wiederum eine zentrale Rolle in der Pathogenese des Morbus Alzheimer zugesprochen wird, vermuteten mehrere Gruppen, dass

*NCSTN*-Mutationen mit einem erhöhten Risiko verbunden sind, an einer Frühform dieses neurologischen Krankheitsbildes zu erkranken (Dermaut et al. 2002; Helisalimi et al. 2004; Orlacchio et al. 2002). Auch soll eine *NCSTN*-Defizienz für neurodegenerative Prozesse und einen progressiven Gedächtnisverlust verantwortlich sein (Tabuchi et al. 2009). Ein tatsächlicher Zusammenhang zwischen einer *NCSTN*-Dysfunktion und den zuvor erwähnten Krankheitsprozessen konnte jedoch bis heute nicht zweifelsfrei belegt werden. Ebenso verhält es sich mit einer möglichen Assoziation zwischen *NCSTN*-Mutationen und dem PASH-Syndrom. Zwar wurden bei Patienten mit dieser Erkrankung *NCSTN*-Mutationen beschrieben, jedoch ist der Zusammenhang auf Grund von nur zwei Fällen und einer Überschneidung des Phänotyps mit anderen nicht-syndromalen und syndromalen Akneformen nicht eindeutig (Duchatelet et al. 2015; Li et al. 2018).

Unzweifelhaft ist hingegen, dass eine *NCSTN*-Defizienz mit der FAI assoziiert ist, einer chronisch-rezidivierenden entzündlichen Erkrankung, die Haarfollikel, Talg- und Schweißdrüsen betrifft (Frank et al. 2018; Wang et al. 2010). Mittlerweile konnte dieser Zusammenhang durch zahlreiche Arbeitsgruppen bestätigt werden (Li et al. 2019). Interessanterweise berichteten alle auf diesem Gebiet tätigen Arbeitsgruppen in Zusammenhang mit mittlerweile fast 30 veröffentlichten *NCSTN*-Mutationen in verschiedenen Ethnien ausschließlich über einen AI-Phänotyp. Somit bleibt festzuhalten, dass bis dato ausschließlich *PSENEEN*-Mutationen bei suszeptiblen Individuen mit zusätzlichen multifaktoriellen Risikofaktoren wie übermäßigem Nikotingenuss und/oder starkem Übergewicht mit dem kombinierten Phänotyp aus DDD und FAI assoziiert werden konnten (Frank et al. 2018).

Während wir die Ergebnisse unserer Untersuchungen zu den Effekten einer *ncstn*-Defizienz im Zebrafisch in der hier vorgelegten Dissertationsschrift zusammentrugen, erschien am 13.04.2020 eine Veröffentlichung von Garcovich et al. (2020), in der die Autoren über einen 54-jährigen Mann mit einer zuvor nicht beschriebenen Nonsense-Mutation, R583\*, im *NCSTN*-Gen berichteten. Klinisch wies der Patient einen kombinierten Phänotyp aus FAI und DDD auf, so wie er bereits von Patienten mit *PSENEEN*-Mutationen bekannt war (Frank et al. 2018). Obwohl Garcovich et al. (2020) die bei ihrem Patienten beschriebene klinische Manifestation auf die *NCSTN*-Mutation zurückführten, erscheint uns diese Erklärung aus mehreren Gründen nicht gänzlich plausibel.

Zum einen sind - wie zu vor erwähnt - bisher mindestens 30 verschiedene *NCSTN*-Mutationen bei Patienten mit FAI beschrieben worden, ohne dass auch nur in einer dieser Veröffentlichungen ein Anlageträger eine Pigmentierungsstörung aufwies (Li et al. 2019). Obwohl wir nicht gänzlich ausschließen können, dass bei all diesen Patienten der

Pigmentierungsphänotyp nicht erkannt oder übersehen worden ist, erachten wir dies als nicht sehr wahrscheinlich, da sich unter den Ko-Autoren dieser Arbeiten auch regelmäßig Dermatologen befanden, denen eine Störung der Pigmentierung wohl nicht entgangen wäre.

Zum zweiten fanden Garcovich et al. im Rahmen ihrer molekulargenetischen Untersuchungen auch zwei Einzelnukleotidsubstitutionen im *KRT5*-Gen, die sie unglücklicherweise weder bezüglich ihrer exakten cDNA-Nukleotidlokalisierung, noch hinsichtlich eines möglichen Aminosäurenwechsels genauer darstellten. Somit ist ihre daran anschließende Aussage, dass diese beiden *KRT5*-Varianten keine pathologische Bedeutung hätten, nicht nachprüfbar, zumal sie sich lediglich auf eine einzige Datenbank beriefen (ClinVar; <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/>) und auch keine Angaben zur Frequenz der beiden Nukleotidsubstitutionen in der allgemeinen Bevölkerung machten (Garcovich et al. 2020).

Zum dritten waren in der Familie des von Garcovich et al. (2020) beschriebenen Index-Patienten auch dessen Tochter und Vater von der FAI betroffen. Hingegen wiesen weder der Vater, noch die Tochter den Pigmentierungsphänotyp auf. Diesbezüglich nahmen die Autoren lediglich zu der Tochter Stellung und kamen zu der Schlussfolgerung, dass diese zum Untersuchungszeitpunkt wahrscheinlich noch zu jung gewesen sei, um auch die Pigmentierungsabweichung zu manifestieren (Garcovich et al. 2020). Während wir dieser Argumentation bezüglich der Tochter folgen können, gilt sie jedoch für den Vater des Index-Patienten sicherlich nicht, da dieser, eine vollständige Penetranz des DDD zugrunde legend, den Pigmentierungsphänotyp auch aufweisen müsste, wenn dieser seine Ursache tatsächlich in der *NCSTN*-Mutation hätte. Somit ist unserer Meinung nach der von den Autoren postulierte Zusammenhang zwischen der Nonsense-Mutation R583\* im *NCSTN*-Gen und dem DDD-Phänotyp zumindest nicht eindeutig, und es stellt sich die Frage, ob dieser nicht doch auf eine der beiden Varianten im *KRT5*-Gen zurückzuführen ist.

Zum vierten isolierten Garcovich et al. (2020) Zellen aus der äußeren Haarwurzelscheide des Index-Patienten und seines klinisch nicht betroffenen Sohns und untersuchten in daraus generierten Zellextrakten die Expression der  $\gamma$ -Sekretase-Untereinheiten PEN-2, PSEN1 und PSEN2. Hierbei zeigte sich, dass der Index-Patient eine deutlich verminderte Gesamtexpression dieser Proteine aufwies, ohne dass die Autoren diese Ergebnisse näher interpretierten (Garcovich et al. 2020). Unserer Meinung nach deuten diese Resultate der Autoren darauf hin, dass beim von ihnen untersuchten Index-Patienten nicht nur eine isolierte *NCSTN*-Defizienz für die klinischen Symptome verantwortlich ist, sondern wahrscheinlich erst die verminderte Expression und Dysfunktion auch der drei weiteren  $\gamma$ -Sekretase-Untereinheiten PEN-2, PSEN1 und PSEN2 und deren gemeinschaftliche Herunterregulation zum hier beobachteten

kombinierten Phänotyp von FAI und DDD beitragen. Dies würde nicht weiter verwundern, da es die Ergebnisse unserer Arbeitsgruppe um Ralser et al. (2017) unterstützt, in denen wir diesen kombinierten Phänotyp bereits bei mehreren Anlageträgern von *PSENNEN*-Mutationen mit konsekutiver PEN-2-Defizienz beobachtet hatten.

In Zusammenschau der von Garcovich et al. (2020) vorgelegten Daten haben wir daher Zweifel an der Hypothese der Autoren, dass die von ihnen identifizierte Nonsense-Mutation R583\* im *NCSTN*-Gen ursächlich für den von ihnen beim Index-Patienten beobachteten kombinierten Phänotyp aus FAI und DDD ist.

### 4.3 Der Zebrafisch als Modell zur Erforschung humaner Pigmentierungsstörungen

Das humane *NCSTN*-Gen kodiert für das aus 709 Aminosäuren bestehende gleichnamige Transmembranprotein NCSTN (Zhang et al. 2014). Auf transkriptioneller Ebene besteht somit eine Übereinstimmung von 56% mit der *ncstn*-Gensequenz des Zebrafisches. Diese Homologie zwischen Menschen und Zebrafisch findet sich insbesondere auch bezüglich der funktionell bedeutsamen Genabschnitte Glu333 und der Aminosäuren 312 - 340, die für die Substraterkennung und -bindung verantwortlich sind (Lim et al. 2015). Auf Grund der zuvor beschriebenen Homologie erschien uns der Zebrafisch als geeignetes Modell, um einige der beim Menschen beschriebenen *NCSTN*-Mutationen und ihre Effekte in-vivo zu untersuchen, insbesondere in Hinsicht auf möglicherweise kurative molekularbiologische Phänotyp-reversionsansätze.

#### 4.3.1 Kurative Phänotyp-Reversion mit Zebrafisch- und humaner RNA

In der hier vorgelegten Dissertationsschrift konnten wir zunächst zeigen, dass wir eine durch eine *ncstn*-MO induzierte Pigmentierungsstörung durch die Behandlung mit einer intakten *ncstn*-RNA revertieren konnten. Unsere Ergebnisse stimmen mit Daten von Hsu et al. (2020) überein, denen ebenfalls eine Phänotyp-Reversion durch Ko-Injektion einer *ncstn*-RNA gelang. Im Gegensatz zu Ihnen konnten wir jedoch darüber hinaus erstmalig zeigen, dass auch eine Behandlung mit der humanen *NCSTN*-RNA zu einer Umkehrung des Hypo-/Depigmentierungsphänotyps führt.

Dies hat weitreichende translationale Implikationen. Unsere wie auch die Ergebnisse anderer Gruppen veranschaulichen, dass der Zebrafisch ein ausgezeichnetes Modell darstellt, um hereditäre Pigmentierungserkrankungen mit monogenem Erbgang molekulargenetisch und

zellbiologisch zu erforschen und auch kurative Behandlungsansätze auf Basis der RNA-Technologie zu explorieren und evaluieren.

Einen Meilenstein in dieser Entwicklung stellt sicherlich die Verleihung des Nobelpreises für Medizin im Jahr 2006 dar, den Andrew Fire und Craig Mello für ihre Untersuchungen am Fadenwurm *Caenorhabditis elegans* erhielten. Die Wissenschaftler konnten zeigen, dass sich Gene gezielt mittels kurzer, komplementärer, einsträngiger RNA-Moleküle inaktivieren lassen. Unabhängig hiervon hatte der Glaube an die therapeutischen Möglichkeiten der siRNA bereits vier Jahre zuvor andere Wissenschaftler dazu veranlasst, die Firma Alnylam zu gründen, die sich seither um die Entwicklung RNAi-basierter Behandlungsansätze bemüht hat. Wurden derartige Therapiestrategien noch vor etwa 20 Jahren skeptisch betrachtet und mitunter als Utopie abgetan, so beweist die jüngste Zulassung gleich mehrerer auf der RNA-Interferenz (siRNA) basierender Medikamente dieser Firma wie zum Beispiel Patisiran und Givosiran, dass der eingeschlagene Weg zielführend und vielversprechend ist.

#### 4.3.2 Exploration der Effekte humaner *NCSTN*-Mutationen im Zebrafisch

Nach der erfolgreichen Reversion des Hypopigmentierungsphänotyps mittels Ko-Injektion von Zebrafisch- und humaner *NCSTN*-RNA untersuchten wir im nächsten Schritt die Effekte verschiedener *NCSTN*-Mutationen, die beim Menschen mit dem klinischen Bild der FAI assoziiert sind. Hierzu klonierten wir gezielt vier dieser Mutationen aus verschiedenen Mutationsklassen mittels ortsgebundener Mutagenese und evaluierten deren Einfluss auf die Pigmentierung im Zebrafisch (siehe Sektionen 2.2.4.3 und 2.2.4.4).

Die Nonsense-Mutation c.497C>A wurde erstmalig im Jahr 2014 von Ma et al. (2014) beschrieben und ist in Exon Fünf des *NCSTN*-Gens lokalisiert. Die rahmenverschiebende Mutation c.278delC wurde 2018 erstmalig durch die Arbeitsgruppe um Wu et al. (2018) veröffentlicht und befindet sich in Exon Vier des *NCSTN*-Gens. Die Spleißstellen-Mutation c.1101+1G>A wurde 2011 erstmalig von Pink et al. (2011) identifiziert und liegt in Intron Neun des *NCSTN*-Gens. Gemeinsam ist allen drei Mutationen, dass sie in einem präterminalen Stop-Kodon resultieren, was zum Abbruch der Translation und Proteinbiosynthese führt. Als funktionelle Konsequenz kommt es entweder zur Ausbildung eines verkürzten Proteins oder es findet eine Nonsense-mediierte mRNA-Degradierung statt. Mit einem präterminalen Stop-Kodon einhergehende Mutationen sind in der Regel stets krankheitsevrursachend.

Die drei Stop-Kodon-Mutationen waren allesamt mit dem klinischen Bild der AI assoziiert. Eine Kosegregation mit einer Pigmentierungsstörung wurde von den jeweiligen Arbeitsgruppen nicht beschrieben. Jedoch muss an dieser Stelle erwähnt werden, dass die von Wu et al. (2018)

beschriebene und drei Generationen umfassenden Familie mit der Mutation c.278delC klinisch nicht nur von einer FAI betroffen war, sondern dass einige Familienmitglieder auch eine idiopathische Hypomelanosis guttata (IHG) aufwiesen. Bei der IHG handelt es sich um eine Hypopigmentierungserkrankung, die sich mit disseminierten weiß-gräulichen Maculae an der Haut manifestiert (Rani et al. 2018). Von den 16 Familienmitgliedern wiesen sechs eine Kombination aus FAI und IHG auf, eines ausschließlich eine AI und ein weiteres Familienmitglied nur eine IHG (Wu et al. 2018). Wu et al. demonstrierten mittels Sanger Sequenzierung, dass die Variante 278delC im *NCSTN*-Gen einzig mit der FAI segregierte, jedoch nicht mit der IHG. Daher schlussfolgerten Wu et al., dass in dieser Familie die Mutation ausschließlich der FAI zu Grunde lag und nicht in Zusammenhang mit der IHG stand, eine Interpretation, der wir uns anschließen (Wu et al. 2018). Somit gab es bis zu der in Sektion 4.2 angeführten Veröffentlichung von Garcovich et al. (2020) keine Berichte zu einem möglichen humanen Pigmentierungsphänotyp in Zusammenhang mit einer *NCSTN*-Mutation.

Im Gegensatz zur Injektion der Zebrafisch *ncstn*-RNA und der humanen *NCSTN*-RNA vermochte die Behandlung mit den drei zuvor beschriebenen mutierten humanen *NCSTN*-RNA-Varianten nicht, den Hypopigmentierungsphänotyp zu revertieren (siehe Sektion 3.4.1 - 3.4.3). Dies legt nahe, dass als Konsequenz der Mutationen weder ein residuell funktionsfähiges (verkürztes) *NCSTN*-Protein kodiert wird, noch dass die anderen, nicht mutierten Untereinheiten des  $\gamma$ -Sekretase-Komplexes für die wahrscheinliche Nonsense-medierte mRNA-Degradierung der mutierten RNA und die damit einhergehende *NCSTN*-Dysfunktion kompensieren können, was klinisch durch die persistierende Hypopigmentierung reflektiert wird.

Die vierte von uns *in vitro* klonierte humane Mutation war die Missense-Mutation c.632C>G (P211R). Diese ist in Exon Sechs des *NCSTN*-Gens lokalisiert, wurde erstmalig von Li et al. (2011) beschrieben und war ebenfalls ausschließlich mit klinischen Symptomen der FAI assoziiert. Interessanterweise gelang es uns, die durch einen MO-vermittelten *ncstn*-Knockdown induzierte Hypopigmentierung im Zebrafisch durch die Ko-Injektion der diese Mutation tragenden *NCSTN*-RNA-c.632C>G zu revertieren.

Hieraus leiteten wir ab, dass diese Missense-Mutation mit einer zumindest partiell erhaltenen *NCSTN*-Funktion einhergeht bzw. nicht hinreichend deletär ist, um im Zebrafisch einen Hypopigmentierungsphänotyp hervorzurufen. Dies kann mehrere Gründe haben, da es generell schwierig ist, die funktionellen Konsequenzen einer Missense-Mutation vorherzusagen. Obwohl es verschiedene Simulationsprogramme gibt, um die Effekte solcher Mutationen *in silico* zu untersuchen, können diese beispielsweise die genaue Veränderung der Proteinstruktur



nur mit Einschränkungen bestimmen. Oft resultieren Missense-Mutationen in einer verringerten Stabilität des kodierten Proteins oder Führen zu einer frühzeitigen Erkennung des mutierten Proteins durch eine interne "Qualitätskontrolle" der Zelle. Letzteres führt normalerweise zu einer vorzeitigen Degradierung des Proteins und in der Folge zu einem Funktionsverlust. Selbst wenn die Stabilität des Proteins erhalten bleibt, kann es durch die Aminosäuresubstitution zu einem Verlust wichtiger Eigenschaften des Proteins kommen. So kann beispielsweise der Verlust einer funktionell bedeutsamen Domäne zur Verminderung der physiologischen katalytischen Aktivität dieses Enzyms führen. Des Weiteren kann eine Veränderung dieser funktionell bedeutsamen Domäne auch in einer gänzlich neuen Funktion oder auch einer verstärkten Funktionstüchtigkeit resultieren. Die Missense-Mutation kann auch zu einer wesentlichen Veränderung der Bindungsstelle an anderen Proteinen führen, wodurch es nicht mehr als Substrat für diese anderen Proteine fungieren kann. Gelegentlich verursacht die Mutation eine Veränderung der Sekundär- und Tertiärstruktur eines Proteins, woraus ein vorzeitiger Abbau resultiert.

#### **4.4 Vergleich der Auswirkungen einer *ncstn*/NCSTN-Dysfunktion im Zebrafisch und Menschen – ein preliminäres Resümee**

Da Zebrafische weder Haarfollikel, noch Talg- oder Schweißdrüsen aufweisen, der vornehmlich mit *NCSTN*-Mutationen assoziierte humane Phänotyp jedoch mit pathologischen Veränderungen an genau diesen Hautadnexstrukturen einhergeht, fokussierten wir uns in der hier vorgelegten DiSSERTATIONSSCHRIFT auf die bis dato nicht untersuchte mögliche Rolle von *ncstn*/NCSTN in der Pigmentierung.

Unsere Daten weisen auf eine wichtige Rolle von *ncstn* in Hinblick auf die Homöostase der Pigmentierung des Zebrafisches und die Ontogenese der Melanophoren hin. Auf zellulärer Ebene resultierte der MO-vermittelte *ncstn*-Knockdown in einer aberranten Morphologie und einer Dysfunktion der Proliferation, Migration und Differenzierung der Melanophoren. Auch konnten wir zeigen, dass sich das von uns entwickelte *ncstn*-Zebrafischmodell für Behandlungsansätze auf Basis der siRNA-Interferenz eignet und Modellcharakter für die Erforschung monogen hereditärer Pigmentierungserkrankungen hat.

Mutationen in drei der vier Unterinheiten des  $\gamma$ -Sekretase-Komplexes sind beim Menschen mit dem Krankheitsbild der FAI assoziiert. Bei einer Dysfunktion von PEN-2 auf Basis von *PSENEN*-Mutationen kann sich darüber hinaus auch eine Pigmentierungsstörung im Sinne eines DDD manifestieren, wobei bis heute nicht klar ist, warum selbst innerhalb derselben Familie mit identischem Gendefekt bestimmte Anlageträger nur einen der beiden möglichen

Phänotypen aufweisen, während andere sowohl akneiforme Hautveränderungen als auch eine retikuläre Hyperpigmentierung manifestieren (Frank et al. 2018). In diesem Zusammenhang erachten wir die im Rahm dieser Dissertationsschrift kritisch diskutierten Ergebnisse von Garcovich et al. (2020) als nicht hinreichend überzeugend, um die von dieser Arbeitsgruppe identifizierte Mutation im *NCSTN*-Gen mit der beim Index-Patienten beschriebenen Pigmentierungsstörung in Zusammenhang zu bringen. Diesbezüglich wäre zumindest die Identifikation weiterer *NCSTN*-Mutationen bei Familien mit vollständiger Kosegregation des Pigmentierungsphänotyps mit dem krankheitsverursachenden genetischen Defekt erforderlich. Zum jetzigen Zeitpunkt scheint Pen-2 somit die einzige  $\gamma$ -Sekretase-Untereinheit zu sein, die nachgewiesenermaßen und durch mehrere Mutationsberichte bei Patienten mit DDD belegt eine Rolle in der menschlichen Pigmentierung spielt. Dies deutet darauf hin, dass sich die Rolle des  $\gamma$ -Sekretase-Komplexes im allgemeinen, und von *NCSTN* im Speziellen, im Laufe der Evolution geändert hat. War diese im Zebrafisch und vielleicht auch in anderen Spezies wahrscheinlich primär für die Pigmentierung verantwortlich, so hat sie beim Menschen neben der Orchestrierung verschiedener neurologischer Prozesse nach heutigem Erkenntnisstand auch insbesondere eine regulatorische Funktion in Hinblick auf die Haarfollikel-Talgdrüsen-Schweißdrüsen-Einheit und steuert hier Entzündungsprozesse.

Zukünftige molekulargenetische und zellbiologische Untersuchungen an geeigneten in vitro- und in-vivo-Modellen wie dem hier dargestellten Zebrafischmodell werden der Schlüssel zu einem besseren Verständnis der komplexen biologischen Prozesse sein, die die Pigmentierung des Menschen und anderer Spezies steuern. Gleichzeitig ebnen sie den Weg zur Entwicklung kausaler und zielgerichteter personalisierter Therapiekonzepte, zum Beispiel auf Basis der siRNA-Interferenz.

## 5 Zusammenfassung

Die Regulation der Melanozytenfunktion im Rahmen der Pigmentierung ist ein komplexer biologischer Prozess, in den verschiedene molekulare Signalwege involviert sind, deren spezifische Rolle größtenteils noch nicht bekannt ist. Kürzlich wurde gezeigt, dass eine Variante der hereditären Erkrankung Morbus Dowling-Degos durch eine Dysfunktion der Melanozytenmigration, -proliferation und -differenzierung gekennzeichnet ist. Diese manifestiert sich klinisch mit einer Pigmentierungsstörung und wird durch Mutationen im *PSENFEN*-Gen verursacht, das für PEN-2 kodiert, ein Protein des  $\gamma$ -Sekretase-Proteasekomplexes. Die  $\gamma$ -Sekretase umfasst die drei weiteren Untereinheiten Nicastrin, Präsenilin und Aph-1 und nimmt eine zentrale Stellung im NOTCH-Signalweg ein, der insbesondere in der Entwicklung von Pigmentzellen eine entscheidende Rolle spielt. Im Rahmen dieses Promotionsprojekts untersuchten wir die Funktion der  $\gamma$ -Sekretase-Untereinheit Nicastrin in Bezug auf die Pigmentierung des Zebrafischs. Wir konnten zeigen, dass eine Morpholino-vermittelte *ncstn*-Defizienz zu einer Hypo-/Depigmentierung führt, die auf Veränderungen der Morphologie, Proliferation, Migration und Differenzierung der Melanophoren basiert. Den daraus resultierenden Hypopigmentierungsphänotyp konnten wir sowohl durch die Ko-Injektion humaner als auch von Zebrafisch-RNA umkehren. In diesem Zusammenhang haben wir auch die vier im Menschen beschriebenen *NCSTN*-Mutationen c.497C>A, c.278delC, c.1101+1C>G und c.632C>G kloniert und in-vivo im Rahmen von Reversionsexperimenten hinsichtlich ihrer Effekte auf die Pigmentierung untersucht. Wir konnten zeigen, dass die drei in einem präterminalen Stop-Kodon resultierenden Mutationen c.497C>A, c.278delC, c.1101+1C>G deletäre Effekte auf die Zebrafischpigmentierung haben und zu keiner Phänotypreversion führen, da sie vermutlich eine Nonsense-medierte RNA-Degradierung bedingen. Im Vergleich dazu scheinen die funktionellen Konsequenzen der Missense-Mutation c.632C>G nicht gleichermaßen deletär zu sein, da wir durch die Behandlung der *ncstn*-defizienten Zebrafische mit einer diese Mutation enthaltenden RNA den Hypopigmentierungsphänotyp umkehren konnten. Diese Ergebnisse veranschaulichen die Möglichkeiten einer Therapie von Pigmentierungsstörungen mittels der siRNA-Interferenz im Zebrafischmodell. Da diese Technologie mittlerweile auch erfolgreich beim Menschen zum Einsatz gekommen ist, könnte in Modellen wie dem hier verwendeten der Schlüssel zu einem besseren Verständnis komplexer biologischer Prozesse und eine Möglichkeit der ersten Evaluation zielgerichteter kausaler Therapiestrategien bei Patienten mit Pigmentierungsstörungen liegen.

## 6 Literaturverzeichnis

Abdallah F, Mijouin L, Pichon C (2017): Skin immune landscape: inside and outside the organism. *Mediators Inflamm* 2017, 5095293

Artavanis-Tsakonas S, Rand MD, Lake RJ (1999): Notch signaling: cell fate control and signal integration in development. *Science* 284, 770-776

Arunachalam M, Raja M, Vijayakumar C, Malaiammal P, Mayden RL (2013): Natural history of zebrafish (*danio rerio*) in India. *Zebrafish* 10, 1-14

Banba K, Tanaka N, Fujioka A, Tajima S (1999): Hyperpigmentation caused by hyperthyroidism: differences from the pigmentation of Addison's disease. *Clin Exp Dermatol* 24, 196-198

Basmanav FB, Oprisoreanu AM, Pasternack SM, Thiele H, Fritz G, Wenzel J, Grosser L, Wehner M, Wolf S, Fagerberg C et al. (2014): Mutations in *POGLUT1*, encoding protein O-glucosyltransferase 1, cause autosomal-dominant Dowling-Degos disease. *Am J Hum Genet* 94, 135-143

Baxter LL, Moreland RT, Nguyen AD, Wolfsberg TG, Pavan WJ (2010): A curated online resource for *SOX10* and pigment cell molecular genetic pathways. *Database (Oxford)* 2010, baq025

Betz RC (2017): A path through the reticulate pigmentation disorder jungle. *Br J Dermatol* 177, 893-894

Betz RC, Planko L, Eigelshoven S, Hanneken S, Pasternack SM, Bussow H, Van Den Bogaert K, Wenzel J, Braun-Falco M, Rutten A et al. (2006): Loss-of-function mutations in the keratin 5 gene lead to Dowling-Degos disease. *Am J Hum Genet* 78, 510-519

Budi EH, Patterson LB, Parichy DM (2011): Post-embryonic nerve-associated precursors to adult pigment cells: genetic requirements and dynamics of morphogenesis and differentiation. *PLoS Genet* 7, e1002044

Capell A, Beher D, Prokop S, Steiner H, Kaether C, Shearman MS, Haass C (2005): Gamma-secretase complex assembly within the early secretory pathway. *J Biol Chem* 280, 6471-6478

Choi JH, Han J, Theodoropoulos PC, Zhong X, Wang J, Medler D, Ludwig S, Zhan X, Li X, Tang M et al. (2020): Essential requirement for nicastrin in marginal zone and B-1 B cell development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 117, 4894-4901

Chuang LY, Cheng YH, Yang CH (2013): Specific primer design for the polymerase chain reaction. *Biotechnol Lett* 35, 1541-1549

Costin GE, Hearing VJ (2007): Human skin pigmentation: melanocytes modulate skin color in response to stress. *FASEB J* 21, 976-994

Cramer SF (1991): The origin of epidermal melanocytes. Implications for the histogenesis of nevi and melanomas. *Arch Pathol Lab Med* 115, 115-119

Crystal AS, Morais VA, Pierson TC, Pijak DS, Carlin D, Lee VM, Doms RW (2003): Membrane topology of gamma-secretase component PEN-2. *J Biol Chem* 278, 20117-20123

D'Mello SA, Finlay GJ, Baguley BC, Askarian-Amiri ME (2016): Signaling pathways in melanogenesis. *Int J Mol Sci* 17

Degos R, Ossipowski B (1954): [Reticulated pigmentary dermatosis of the folds: relation to acanthosis nigricans]. *Ann Dermatol Syphiligr (Paris)* 81, 147-151

Dereure O (2001): Drug-induced skin pigmentation. Epidemiology, diagnosis and treatment. *Am J Clin Dermatol* 2, 253-262

Dermaut B, Kumar-Singh S, Engelborghs S, Theuns J, Rademakers R, Saerens J, Pickut BA, Peeters K, van den Broeck M, Vennekens K et al. (2004): A novel presenilin 1 mutation associated with Pick's disease but not beta-amyloid plaques. *Ann Neurol* 55, 617-626

Dermaut B, Theuns J, Sleegers K, Hasegawa H, Van den Broeck M, Vennekens K, Corsmit E, St George-Hyslop P, Cruts M, van Duijn CM et al. (2002): The gene encoding nicastrin, a major gamma-secretase component, modifies risk for familial early-onset Alzheimer disease in a Dutch population-based sample. *Am J Hum Genet* 70, 1568-1574

Dooley CM, Mongera A, Walderich B, Nusslein-Volhard C (2013): On the embryonic origin of adult melanophores: the role of ErbB and Kit signalling in establishing melanophore stem cells in zebrafish. *Development* 140, 1003-1013

Dowling GB, Freudenthal W (1938): Acanthosis Nigricans. *Proc R Soc Med* 31, 1147-1150

Dries DR, Shah S, Han YH, Yu C, Yu S, Shearman MS, Yu G (2009): Glu-333 of nicastrin directly participates in gamma-secretase activity. *J Biol Chem* 284, 29714-29724

Duchatelet S, Miskinyte S, Join-Lambert O, Ungeheuer MN, Frances C, Nassif A, Hovnanian A (2015): First nicastrin mutation in PASH (pyoderma gangrenosum, acne and suppurative hidradenitis) syndrome. *Br J Dermatol* 173, 610-612

Engeszer RE, Patterson LB, Rao AA, Parichy DM (2007): Zebrafish in the wild: a review of natural history and new notes from the field. *Zebrafish* 4, 21-40

Erlich HA (1989): Polymerase chain reaction. *J Clin Immunol* 9, 437-447

Fitzpatrick TB, Breathnach AS (1963): Das epidermale melanin-einheit-system. *Dermatol Wochenschr* 147, 481-489

Fitzpatrick TB, Miyamoto M, Ishikawa K (1967): The evolution of concepts of melanin biology. *Arch Dermatol* 96, 305-323

Fortna RR, Crystal AS, Morais VA, Pijak DS, Lee VM, Doms RW (2004): Membrane topology and nicastrin-enhanced endoproteolysis of APH-1, a component of the gamma-secretase complex. *J Biol Chem* 279, 3685-3693

Francis R, McGrath G, Zhang J, Ruddy DA, Sym M, Apfeld J, Nicoll M, Maxwell M, Hai B, Ellis MC et al. (2002): aph-1 and pen-2 are required for Notch pathway signaling, gamma-secretase cleavage of betaAPP, and presenilin protein accumulation. *Dev Cell* 3, 85-97

Frank J, Ralser DJ, Betz RC (2018): Intra- and interfamilial phenotype variability associated with mutations in gamma-secretase subunit-encoding PSENEN. *J Invest Dermatol* 138, 1215-1218

Gaiano N, Fishell G (2002): The role of notch in promoting glial and neural stem cell fates. *Annu Rev Neurosci* 25, 471-490

Gao M, Wang PG, Cui Y, Yang S, Zhang YH, Lin D, Zhang KY, Liang YH, Sun LD, Yan KL et al. (2006): Inversa acne (hidradenitis suppurativa): a case report and identification of the locus at chromosome 1p21.1-1q25.3. *J Invest Dermatol* 126, 1302-1306

Garcovich S, Tricarico PM, Meddour CN, Giovanardi G, Peris K, Crovella S, Boniotto M (2020): Novel nicastrin mutation in hidradenitis suppurativa-Dowling Degos disease clinical phenotype: more than just clinical overlap? *Br J Dermatol* 183, 758-759

Gasque P, Jaffar-Bandjee MC (2015): The immunology and inflammatory responses of human melanocytes in infectious diseases. *J Infect* 71, 413-421

Gertsik N, Chiu D, Li YM (2014): Complex regulation of gamma-secretase: from obligatory to modulatory subunits. *Front Aging Neurosci* 6, 342

- Giehl K, Braun-Falco M (2010): Genetisch bedingte Pigmentstörungen. *Hautarzt* 61, 567-577
- Goding CR (2007): Melanocytes: the new black. *Int J Biochem Cell Biol* 39, 275-279
- Goldgeier MH, Klein LE, Klein-Angerer S, Moellmann G, Nordlund JJ (1984): The distribution of melanocytes in the leptomeninges of the human brain. *J Invest Dermatol* 82, 235-238
- Grego-Bessa J, Luna-Zurita L, del Monte G, Bolos V, Melgar P, Arandilla A, Garratt AN, Zang H, Mukoyama YS, Chen H et al. (2007): Notch signaling is essential for ventricular chamber development. *Dev Cell* 12, 415-429
- Haass NK, Herlyn M (2005): Normal human melanocyte homeostasis as a paradigm for understanding melanoma. *J Invest Dermatol Symp Proc* 10, 153-163
- Hansson CA, Frykman S, Farmery MR, Tjernberg LO, Nilsberth C, Pursglove SE, Ito A, Winblad B, Cowburn RF, Thyberg J et al. (2004): Nicastrin, presenilin, APH-1, and PEN-2 form active gamma-secretase complexes in mitochondria. *J Biol Chem* 279, 51654-51660
- Hansson EM, Lanner F, Das D, Mutvei A, Marklund U, Ericson J, Farnebo F, Stumm G, Stenmark H, Andersson ER et al. (2010): Control of Notch-ligand endocytosis by ligand-receptor interaction. *J Cell Sci* 123, 2931-2942
- Hearing VJ (2011): Determination of melanin synthetic pathways. *J Invest Dermatol* 131, E8-E11
- Hebert SS, Serneels L, Dejaegere T, Horre K, Dabrowski M, Baert V, Annaert W, Hartmann D, De Strooper B (2004): Coordinated and widespread expression of gamma-secretase in vivo: evidence for size and molecular heterogeneity. *Neurobiol Dis* 17, 260-272
- Helisalmi S, Dermaut B, Hiltunen M, Mannermaa A, Van den Broeck M, Lehtovirta M, Koivisto AM, Iivonen S, Cruts M, Soininen H et al. (2004): Possible association of nicastrin polymorphisms and Alzheimer disease in the Finnish population. *Neurology* 63, 173-175
- Higuchi R, Krummel B, Saiki RK (1988): A general method of in vitro preparation and specific mutagenesis of DNA fragments: study of protein and DNA interactions. *Nucleic Acids Res* 16, 7351-7367
- Howe K, Clark MD, Torroja CF, Torrance J, Berthelot C, Muffato M, Collins JE, Humphray S, McLaren K, Matthews L et al. (2013): The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome. *Nature* 496, 498-503

- Hsu CH, Liou GG, Jiang YJ (2020): Nicastrin deficiency induces Tyrosinase-dependent depigmentation and skin inflammation. *J Invest Dermatol* 140, 404-414
- Hultman KA, Budi EH, Teasley DC, Gottlieb AY, Parichy DM, Johnson SL (2009): Defects in ErbB-dependent establishment of adult melanocyte stem cells reveal independent origins for embryonic and regeneration melanocytes. *PLoS Genet* 5, e1000544
- Jansen I, Altmeyer P, Piewig G (2001): Acne inversa (alias hidradenitis suppurativa). *J Eur Acad Dermatol Venereol* 15, 532-540
- Jemec GB (2012): Clinical practice. Hidradenitis suppurativa. *N Engl J Med* 366, 158-164
- Jiang H, Newman M, Lardelli M (2018): The zebrafish orthologue of familial Alzheimer's disease gene PRESENILIN 2 is required for normal adult melanotic skin pigmentation. *PLoS One* 13, e0206155
- Jimbow K, Quevedo WC, Jr., Fitzpatrick TB, Szabo G (1976): Some aspects of melanin biology: 1950-1975. *J Invest Dermatol* 67, 72-89
- Kaether C, Haass C, Steiner H (2006): Assembly, trafficking and function of gamma-secretase. *Neurodegener Dis* 3, 275-283
- Kim YC, Davis MD, Schanbacher CF, Su WP (1999): Dowling-Degos disease (reticulate pigmented anomaly of the flexures): a clinical and histopathologic study of 6 cases. *J Am Acad Dermatol* 40, 462-467
- Kimberly WT, LaVoie MJ, Ostaszewski BL, Ye W, Wolfe MS, Selkoe DJ (2003): Gamma-secretase is a membrane protein complex comprised of presenilin, nicastrin, Aph-1, and Pen-2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 6382-6387
- Kopan R, Ilagan MX (2004): Gamma-secretase: proteasome of the membrane? *Nat Rev Mol Cell Biol* 5, 499-504
- Kurzen H, Kurokawa I, Jemec GB, Emtestam L, Sellheyer K, Giamarellos-Bourboulis EJ, Nagy I, Bechara FG, Sartorius K, Lapins J et al. (2008): What causes hidradenitis suppurativa? *Exp Dermatol* 17, 455-456; discussion 457-472
- Lai EC (2004): Notch signaling: control of cell communication and cell fate. *Development* 131, 965-973
- Laky K, Fowlkes BJ (2008): Notch signaling in CD4 and CD8 T cell development. *Curr Opin Immunol* 20, 197-202



Lam J, Krakowski AC, Friedlander SF (2007): Hidradenitis suppurativa (acne inversa): management of a recalcitrant disease. *Pediatr Dermatol* 24, 465-473

LaVoie MJ, Fraering PC, Ostaszewski BL, Ye W, Kimberly WT, Wolfe MS, Selkoe DJ (2003): Assembly of the gamma-secretase complex involves early formation of an intermediate subcomplex of Aph-1 and nicastrin. *J Biol Chem* 278, 37213-37222

Li A, Peng Y, Taiclet LM, Tanzi RE (2019): Analysis of hidradenitis suppurativa-linked mutations in four genes and the effects of PSEN1-P242LfsX11 on cytokine and chemokine expression in macrophages. *Hum Mol Genet* 28, 1173-1182

Li C, Li W, Xu H, Zhang X, Su B, Zhang W, Zhang X, Wang B (2017): PSENEN mutation carriers with co-manifestation of Acne Inversa (AI) and Dowling-Degos Disease (DDD): Is AI or DDD the subphenotype? *J Invest Dermatol* 137, 2234-2236

Li C, Xu H, Wang B (2018): Is SAPHO syndrome linked to PASH syndrome and hidradenitis suppurativa by Nicastrin mutation? A case report. *J Rheumatol* 45, 1605-1607

Li CR, Jiang MJ, Shen DB, Xu HX, Wang HS, Yao X, Zhang Y, Zhou WQ, Wang B (2011): Two novel mutations of the nicastrin gene in Chinese patients with acne inversa. *Br J Dermatol* 165, 415-418

Li D, Parks SB, Kushner JD, Nauman D, Burgess D, Ludwigsen S, Partain J, Nixon RR, Allen CN, Irwin RP et al. (2006): Mutations of presenilin genes in dilated cardiomyopathy and heart failure. *Am J Hum Genet* 79, 1030-1039

Li M, Cheng R, Liang J, Yan H, Zhang H, Yang L, Li C, Jiao Q, Lu Z, He J et al. (2013): Mutations in POFUT1, encoding protein O-fucosyltransferase 1, cause generalized Dowling-Degos disease. *Am J Hum Genet* 92, 895-903

Li YM, Lai MT, Xu M, Huang Q, DiMuzio-Mower J, Sardana MK, Shi XP, Yin KC, Shafer JA, Gardell SJ (2000): Presenilin 1 is linked with gamma-secretase activity in the detergent solubilized state. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 6138-6143

Lieschke GJ, Currie PD (2007): Animal models of human disease: zebrafish swim into view. *Nat Rev Genet* 8, 353-367

Lim A, Moussavi Nik SH, Ebrahimie E, Lardelli M (2015): Analysis of nicastrin gene phylogeny and expression in zebrafish. *Dev Genes Evol* 225, 171-178

Ling MM, Robinson BH (1997): Approaches to DNA mutagenesis: an overview. *Anal Biochem* 254, 157-178

Liu J, Fukunaga-Kalabis M, Li L, Herlyn M (2014): Developmental pathways activated in melanocytes and melanoma. *Arch Biochem Biophys* 563, 13-21

Liu ZJ, Shirakawa T, Li Y, Soma A, Oka M, Dotto GP, Fairman RM, Velazquez OC, Herlyn M (2003): Regulation of Notch1 and Dll4 by vascular endothelial growth factor in arterial endothelial cells: implications for modulating arteriogenesis and angiogenesis. *Mol Cell Biol* 23, 14-25

Lu P, Bai XC, Ma D, Xie T, Yan C, Sun L, Yang G, Zhao Y, Zhou R, Scheres SHW et al. (2014): Three-dimensional structure of human gamma-secretase. *Nature* 512, 166-170

Luca VC, Jude KM, Pierce NW, Nachury MV, Fischer S, Garcia KC (2015): Structural biology. Structural basis for Notch1 engagement of Delta-like 4. *Science* 347, 847-853

Lundkvist J, Naslund J (2007): Gamma-secretase: a complex target for Alzheimer's disease. *Curr Opin Pharmacol* 7, 112-118

Ma J, Yu Y, Yu G, Zhang F (2014): Identification of one novel mutation of the NCSTN gene in one Chinese acne inversa family. *Dermatol Sin* 32, 126-128

Mackintosh JA (2001): The antimicrobial properties of melanocytes, melanosomes and melanin and the evolution of black skin. *J Theor Biol* 211, 101-113

Meredith P, Riesz J (2004): Radiative relaxation quantum yields for synthetic eumelanin. *Photochem Photobiol* 79, 211-216

Meyskens FL, Jr., Farmer PJ, Anton-Culver H (2004): Etiologic pathogenesis of melanoma: a unifying hypothesis for the missing attributable risk. *Clin Cancer Res* 10, 2581-2583

Mohanty P, Jain S, Mohapatra L, Acharya S (2019): Dowling-Degos Disease - a novel presentation of an uncommon disease. *Indian Dermatol Online J* 10, 587-590

Morcos PA (2007): Achieving targeted and quantifiable alteration of mRNA splicing with Morpholino oligos. *Biochem Biophys Res Commun* 358, 521-527

Moriyama M, Osawa M, Mak SS, Ohtsuka T, Yamamoto N, Han H, Delmas V, Kageyama R, Beermann F, Larue L et al. (2006): Notch signaling via Hes1 transcription factor maintains survival of melanoblasts and melanocyte stem cells. *J Cell Biol* 173, 333-339

Mort RL, Jackson IJ, Patton EE (2015): The melanocyte lineage in development and disease. *Development* 142, 620-632

Muller CS, Pfohler C, Tilgen W (2009): Changing a concept--controversy on the confusing spectrum of the reticulate pigmented disorders of the skin. *J Cutan Pathol* 36, 44-48

Muller CS, Tremezaygues L, Pfohler C, Vogt T (2012): The spectrum of reticulate pigment disorders of the skin revisited. *Eur J Dermatol* 22, 596-604

Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H (1986): Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 51, 263-273

Munro S, Freeman M (2000): The notch signalling regulator fringe acts in the Golgi apparatus and requires the glycosyltransferase signature motif DXD. *Curr Biol* 10, 813-820

Murtaugh LC, Stanger BZ, Kwan KM, Melton DA (2003): Notch signaling controls multiple steps of pancreatic differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 14920-14925

Nichols SE, Jr., Reams WM, Jr. (1960): The occurrence and morphogenesis of melanocytes in the connective tissues of the PET/MCV mouse strain. *J Embryol Exp Morphol* 8, 24-32

Nishimura EK, Granter SR, Fisher DE (2005): Mechanisms of hair graying: incomplete melanocyte stem cell maintenance in the niche. *Science* 307, 720-724

Nornes S, Newman M, Wells S, Verdile G, Martins RN, Lardelli M (2009): Independent and cooperative action of Psen2 with Psen1 in zebrafish embryos. *Exp Cell Res* 315, 2791-2801

Orlacchio A, Kawarai T, Polidoro M, Stefani A, Orlacchio A, St George-Hyslop PH, Bernardi G (2002): Association analysis between Alzheimer's disease and the Nicastrin gene polymorphisms. *Neurosci Lett* 333, 115-118

Pamren A, Wanngren J, Tjernberg LO, Winblad B, Bhat R, Naslund J, Karlstrom H (2011): Mutations in nicastrin protein differentially affect amyloid beta-peptide production and Notch protein processing. *J Biol Chem* 286, 31153-31158

Park HY, Kosmadaki M, Yaar M, Gilchrist BA (2009): Cellular mechanisms regulating human melanogenesis. *Cell Mol Life Sci* 66, 1493-1506

Pink AE, Simpson MA, Brice GW, Smith CH, Desai N, Mortimer PS, Barker JN, Trembath RC (2011): PSENEN and NCSTN mutations in familial hidradenitis suppurativa (Acne Inversa). *J Invest Dermatol* 131, 1568-1570

Pinter A, Kokolakis G, Rech J, Biermann MHC, Haberle BM, Multmeier J, Reinhardt M (2020): Hidradenitis Suppurativa and concurrent Psoriasis: comparison of epidemiology, comorbidity profiles, and risk factors. *Dermatol Ther (Heidelb)* 10, 721-734

Plonka PM, Passeron T, Brenner M, Tobin DJ, Shibahara S, Thomas A, Slominski A, Kadekaro AL, Hershkovitz D, Peters E et al. (2009): What are melanocytes really doing all day long...? *Exp Dermatol* 18, 799-819

Podlisny MB, Citron M, Amarante P, Sherrington R, Xia W, Zhang J, Diehl T, Levesque G, Fraser P, Haass C et al. (1997): Presenilin proteins undergo heterogeneous endoproteolysis between Thr291 and Ala299 and occur as stable N- and C-terminal fragments in normal and Alzheimer brain tissue. *Neurobiol Dis* 3, 325-337

Ralser DJ, Basmanav FB, Tafazzoli A, Wititsuwannakul J, Delker S, Danda S, Thiele H, Wolf S, Busch M, Pulimood SA et al. (2017): Mutations in gamma-secretase subunit-encoding PSENEN underlie Dowling-Degos disease associated with acne inversa. *J Clin Invest* 127, 1485-1490

Rani S, Kumar R, Kumarasinghe P, Bhardwaj S, Srivastava N, Madaan A, Parsad D (2018): Melanocyte abnormalities and senescence in the pathogenesis of idiopathic guttate hypomelanosis. *Int J Dermatol* 57, 559-565

Riley PA (1997): Melanin. *Int J Biochem Cell Biol* 29, 1235-1239

Sabat R, Tsaousi A, Rossbacher J, Kurzen H, Fadai T, Schwichtenberg U, Schneider-Burrus S, Kokolakis G, Wolk K (2017): Acne inversa/Hidradenitis suppurativa: Ein Update. *Hautarzt* 68, 999-1006

Sardana K, Goel K, Chugh S (2013): Reticulate pigmentary disorders. *Indian J Dermatol Venereol Leprol* 79, 17-29

Seiji M, Fitzpatrick TB (1961): The reciprocal relationship between melanization and tyrosinase activity in melanosomes (melanin granules). *J Biochem* 49, 700-706

Shah S, Lee SF, Tabuchi K, Hao YH, Yu C, LaPlant Q, Ball H, Dann CE, 3rd, Sudhof T, Yu G (2005): Nicastrin functions as a gamma-secretase-substrate receptor. *Cell* 122, 435-447

Shao L, Luo Y, Moloney DJ, Haltiwanger R (2002): O-glycosylation of EGF repeats: identification and initial characterization of a UDP-glucose: protein O-glucosyltransferase. *Glycobiology* 12, 763-770

Shaya O, Binshtok U, Hersch M, Rivkin D, Weinreb S, Amir-Zilberstein L, Khamaisi B, Oppenheim O, Desai RA, Goodyear RJ et al. (2017): Cell-cell contact area affects Notch signaling and Notch-dependent patterning. *Dev Cell* 40, 505-511

Shirotani K, Edbauer D, Prokop S, Haass C, Steiner H (2004): Identification of distinct gamma-secretase complexes with different APH-1 variants. *J Biol Chem* 279, 41340-41345

Simon JD, Peles D, Wakamatsu K, Ito S (2009): Current challenges in understanding melanogenesis: bridging chemistry, biological control, morphology, and function. *Pigment Cell Melanoma Res* 22, 563-579

Slade DE, Powell BW, Mortimer PS (2003): Hidradenitis suppurativa: pathogenesis and management. *Br J Plast Surg* 56, 451-461

Slominski A, Tobin DJ, Shibahara S, Wortsman J (2004): Melanin pigmentation in mammalian skin and its hormonal regulation. *Physiol Rev* 84, 1155-1228

Spence R, Gerlach G, Lawrence C, Smith C (2008): The behaviour and ecology of the zebrafish, *danio rerio*. *Biol Rev Camb Philos Soc* 83, 13-34

Sprecher E, Indelman M, Khamaysi Z, Lugassy J, Petronius D, Bergman R (2007): Galli-Galli disease is an acantholytic variant of Dowling-Degos disease. *Br J Dermatol* 156, 572-574

Steel KP, Barkway C (1989): Another role for melanocytes: their importance for normal stria vascularis development in the mammalian inner ear. *Development* 107, 453-463

Stulberg DL, Clark N, Tovey D (2003): Common hyperpigmentation disorders in adults: Part I. Diagnostic approach, cafe au lait macules, diffuse hyperpigmentation, sun exposure, and phototoxic reactions. *Am Fam Physician* 68, 1955-1960

Subburaj K, Manjunath S, Sendhil Kumaran M (2019): Animal models in disorders of skin color – utilizing evolution and demystifying mysteries. *Pigment Int* 6, 9-17

Summerton J, Weller D (1997): Morpholino antisense oligomers: design, preparation, and properties. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev* 7, 187-195

Tabuchi K, Chen G, Sudhof TC, Shen J (2009): Conditional forebrain inactivation of nicastrin causes progressive memory impairment and age-related neurodegeneration. *J Neurosci* 29, 7290-7301

Takasugi N, Tomita T, Hayashi I, Tsuruoka M, Niimura M, Takahashi Y, Thinakaran G, Iwatsubo T (2003): The role of presenilin cofactors in the gamma-secretase complex. *Nature* 422, 438-441

van Tetering G, van Diest P, Verlaan I, van der Wall E, Kopan R, Vooijs M (2009): Metalloprotease ADAM10 is required for Notch1 site 2 cleavage. *J Biol Chem* 284, 31018-31027

Vetrivel KS, Zhang YW, Xu H, Thinakaran G (2006): Pathological and physiological functions of presenilins. *Mol Neurodegener* 1, 4

Wang B, Yang W, Wen W, Sun J, Su B, Liu B, Ma D, Lv D, Wen Y, Qu T et al. (2010): Gamma-secretase gene mutations in familial acne inversa. *Science* 330, 1065

Wolfe MS (2019): Dysfunctional gamma-Secretase in Familial Alzheimer's Disease. *Neurochem Res* 44, 5-11

Wolfe MS (2020): Unraveling the complexity of gamma-secretase. *Semin Cell Dev Biol* 105, 3-11

Wu C, Yang J, Zhang S, Li J, Jin H, Zhang X (2018): A novel NCSTN gene mutation in a Chinese family with acne inversa. *Mol Genet Genomics* 293, 1469-1475

Yajima I, Larue L (2008): The location of heart melanocytes is specified and the level of pigmentation in the heart may correlate with coat color. *Pigment Cell Melanoma Res* 21, 471-476

Yamaguchi Y, Brenner M, Hearing VJ (2007): The regulation of skin pigmentation. *J Biol Chem* 282, 27557-27561

Yamaguchi Y, Hearing VJ (2014): Melanocytes and their diseases. *Cold Spring Harb Perspect Med* 4, a017046

Yu G, Nishimura M, Arawaka S, Levitan D, Zhang L, Tandon A, Song YQ, Rogaeva E, Chen F, Kawarai T et al. (2000): Nicastrin modulates presenilin-mediated notch/glp-1 signal transduction and betaAPP processing. *Nature* 407, 48-54

Zhang X, Li Y, Xu H, Zhang YW (2014): The gamma-secretase complex: from structure to function. *Front Cell Neurosci* 8, 427

Zhang X, Zhang C, Prokopenko D, Liang Y, Han W, Tanzi RE, Sisodia SS (2020): Negative evidence for a role of APH1B T27I variant in Alzheimer's Disease. *Hum Mol Genet* 29, 955-966

Zhang YW, Luo WJ, Wang H, Lin P, Vetrivel KS, Liao F, Li F, Wong PC, Farquhar MG, Thinakaran G et al. (2005): Nicastrin is critical for stability and trafficking but not association of other presenilin/gamma-secretase components. *J Biol Chem* 280, 17020-17026

Zhou C, Wen GD, Soe LM, Xu HJ, Du J, Zhang JZ (2016): Novel mutations in PSENEN gene in two Chinese Acne Inversa families manifested as familial multiple comedones and Dowling-Degos Disease. *Chin Med J (Engl)* 129, 2834-2839

## Danksagung

An erster Stelle danke ich meinem Doktorvater Herrn Univ.-Prof. Dr. med. Jorge Frank, der mir die Durchführung dieser Dissertation in einem strukturierten und motivierten Umfeld ermöglichte. Seine herausragende Betreuung und die zahlreichen motivierenden Gespräche auf wissenschaftlicher, intellektueller und auch persönlicher Ebene werden mir stets als wichtiger, bereichernder und konstruktiver Austausch in Erinnerung bleiben. Ebenso möchte ich mich für die faszinierende Einführung in die Welt der Grundlagenforschung, Genetik und Dermatologie sehr herzlich bedanken.

Ebenso großer Dank gilt Herrn Priv.-Doz. Dr. rer. nat. Roland Dosch, der mich als Zweitbetreuer in nicht minderem Maße hervorragend bei der Durchführung der Zebrafischexperimente unterstützt und gefördert hat. Durch seine Begleitung und die des gesamten „Fisch-Labors“ ließen sich kleine und größere experimentelle Hürden überwinden, sodass die Motivation und Faszination nie verloren ging. An dieser Stelle möchte ich daher dem gesamten Fisch-Labor und insbesondere Roshan, Nadja, Gudrun und Hazem danken.

Innerhalb der Arbeitsgruppe von Herrn Univ.-Prof. Dr. med. Frank möchte ich mich bei Wiebke, Helena, Viktor und Anette für die Zusammenarbeit, Hilfe und das Feedback im Rahmen der regelmäßigen Besprechungen bedanken. Darüber hinaus danke ich auch der gesamten Forschungsgruppe der Klinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie unter der Leitung von Herrn Univ.-Prof. Dr. med. Michael P. Schön, Frau Prof. Dr rer. nat. Margarete Schön, Herrn Univ.-Prof. Dr. med. Jorge Frank und Herrn Univ.-Prof. Dr. med. Timo Buhl für ihr wichtiges Feedback sowie die zahlreichen Anregungen und interessanten Diskussionen im Rahmen der montäglichen Forschungsrunden.

Ferner danke ich Frau Dr. rer. nat. Fernanda Ramos-Gomes und Frau Prof. Dr. med. Frauke Alves aus dem Max-Planck-Institut für experimentelle Medizin für die Kooperation im Rahmen der In-vivo-Bildgebung.

Sowohl für die ideelle als auch finanzielle Förderung möchte ich mich bei der Studienstiftung des deutschen Volkes, Alfred-Marchionini-Stiftung, Deutschen Stiftung Dermatologie, Deutschen Dermatologischen Gesellschaft (DDG), Else-Kröner-Fresenius-Stiftung, Norddeutschen Dermatologischen Gesellschaft (NDG) und der Arbeitsgemeinschaft Dermatologische Forschung (ADF) bedanken.