Morbus Dowling-Degos

Molekulargenetische Untersuchungen zur Rolle des Notch-*Pathways* und hinsichtlich eines möglichen Foundereffektes

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

der Hohen Medizinischen Fakultät

der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität

Bonn

Sheetal Kumar

aus Bonn 2024 Angefertigt mit der Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

- 1. Gutachterin: Prof. Dr. med. Regina C. Betz
- 2. Gutachter: PD Dr. Osman El-Maarri

Tag der Mündlichen Prüfung: 27.06.2024

Aus dem Institut für Humangenetik Direktor: Prof. Dr. med. Markus M. Nöthen Meinen Eltern und Großeltern gewidmet

Inhaltsverzeichnis

Abkürz	bkürzungsverzeichnis			
1. Deu	tsche Zusammenfassung	7		
1.1	Einleitung	7		
1.2	Material und Methoden	13		
1.3	Ergebnisse	16		
1.4	Diskussion	20		
1.5	Zusammenfassung	25		
1.6	Literaturverzeichnis der deutschen Zusammenfassung	28		
2. Ve	röffentlichungen	37		
2.1	Publikation A	37		
2.2	Publikation B	40		
3. Da	inksagung	44		
4. Ak	ademische Laufbahn und Auszeichnungen	46		

Abkürzungsverzeichnis

bp	Basenpaare
cDNA	complementary Desoxyribonukleinsäure
DDD	Morbus Dowling-Degos
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ECD	extrazelluläre Domäne
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
ICD	intrazelluläre Domäne
kb	Kilobase
Mb	Megabase
MIM	Mendelian Inheritance in Man
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
PCA	principal component analysis
qPCR	quantitative Real-Time-PCR
RNA	Ribonukleinsäure
RNA-seq	RNA-Sequenzierung
siRNA	small interfering RNA
SNV	single nucleotide variant

1. Deutsche Zusammenfassung

1.1 Einleitung

Der Morbus Dowling-Degos (DDD, Mendelian Inheritance in Man (MIM) 179850, 615327, 615696, 613736) ist eine seltene, genetisch und klinisch heterogene Pigmentdermatose mit autosomal-dominantem Erbgang. Die Bezeichnung der Erkrankung als Morbus Dowling-Degos beziehungsweise *Dowling-Degos disease* (im Englischen) wurde 1978 von Jones und Grice geprägt (Jones und Grice, 1978) und geht auf die beiden Erstbeschreiber des DDD zurück - den britischen Dermatologen Geoffrey Barrow Dowling, der den DDD im Jahr 1938 erstmalig als klinische Entität abgrenzte (Dowling und Freudenthal, 1938) und den französischen Dermatologen Robert Degos, der den DDD unabhängig davon im Jahr 1954 als "Dermatose pigmentaire réticulée des plis" beschrieb (Degos und Ossipowski, 1954). Genaue Prävalenzen für den DDD sind nicht bekannt. Bisher konnten kausale Varianten in vier verschiedenen Krankheitsgenen identifiziert werden: Keratin 5 (*KRT5*) (Betz et al., 2006), Protein-O-Fukosyltransferase 1 (*POFUT1*) (Li et al., 2013), Protein-O-Glukosyltransferase 1 (*POGLUT1*) (Basmanav et al., 2014), sowie Presenilin Enhancer, Gamma-Secretase Subunit (*PSENEN*) (Ralser et al., 2017), die für die Proteine KRT5, POFUT1, POGLUT1 und PEN-2 kodieren.

Klinisch manifestiert sich der DDD mit retikulären Hyperpigmentierungen und kleinen hyperkeratotischen dunkel-bräunlichen Papeln mit Erkrankungsbeginn im postpubertärem Alter und Progredienz bis ins hohe Alter (Betz et al., 2006). Die Lokalisation der Effloreszenzen ist hierbei abhängig von dem mutierten zugrundeliegenden Gen. Während eine Manifestation im Bereich des Gesichtes, des Halses und des Rumpfes ein gemeinsames Merkmal aller DDD-Patient*innen darstellt, existieren basierend auf einer Genotyp-Phänotyp-Korrelation je nach zugrundeliegender genetischer Veränderung vier DDD-Subtypen (MIM 179850, 615327, 615696, 613736). So zeigen Patient*innen mit pathogenen Varianten in *KRT5* in der Regel hyperpigmentierte Intertrigines, Patient*innen mit *POFUT1*-Varianten eine akro-genitale Beteiligung und Patient*innen mit *POGLUT1*-Varianten besteht zudem bei Vorliegen gewisser Triggerfaktoren (Nikotinabusus und/oder Adipositas) eine erhöhte Suszeptibilität, eine Hidradenitis suppurativa als Komorbidität zu entwickeln (Ralser et al., 2017). Bei autosomalem Erbgang sind Frauen und Männer gleichermaßen von einem DDD betroffen. Der klinische Phänotyp und die Expressivität der Erkrankung können jedoch erheblich variieren. So ist selbst bei Familienangehörigen mit der identischen ursächlichen genetischen Variante eine starke klinische Heterogenität beschrieben (Hanneken et al., 2011). Auch das histologische Bild des DDD ist heterogen (Kumar et al., 2023b). Zu den histopathologischen Charakteristika, die regelmäßig in den betroffenen Hautarealen vorliegen, zählen eine Verschmälerung der suprapapillären Epidermis sowie in das Korium gerichtete fingerförmige Ausziehungen der epidermalen Reteleisten mit einer Melaninablagerung in deren basalen Anteilen (Betz et al., 2006). Aus der Heterogenität des Krankheitsbildes resultiert ein diverses Spektrum möglicher klinischer/histologischer Differentialdiagnosen eines DDD. Als Beispiele für andere retikuläre Pigmentdermatosen sind eine Dyschromatosis universalis hereditaria und die retikuläre Akropigmentierung von Kitamura zu nennen (Zhang et al., 2017). Darüber hinaus können sich aber auch weitere Erkrankungen, wie eine Acanthosis nigricans oder ein Morbus Darier (Stephan et al., 2021; Zhang et al., 2017) wie ein DDD präsentieren. Auch wenn es sich beim DDD um keine Erkrankung handelt, die letal ist oder die

Lebenserwartung beeinflusst, kann individuell ein ausgeprägter Leidensdruck bestehen. So leiden einige DDD-Patient*innen unter einem starken Juckreiz, einem brennenden Hautgefühl (Betz et al., 2006) oder unter entzündlichen Hautveränderungen. Auch kann die Sichtbarkeit der Erkrankung mit einer psychosozialen Belastung und einer Stigmatisierung der Betroffenen einhergehen.

Bislang existiert kein kausales therapeutisches Konzept für die Behandlung des DDD. In Einzelfallbeschreibungen wurden gute klinische Resultate durch den Einsatz eines Erbium:YAG-Lasers erzielt (Wenzel et al., 2002). Bei einer solchen ablativen Laserbehandlung können jedoch auch unerwünschte Wirkungen resultieren; so besteht beispielsweise die Gefahr einer postinflammatorischen Hyperpigmentierung als Nebenwirkung (AWMF, 2022). Das Risiko ist insbesondere bei Menschen mit dunkler Hautfarbe erhöht (Yun et al., 2013).

Um kausale Therapieansätze entwickeln zu können, ist es von entscheidender Bedeutung, die molekularbiologischen Zusammenhänge, die an der Entstehung von einem DDD beteiligt sind, tiefgreifender zu verstehen. Trotz Kenntnis der Krankheitsgene, sind die zugrundeliegenden molekularen Mechanismen, die zu dem Erscheinungsbild eines DDD führen, bislang ungeklärt. Zunehmend wird jedoch dem Notch-Signaltransduktionsweg eine zentrale Bedeutung in der Pathogenese der Erkrankung zugesprochen.

Der Notch-Signaltransduktionsweg ist ein evolutionär hochkonserviertes Signalsystem und zählt neben Hedgehog (Hh), wingless related (Wnt), Transforming Growth Factor-β (TGF-β), Rezeptor-Tyrosinkinase (RTK), Januskinase (JAK) / Signal Transducer and Activator of Transcription (STAT) sowie nukleären Hormonrezeptor-vermittelten Transduktionskaskaden zu den Signalwegen, die für die Evolution von Metazoen von essentieller Bedeutung sind (Pires-daSilva und Sommer, 2003). So ist der Notch-Pathway in der Embryogenese sowie im adulten Organismus in einem breiten Spektrum von Zelltypen an vielfältigen entwicklungsbiologischen Prozessen beteiligt und reguliert durch die Interaktion zwischen dem Notch-Rezeptor auf der Oberfläche einer Zelle und dessen membranständigen Liganden auf der Oberfläche einer anderen Zelle grundlegende zelluläre Mechanismen, wie die Differenzierung, Proliferation, Apoptose oder den Erhalt von Stammzellen (Sachan et al., 2023; Simpson, 1998). Störungen im Notch-Signaltransduktionsweg können durch gain of function- oder loss of function-Varianten bedingt sein und haben Entwicklungsstörungen, Erkrankungen und Onkogenese zur Folge (Siebel und Lendahl, 2017). Die Bezeichnung des Signalweges geht auf Thomas Hunt Morgan zurück, der im Jahre 1917 eine Mutation in dem für den Notch-Rezeptor kodierenden Gen in der Fruchtfliege Drosophila melanogaster entdeckte, die phänotypisch in notches (eng. Kerben) an den Flügelrändern resultierte (Mohr, 1919; Morgan, 1916, 1917).

Während es in *Drosophila melanogaster* nur einen Notch-Rezeptor gibt, existieren in Säugetieren vier homologe Rezeptoren (Notch1-4), die als Transmembranproteine vorliegen und zwei Domänen aufweisen: eine extrazelluläre Domäne (ECD), die mit den Liganden auf den benachbarten Zellen interagiert, und eine intrazelluläre Domäne (ICD), die als Signalübermittler fungiert (Sachan et al., 2023). Die Rezeptorproteine werden im endoplasmatischen Retikulum zunächst als Vorläuferproteine synthetisiert, bevor im endoplasmatischen Retikulum und im Golgi-Apparat posttranslationale Modifikationen der ECD erfolgen, die für die korrekte Faltung der Notch-Rezeptoren und für ihre Interaktion mit ihren Liganden entscheidend sind (Wang et al., 2022). An dieser Modifikation sind auch die durch *POFUT1* und *POGUT1* kodierten Proteine O-Fukosyltransferase und O-

Glukosyltransferase beteiligt (Basmanav et al., 2014; Fortini, 2009). Der fertige Notch-Rezeptor wird schließlich durch eine Furin-ähnliche Protease im trans-Golgi Netzwerk gebildet, die die proteolytische Spaltung des Vorläuferproteins in die beiden Domänen, ECD und ICD, an der S1-Spaltstelle katalysiert. Anschließend wird der Notch-Rezeptor als aus der ECD und der ICD bestehendes Heterodimer, welches durch nicht-kovalente Wechselwirkungen zusammengehalten wird, an die Zelloberfläche transportiert (Gordon et al., 2009; Kopan, 2012; Logeat et al., 1998).

Bei den Liganden für die Notch-Rezeptoren handelt es sich ebenfalls um Transmembranproteine. Während in *Drosophila melanogaster* zwei Liganden existieren (Delta und Serrate), liegen in Säugetieren fünf entsprechende Proteinhomologe aus zwei Liganden-Subfamilien vor: Delta-like (DII1, DII3, DII4) und Jagged (Jagged 1, Jagged 2) (Wang, 2022). Zusammen mit den LAG-2 Liganden (in *Caenorhabditis elegans*) bilden sie die DSL-Liganden-Familie (<u>D</u>elta, <u>S</u>errate, <u>L</u>AG-2) (Sachan et al., 2023).

Die extrazelluläre Bindung eines Liganden der DSL-Familie an die ECD des Notch-Rezeptors einer Nachbarzelle aktiviert den Rezeptor durch eine Rezeptor-Liganden-Wechselwirkung und induziert zwei weitere proteolytische Prozesse innerhalb des Rezeptorproteins: Zunächst erfolgt die Abspaltung des extrazellulären Teils des Rezeptors durch ein Mitglied der ADAM-Familie (<u>a</u> disintegrin <u>and m</u>etalloprotease), ADAM10 oder TACE (Tumor necrosis factor (TNF) alpha - converting enzyme) / ADAM17 an der S2-Spaltstelle (Bray, 2006; Toonen et al., 2016). Dieser wird im Anschluss durch die Liganden-exprimierende Zelle endozytiert. Die dritte proteolytische Spaltung wird anschließend durch den Gamma-Sekretase-Komplex (Präsenilin, Nicastrin, PEN-2 und APH-1) vermittelt, und setzt die ICD durch Spaltung an der S3-Spaltstelle in das Zytoplasma frei. Diese kann nun in den Nukleus translozieren, und dort die Transkription der nachgeschalteten Zielgene durch Interaktion mit einem Transkriptionsfaktor der CSL-Familie (<u>C</u>BF in Säugetieren/RBPJ-κ in der Maus, <u>S</u>uppressor of Hairless (Su(H)) in *Drosophila,* Lag1 in *Caenorhabditis elegans*) regulieren (Sachan et al., 2023).

Die Tatsache, dass, mit der Ausnahme von *KRT5*, alle für einen DDD bekannten Gene (*POFUT1*, *POGLUT1* und *PSENEN*) direkt an der Notch-Signaltransduktion beteiligt sind, legt die Hypothese nahe, dass der Phänotyp in DDD-Patient*innen auf einen gemeinsamen Pathomechanismus und ein nachgeschaltetes Target *downstream* des

Notch-Signalwegs zurückzuführen ist. Für das Gen KRT5 ist bekannt, dass dessen Expressionsverlust in einer veränderten Notch-Expression resultiert (Alam et al., 2011) und über eine verringerte Expression von Notch-Liganden in Keratinozyten zu einer Abnahme der Notch-Aktivität in Melanozyten führt (Jia et al., 2023). Einen weiteren Hinweis auf einen möglichen Zusammenhang zwischen dem Notch-Pathway und der Pigmentierung der Haut liefert der Nachweis von pathogenen Varianten in der Disintegrinund Meltalloprotease ADAM10 in Patient*innen mit der klinisch ähnlichen retikulären Akropigmentierung von Kitamura (Kono et al., 2013). In Studien, die diesen Zusammenhang näher untersuchten, konnte nach knockdown des Gens POFUT1 in Zebrafisch-Larven und in Zellen keratinozytären Ursprungs (Li et al., 2013) bzw. nach knockdown des Gens POGLUT1 in Zellen melanozytären Ursprungs in unserer Arbeitsgruppe (Ralser et al., 2019) bereits eine differentielle Expression von einzelnen Genen der Notch-Signaltransduktion nachgewiesen werden. Bislang wurden die Auswirkungen eines Gen-knockdowns allerdings nur im Hinblick auf ausgewählte Gene des Notch-Signalwegs untersucht. Die Etablierung der Next-Generation-Sequencing-Technologie, insbesondere der 3'-mRNA-Sequenzierung (RNA-Sequenzierung, RNA-Seq), bietet die Möglichkeit, Transkriptionsveränderungen sämtlicher Gene mittels unvoreingenommener Transkriptom-Sequenzierung zu untersuchen und erlaubt somit die Entschlüsselung eines möglichen gemeinsamen zugrundeliegenden Pathomechanismus für den DDD.

Die vorliegende Dissertation verfolgt als primären Schwerpunkt das Ziel eines besseren Verständnisses der Pathogenese des DDD und somit auch der molekularen Grundlagen von Pigmentierungsprozessen in der Haut. Als ursächlicher Pathomechanismus für pathogene Varianten in KRT5, POFUT1, POGLUT1 und PSENEN wird eine Haploinsuffizienz angenommen (Basmanav et al., 2014; Betz et al., 2006; Li et al., 2013; Ralser et al., 2017). Um die Bedeutung einer POGLUT1- beziehungsweise PSENEN-Defizienz im Notch-Pathway näher zu untersuchen, sollen siRNA-vermittelte knockdown-Experimente durchgeführt werden. Als Zelllinien dienen humane immortalisierte Keratinozyten (HaCaT) sowie Zellen melanozytären Ursprungs (MZ7-mel), da sie die beiden wichtigsten Zelltypen in der Haut repräsentieren. Die Folgen des knockdowns sollen mittels einer RNA-Sequenzierung und nachfolgender Analyse der differentiellen Expression und von Pathway-Analysen sowie funktionell mittels eines

Enzymimmunoassays untersucht werden. Von diesen Studien haben wir wichtige neue Erkenntnisse zu den molekularen Grundlagen des DDD und der Hautpigmentierung im Allgemeinen erwartet.

Als zweiter Schwerpunkt der vorliegenden Dissertation wird die Fragestellung beleuchtet, ob den häufigen, für einen DDD ursächlichen Varianten ein Foundereffekt zugrunde liegt. Gegenwärtig überblicken wir in unserer DDD-Kohorte mehr als 120 betroffene Familien mit pathogenen Varianten in den Genen KRT5, POGLUT1, POFUT1 und PSENEN (Basmanav et al., 2015; Basmanav et al., 2014; Betz et al., 2006; Ralser et al., 2017; Ralser et al., 2019). Darunter sind uns acht rekurrente Varianten in den Genen KRT5 und POGLUT1 bekannt, die in bis zu 18 Individuen aus verschiedenen, nicht miteinander verwandten Familien nachgewiesen wurden. Als Erklärung für häufige genetische Varianten gibt es im Allgemeinen zwei Mechanismen: sie können auf einen gemeinsamen Vorfahren zurückgehen und dementsprechend einen Foundereffekt widerspiegeln - oder aber durch einen *mutative hot spot bedingt* sein, also an einer Stelle lokalisiert sein, an der sich besonders häufig Mutationen ereignen (Shinagawa et al., 2020). Um zu untersuchen, ob es sich bei den rekurrenten DDD-Varianten in KRT5 und POGLUT1 um Founder-Varianten handelt, sollen nach einer Genotypisierung der betroffenen Patient*innen Haplotypanalysen der Regionen um die beiden Gene KRT5 und POGLUT1 erfolgen.

In der anschließenden Ausführung werden die beiden folgenden Originalarbeiten zusammengefasst, welche die Grundlage für die vorliegende Inauguraldissertationsschrift darstellen.

Publikation A:

Kumar S, Hausen J, Sivalingam S, Humbatova A, Buness A, Frank J, Ralser DJ, Betz RC. Altered Notch signalling in Dowling-Degos disease: A transcriptomic insight into disease pathogenesis. **Br J Dermatol.** 2023b; 189:772-774

Publikation B:

Kumar S, Borisov O, Maj C, Ralser DJ, Humbatova A, Hanneken S, Schmieder A, Groß J, Maintz L, Heineke A, Knuever J, Fagerberg C, Parmentier L, Anemüller W, Oji V, Tantcheva-Poór I, Fölster-Holst R, Wenzel J, Krawitz PM, Frank J, Betz RC. Founder

Variants in KRT5 and POGLUT1 Are Implicated in Dowling-Degos Disease. J Invest Dermatol. 2024; 144:181-184

1.2 Material und Methoden

Publikation A

1.2.1 Zellkultur und verwendete Zelllinien

Die Arbeiten in der Zellkultur wurden in einem S1 Labor des Instituts für Humangenetik des Universitätsklinikums Bonn durchgeführt. Als Zelllinien wurden humane immortalisierte Keratinozyten (HaCaT) sowie humane Zellen melanozytären Ursprungs (MZ7-mel) verwendet. Beide Zelllinien wurden nach dem Auftauen in Dulbecco's modified minimal essential medium (DMEM, Gibco) mit 10 % Fetalem Kälber-Serum (FKS) kultiviert. Die Inkubation der Zelllinien erfolgte im HeraCell 240 Inkubator (Thermo Scientific) bei 37 °C und 5% CO2. Sie wurden in regelmäßigen, ihrem jeweiligen Wachstumsverhalten angepassten Abständen nach Standardmethoden passagiert.

1.2.2 siRNA-vermittelter knockdown von POGLUT1 und PEN-2

Um *loss of function*-Varianten zu modulieren, sollte die Expression von *POGLUT1* und *PSENEN* sowie nachfolgend deren Proteinumsetzung unterbunden werden. Für den transienten *knockdown* von POGLUT1 und PEN-2 wurden jeweils vier verschiedene kommerzielle siRNAs (QIAGEN) für die beiden Zielgene erworben (POGLUT1: siRNA-1 (SI04194022), siRNA-2 (SI04212019), siRNA-3 (SI04217885) siRNA-4 (SI04346573); PEN-2: siRNA-1 (SI03084956), siRNA-2 (SI00157570), siRNA-3 (SI00157584), siRNA-4 (SI02648947), Hinweis: in der Publikation gibt es andere Bezeichnungen der siRNAs). Als Kontrolle diente in beiden Zelllinien eine *scrambled* siRNA, die keine genomische Zielsequenz im Transkriptom aufweist (SI03650318, QIAGEN). Die Transfektion beider Zelllinien erfolgte mittels Lipofektion unter Verwendung von Lipofectamine RNAiMAX (Invitrogen) mit jeweils einer *knockdown*- oder Kontroll-siRNA. Das Protokoll der Transfektion wurde an dem Protokoll der Firma Invitrogen angelehnt.

1.2.3 Validierung des knockdowns

Die RNA wurde aus den *knockdown*- und Kontrollzellen mittels miRNeasy Mini Kit (QIAGEN) isoliert. Anschließend erfolgte eine reverse Transkription mit der reversen MMLV-Transkriptase SuperScript III (Invitrogen). Für die quantitative Real-Time-PCR (qPCR) fand in dieser Arbeit EvaGreen (Biotium) Anwendung - ein Fluoreszenzfarbstoff, der an die synthetisierte doppelsträngige DNA bindet. Die gemessene Erhöhung der Fluoreszenzintensität ist demnach proportional zur Menge des hergestellten PCR-Produkts. Je höher die anfängliche Kopienzahl der Ausgangs-DNA (Matrize), desto früher wird ein signifikanter Anstieg der Fluoreszenz beobachtet. Der cycle threshold (Ct)-Wert entspricht dabei dem Zyklus, in dem erstmals ein exponentieller Fluoreszenzanstieg gemessen wird. Die Ermittlung der *knockdown*-Effizienz der einzelnen siRNAs erfolgte unter Einsatz der $\Delta\Delta$ Ct-Methode (Livak und Schmittgen, 2001). Als Referenzgen diente *GAPDH*.

1.2.4 RNA-Sequenzierung mit nachfolgender Analyse der differentiellen Expression sowie einer *Pathway*-Analyse

Die Folgen des POGLUT1 bzw. PEN-2 *knockdowns* wurden in einem nächsten Schritt mittels 3'-mRNA-Sequenzierung (RNA-Sequenzierung, RNA-Seq) näher untersucht. Hierzu wurde die RNA, wie zuvor für die Validierung, aus den *knockdown*- und Kontrollzellen mittels miRNeasy Mini Kit (QIAGEN) isoliert und quantifiziert. Die Bibliotheken wurden mit dem QuantSeq 3'-mRNA-Seq-Kit von Lexogen vorbereitet. Die Sequenzierung erfolgte durch die NGS Core Facility (Universitätsklinikum Bonn) auf dem HiSeq 2500 V4 mit einer Leselänge von 1x50 bp, und einer Generation von durchschnittlich von 10 Millionen raw reads pro Probe. Die Bereitstellung der differentiellen RNA-seq-Daten und der PCA erfolgte durch die Core Unit for Bioinformatics Data Analysis (CUBA). Die Analyse der differentiellen Expression wurde zunächst getrennt für jeweils beide Gene in beiden Zelllinien (Gen-*knockdown* versus Kontrolle) durchgeführt. Um mögliche, gemeinsame *downstream* Effekte für Träger*innen von *POGLUT1-* oder *PSENEN*-Varianten zu untersuchen, wurden die POGLUT1- und PEN-2-*knockdowns* anschließend in je einem Datensatz für eine Zelllinie kombiniert und die jeweils 250 signifikantesten Gene einer Zelllinie einer *Pathway*-Analyse zugeführt. Die

Analyse der Daten erfolgte mittels PANTHER unter Verwendung von Reactome als Annotationsdatenbank.

1.2.5 Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Um funktionell zu untersuchen, inwieweit die Aktivität des Notch-*Pathways* in Folge des POGLUT1- beziehungsweise PEN-2- *knockdowns* verändert ist, wurden *knockdown* und Kontroll-HaCaT- bzw. MZ7-mel-Zellen mit Hilfe eines Sandwich-ELISAs (PathScan Cleaved Notch1 Sandwich ELISA Kit, Cell Signal Technology) analysiert. Dieser ELISA detektiert spezifisch die ICD des Notch1-Rezeptors, nachdem diese durch die Gamma-Sekretase abgespalten wird und dient so zur Beurteilung der Aktivität des Notch-*Pathways*. Die hierfür benötigten Zelllysate wurden entsprechend des Hersteller-Protokolls generiert.

Publikation B:

1.2.6 Patient*innen und Familien

Die vorliegende Studie wurde von der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Universität Bonn genehmigt (Lfd. Nr. 105/14) und nach den Prinzipien der Deklaration von Helsinki durchgeführt. Die Studienteilnehmer*innen hatten im Vorfeld der Studie ihr schriftliches Einverständnis zur genetischen Analyse ihrer DNA gegeben. In die Studie wurden 39 nicht miteinander verwandte DDD-Patient*innen bzw. Familien mit rekurrenten, pathogenen Varianten in den Genen *KRT5* (c.418dup; (p.IIe140Asnfs*39)) und *POGLUT1* (c.652C>T;(p.Arg218*), c.798-2A>C, c.835C>T;(p.Arg279Trp), c.1051C>T;(p.Gln351*), c.205C>T;(p.Arg69*), c.1080_1081insG;(p.Asn361Glufs*5), c.11G>A;(p.Trp4*)) eingeschlossen. Aus betroffenen Familien wurde jeweils nur ein Familienmitglied genotypisiert.

1.2.7 Genotypisierung, Phasing und Haplotyp-Analyse

Die DNA der Studienteilnehmer*innen lag bereits extrahiert vor. Die Genotypisierung erfolgte mittels dem Infinium Global Screening Array (Ilumina GSAMD24 v2.0) entsprechend des Infinium HTS Assay-Protokolls durch die Life&Brain GmbH. Phasing der Daten wurde mit Eagle 2.4.1 (Loh et al., 2016) durchgeführt. Als Referenzpanel dienten hierbei die 1000 Genomes Phase 3-Daten (Auton et al., 2015). Die Rekonstruktion

der jeweiligen Haplotypen erfolgte anschließend in einer 10 Mb großen Region um *KRT5* auf dem langen Arm von Chromosom 17 (jeweils 5 Mb *up*- beziehungsweise *downstream* der rekurrenten Variante) und in einer 2 Mb großen Region um *POGLUT1* auf dem langen Arm von Chromosom 3 (jeweils 1 Mb *up*- beziehungsweise *downstream* der rekurrenten Varianten). Phasing und Haplotyp-Rekonstruktion wurde durch das Institut für Genomische Statistik und Bioinformatik (IGSB) durchgeführt. Anschließend wurden die Haplotypen, ausgehend von der Position der jeweiligen pathogenen Variante, hinsichtlich eines möglichen, gemeinsam vorliegenden Haplotyp-Blocks *up*- und *downstream* analysiert. Hierfür wurden die phasierten Daten mit Hilfe von R (Version 3.6.1) und der WriteXLS-Bibliothek vom vcf-Format in das xlsx-Format konvertiert.

1.3 Ergebnisse

Publikation A:

Um loss of function-Varianten zu modulieren, wurde die Expression jeweils eines der beiden Gene, POGLUT1 und PSENEN, mittels siRNA-vermitteltem transientem knockdown sowohl in der humanen Keratinozyten-Zelllinie HaCaT als auch in der von Melanozyten abgeleiteten Zelllinie MZ7-mel herunterreguliert. Je Zielgen wurden zunächst vier verschiedene, kommerzielle siRNAs verwendet (Abb. 1 und 2), um nach erfolgreicher Validierung der Transfektion die jeweils beiden effizientesten siRNAs für die RNA-seq-Experimente zu wählen: In beiden Zelllinien handelte es sich hierbei jeweils um die siRNA-1 und siRNA-3 für POGLUT1 und PSENEN. In der keratinozytären Zelllinie wurde dabei eine Reduktion der Expression von POGLUT1 um 98% (siRNA-1) und 82% (siRNA-3) erzielt. Für PSENEN zeigte nur eine der vier verwendeten siRNAs eine ausreichend hohe Effizienz in den HaCaT-Zellen mit 90% (siRNA-3); für diese Konstellation erfolgte die RNA-seq-Analyse daher ausschließlich mit einer siRNA. In der melanozytären Zelllinie wurden knockdown-Effizienzen von 94% und 84% für POGLUT1 (siRNA-1 und siRNA-3), sowie von 93% und 59% für PSENEN (siRNA-3 und siRNA-1) erreicht. Die Herunterregulierung der Zielgene war für alle ausgewählten siRNA-Moleküle hochsignifikant.



Abb. 1: Validierung des *knockdowns* in HaCaT-Zellen mittels qPCR: Erfolgreicher *knockdown* bei allen *POGLUT1*-siRNAs sowie bei der *PSENEN*-siRNA-1 und -siRNA-3. * $p \le 0.05$; ** $p \le 0.01$; *** $p \le 0.001$; **** $p \le 0.0001$. Modifiziert nach Kumar et al., 2023b



Abb. 2: Validierung des *knockdowns* in MZ7-mel-Zellen mittels qPCR: Erfolgreicher *knockdown* bei allen *POGLUT1*-siRNAs sowie bei der *PSENEN*- siRNA-1, -siRNA-3 und -siRNA-4. * $p \le 0.05$; ** $p \le 0.01$; *** $p \le 0.001$; **** $p \le 0.0001$. Modifiziert nach Kumar et al., 2023b

Nach Validierung des erfolgreichen *knockdowns* wurde der Einfluss der POGLUT1- bzw. PEN-2-Defizienz auf das Transkriptom mittels 3'-mRNA-Sequenzierung untersucht. Die Hauptkomponentenanalyse der RNA-seq-Daten (Principal component analysis, PCA) zeigte eine gute Zusammenlagerung der Replikate der jeweiligen siRNAs mit einer klaren Differenzierung der RNA-Profile der Kontrollzellen einerseits und der *knockdown*-Proben andererseits. Im Vergleich dazu wiesen die Zellen der *POGLUT1*- und *PSENEN* *knockdowns* untereinander einen subtileren Unterschied und somit zueinander ähnlichere RNA-Profile auf (Figure 1a in Kumar et al., 2023b). Eine Ausnahme stellte die *POGLUT1*siRNA-1 dar, die weder mit den Kontrollzellen noch mit den anderen *knockdown*-Zellen clusterte. Da die entsprechenden siRNA1-*knockdown*-Zellen bereits in der Zellkultur morphologische Anomalien nach der Transfektion zeigten, die auf *off target*-/Toxizitätseffekte der siRNA zurückzuführen sein könnten, wurden die entsprechenden Proben von der weiteren Analyse ausgeschlossen.

Die Analyse der differentiellen Expression erfolgte zunächst getrennt für POGLUT1 und PSENEN in beiden Zelllinien (Gen-knockdown versus Kontrolle). Ein besonderes Augenmerk lag hier auf den Notch Pathway-assoziierten Genen. Wie aus Figure 1b (Kumar et al., 2023b) hervorgeht, beeinflusste die Defizienz von POGLUT1 oder PEN2 die Expression von multiplen Mitgliedern des Notch-Signaltransduktionswegs in beiden Zelllinien. Die verminderte Expression von POGLUT1 führte genauso wie die verminderte Expression von PSENEN zu einer ähnlichen differentiellen Expression der entsprechenden Gene in der melanozytären Zelllinie. Um die mittels differenzieller Genexpressionsanalyse identifizierten Gene auf funktionelle Zusammenhänge zu überprüfen, wurden sie im nächsten Schritt einer Pathway-Analyse zugeführt. Für die Analysen der Signalwege wurde PANTHER verwendet, als Annotationsdatenbank diente Reactome. In Anbetracht der Hypothese eines gemeinsamem nachgeschalteten targets von POGLUT1- und PSENEN-Varianten, wurden zuvor die Daten der POGLUT1- und PEN-2-knockdowns in je einen Datensatz für jede Zelllinie kombiniert, um eine mögliche gemeinsame Endstrecke zu untersuchen. Insgesamt konnten bei dieser Analyse zehn verschiedene signifikant überrepräsentierte Signalwege identifiziert werden - sechs Signalwege in den HaCaT-Zellen sowie vier Signalwege in den MZ7-mel-Zellen (Figure 1c in Kumar et al., 2023b). Während sich die Mitglieder des Notch-Signalwegs als die am stärksten überrepräsentierten Transkripte in den MZ7-mel-Zellen darstellten, fand sich im Gegensatz dazu keine signifikante Anreicherung der relevanten Transkripte in den HaCaT-Zellen. Darüber hinaus zeigte sich ausschließlich in den MZ7-mel Zellen eine Anreicherung folgender drei Signalwege: Östrogen-Signalrezeptor (ESR) signaling, Rezeptor-Tyrosinkinase signaling und membrane trafficking. Sie alle sind bereits in der Literatur in Verbindung mit Pigmentierungsprozessen beschrieben. Für die sechs in HaCaT-Zellen signifikanten Signaltransduktionswege, ist kein spezifischer

Zusammenhang mit einer Pigmentstörung erkennbar. Kein Signalweg war in beiden Zelllinien gemeinsam überrepräsentiert.

Um die Aktivität des Notch-Signalwegs auf funktioneller Ebene zu ermitteln, erfolgte eine Analyse der *knockdown*- und Kontrollzellen mittels eines Enzymimmunoassays, der spezifisch das endogene Level der ICD des Notch1-Rezeptors detektiert, nachdem diese durch die Gamma-Sekretase proteolytisch abgespalten wird und somit Rückschlüsse auf die Aktivität des *Pathways* in den Zellen erlaubt. Hierbei ließ sich in den MZ7-mel-Zellen eine signifikante Abnahme der Notch-Aktivität bei *POGLUT1-* bzw. *PSENEN*-Defizienz nachweisen (Figure 1d in Kumar et al., 2023b) und somit das Ergebnis der *Pathway-*Analyse validieren. Die Stärke der Abnahme korrelierte hierbei mit den durch die qPCR und RNA-seq bestimmten *knockdown*-Effizienzen der jeweiligen siRNAs. Im Gegensatz dazu wurde in den HaCaT-Zellen, ebenfalls im Einklang mit den Ergebnissen der Signalweg-Analyse, weder eine Notch-Grundaktivität in den Kontrollzellen (Abbildung 1d in Kumar et al., 2023b) noch eine Aktivität in den *knockdown*-Proben festgestellt.

Basierend auf diesen Untersuchungen an Zellen keratinozytären und melanozytären Ursprungs wird beim DDD als gemeinsam zugrundeliegender Pathomechanismus eine veränderte Notch-Signaltransduktion in den Melanozyten postuliert.

Publikation B:

Die rekurrente Variante c.418dupA;(p.Ile140Asnfs*39) in KRT5 wurde bei 18 betroffenen Individuen aus Deutschland in unserer Kohorte identifiziert (Figure 1a in Kumar et al., 2024). Zwischen den 18 Familien liegen laut unseren Informationen keine verwandtschaftlichen Beziehungen vor. Nach Rekonstruktion der jeweiligen Haplotypen in einer 10 Mb großen Region um KRT5 auf dem langen Arm des Chromosoms 17 wurden bei allen Betroffenen insgesamt 1.420 Marker analysiert, die eine Region von etwa 6,1 Mb zwischen der Einzelnukleotid-Veränderung (single nucleotide variant, SNV) rs2544039 und der SNV rs1867299 umspannen. Ziel war die Identifikation eines möglichen gemeinsam vorliegenden Haplotyps, der die Hypothese eines zugrundeliegenden Foundereffektes stützt. Bei allen Patient*innen mit der o.g. KRT5-Variante zeigte sich ein minimaler gemeinsamer Haplotyp von etwa 150 kb zwischen den SNVs rs61730590 und rs199845547, einschließlich aller 10 intragenischen Marker und 62 extragenischer Marker (Figure 1b und Table 1 in Kumar et al., 2024). Der maximal

nachgewiesene gemeinsame Haplotyp belief sich auf 6,1 Mb mit 1.418 gemeinsamen Markern.

Auch in POGLUT1 wurden in unserer Kohorte sieben rekurrente Varianten in insgesamt 21 Fällen aus Deutschland, Dänemark und der Schweiz identifiziert: c.652C>T (p.Arg218*), c.798-2A>C, c.835C>T (p.Arg279Trp), c.1051C>T (p.Gln351*), c.205C>T (p.Arg69*), c.1080_1081insG (p.Asn361Glufs*5) und c.11G>A (p.Trp4*). Auch hier bestanden keine bekannten verwandtschaftlichen Verhältnisse zwischen den einzelnen Familien mit der identischen genetischen Variante. Die Rekonstruktion der Haplotypen erfolgte in allen Fällen in einer 2 Mb großen Region um POGLUT1 auf dem langen Arm von Chromosom 3. Die Träger*innen der frequenten POGLUT1-Varianten teilten je nach vorliegender Variante einen minimalen gemeinsamen Haplotyp von etwa 60 kb bis 1 Mb, der alle sieben intragenische und bis zu 246 extragenische Marker umfasste (Table 1 in (Kumar et al., 2024). Eine Besonderheit stellte sich bei der häufigsten der sieben rekurrenten POGLUT1-Varianten, c. 652C>T, dar: Neben einem minimalen gemeinsamen Haplotyp bei allen sieben betroffenen Individuen von etwa 60 kb, der sich von den SNVs rs114615589 bis rs11539377 erstreckte, ließen sich up- und downstream der Marker rs1132200 und rs2293370 zwei verschiedene kontinuierliche Haplotypblöcke mit einer Größe von etwa 420 und 580 kb identifizieren, die in jeweils vier bzw. drei der Familien vorlagen (Figure 1c in Kumar et al., 2024).

Das Ergebnis eines jeweils gemeinsam vorliegenden Haplotypen in den betroffenen Familien bestätigt, dass es sich bei den acht rekurrenten Varianten in *KRT5* bzw. in *POGLUT1* um Founder-Varianten handelt.

1.4 Diskussion

Publikation A:

In der von Melanozyten abgeleiteten Zelllinie MZ7-mel resultierte der *knockdown* der Zielgene *POGLUT1* oder *PSENEN* in einer signifikanten Überrepräsentierung des Notch-*Pathways* in den RNA-seq-Daten sowie in einer deutlichen funktionellen Abnahme der Notch-Signalaktivität. Die Abnahme der Notch-Aktivität korrelierte hierbei mit der *knockdown*-Effizienz des jeweiligen Gens. Für *loss of function*-Varianten in *POGLUT1* und *PSENEN* kann somit eine resultierende verminderte Aktivität der NotchSignaltransduktion angenommen werden. Die *knockdown*-Experimente der beiden Gene *POGLUT1-* und *PSENEN-* zeigten dabei vergleichbare Ergebnisse. Das deckt sich mit den subtilen Unterschieden der einzelnen *POGLUT1-* und *PSENEN-*RNA-Profile untereinander bei dem Vergleich der jeweiligen Transkriptom-Datensätze. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass ein gemeinsamer Pathomechanismus *downstream* des Notch-Signaltransduktionsweges den Hyperpigmentierungen der Träger*innen von *POGLUT1-* und *PSENEN-*Varianten zugrunde liegt. Die Hypothese, dass dies darüber hinaus auch für Träger*innen von *POFUT1-* und *KRT5-*Varianten gilt, wird durch eine differentielle Expression von Genen des Notch-Signaltransduktionsweges sowohl in *POFUT1-knockdown* Zebrafisch-Larven (Li et al., 2013) als auch bei Expressionsverlust von *KRT5* gestützt (Alam et al., 2011).

Im Gegensatz dazu ließen sich in der von Keratinozyten abgeleiteten Zelllinie HaCaT weder eine Anreicherung der Notch-Transkripte in den RNA-seq-Daten noch eine funktionelle Notch-Aktivität detektieren - trotz validierter verminderter Expression von POGLUT1 und PSENEN sowie einer signifikant differentiellen Expression weiterer Notch-Gene in den RNA-seq-Daten. Die Untersuchungsergebnisse deuten darauf hin, dass eine Störung der Notch-Signaltransduktion insbesondere in den Melanozyten eine bedeutende Rolle in der Pathophysiologie des DDD spielen könnte. In dieser Hinsicht ließen sich neue Erkenntnisse gewinnen, die über die bisherigen Studien hinausgehen, die die Auswirkungen eines DDD-Krankheitsgen-knockdowns auf einzelne Notch-Gene untersuchten (Li et al., 2013; Ralser et al., 2019). Das Ergebnis, dass die von Melanozyten abstammende Zelllinie, nicht aber die keratinozytäre Zelllinie, relevante transkriptionelle und funktionelle Veränderungen aufweist, steht zudem im Einklang mit der abnormalen Morphologie der Melanozyten und den im Gegensatz dazu elektronenmikroskopisch unauffälligen Keratinozyten mit normalen Keratinfilamenten in DDD-Patient*innen (Li et al., 2013). In diesem Zusammenhang ist die Frage nach dem Pathomechanismus bei einer KRT5-Defizienz von Interesse. Bei KRT5 handelt es sich um in Epithelzellen exprimiertes Protein. Eine Erklärung liefern die Untersuchungen von Jia et al. (2023), die zeigten, dass auch ein knockdown von KRT5 über eine verringerte Expression von Notch-Liganden in Keratinozyten letztlich in einer reduzierten Notch-Aktivität in Melanozyten resultiert.

Folglich wird als gemeinsam zugrundeliegender Pathomechanismus beim DDD eine veränderte Notch-Signaltransduktion in den Melanozyten postuliert. Tiermodelle demonstrierten bereits einen Zusammenhang zwischen Pigmentierungsprozessen und einer gestörten Notch-Signaltransduktion. So zeigte der Signalweg eine entscheidende Rolle bei dem Erhalt von melanozytären Vorläuferzellen (Melanoblasten) und melanozytären Stammzellen in Mäusen, indem er die Apoptose der entsprechenden al., 2006). Zellen verhinderte (Moriyama et Störungen der Notch-Signaltransduktionskaskade durch die experimentelle Ausschaltung diverser Gene des Signalwegs führten in den Mäusen zu einem Hypopigmentierungsphänotyp (Aubin-Houzelstein et al., 2008; Kumano et al., 2008; Schouwey und Beermann, 2008). Eine Erklärung für den humanen Phänotyp einer Hyperpigmentierung könnten die drei durch die Pathway-Analyse der RNA-seq-Daten identifizierten Signalwege in der melanozytären Zelllinie liefern: Östrogen-Signalrezeptor (ESR) signaling, Rezeptor-Tyrosinkinase signaling und membrane trafficking. Als molekulare Pathomechanismen einer Pigmentierungsstörung der Haut kommen im Allgemeinen vielfältige Möglichkeiten in Betracht. So sind neben einer abnormen Melanozytenentwicklung auch beispielsweise Störungen der Melaninsynthese (Melanogenese), der Melanosomen-Bildung oder ihres Transfers innerhalb des Melanozyten denkbar (Tomita und Suzuki, 2004). Hinsichtlich des Östrogen-Signalrezeptor (ESR) signaling ist bekannt, dass erhöhte Östradiolspiegel eine verstärkte Expression der Tyrosinase und weiterer an der Melanogenese beteiligte Enzyme auslösen (Kippenberger et al., 1998). In Zuständen mit einer vermehrten Bildung von Östrogenen, wie während der Schwangerschaft oder bei Einnahme östrogenhaltiger Kontrazeptiva sind eine Zunahme der Hautpigmentierung bis hin zu Pigmentstörungen wie dem Melasma beschrieben (Thornton, 2005). In Bezug auf den Rezeptor-Tyrosinkinase-Signalweg deuten Forschungsergebnisse auf eine Beteiligung des Signalwegs an Prozessen wie der Regulation von Entwicklung, Differenzierung (Yoshida et al., 2001) und Migration (Alexeev und Yoon, 2006) von Melanozyten sowie der Melanogenese (Kasamatsu et al., 2008) hin. Im Einklang damit konnten in Zebrafischlarven, in denen das zu PSENEN homologe Gen psenen ausgeschaltet wurde, Störungen der Melanozytenmigration und -differenzierung nachgewiesen werden (Ralser et al., 2017). Auch Membrantransport-Prozesse (membrane trafficking) spielen eine essentielle Rolle in der Hautpigmentierung durch ihre Beteiligung in der Biogenese,

Transport und Transfer der Melanosomen (Fukuda, 2021; Ohbayashi und Fukuda, 2020) und sind als möglicher Pathomechanismus denkbar. Somit konnten drei vielversprechende nachgeschaltete Signalwege identifiziert werden, die alle in Verbindung mit der Hautpigmentierung stehen, und über die eine veränderte Notch-Signaltransduktion in Melanozyten das Erscheinungsbild eines DDD verursachen könnte.

Ausgehend von der vorliegenden Arbeit ergeben sich neue Fragestellungen: Über welche konkreten molekularen Mechanismen könnten die hier identifizierten Signaltransduktionswege zu dem Phänotyp einer Hyperpigmentierung führen? Lässt sich aus diesen Erkenntnissen zukünftig ein molekulares Target in den Melanozyten für einen Therapieansatz gegen den Hyperpigmentierungsprozess ableiten? Hierfür sind weitergehende funktionelle Untersuchungen der Signalwege erforderlich.

Die Ergebnisse der Arbeit dienen als Grundlage für die Klärung der gemeinsam zugrundeliegender Pathomechanismen bei einem DDD. Darüber hinaus ist jedoch auch die Frage nach den Ursachen der phänotypischen Unterschiede der vier verschiedenen DDD-Subtypen von Interesse. Welche Faktoren regulieren hier die unterschiedliche Lokalisation der vermehrten Pigmentierung? Dies könnte sich durch Untersuchungen der Patient*innen sowie funktionelle Experimente dahingehend klären lassen.

Publikation B:

Die Identifizierung eines gemeinsamen Haplotypen bei allen Index-Patient*innen mit den jeweils identischen genetischen POGLUT1- oder KRT5-Varianten bestätigte, dass die acht rekurrenten Varianten in unserer Kohorte auf einen jeweils gemeinsamen Vorfahren zurückgehen und damit einen Foundereffekt widerspiegeln. Die Größe des gemeinsam vorliegenden Haplotypblockes korreliert dabei negativ mit dem Alter der Foundervariante (Drayna, 2005). Im Allgemeinen deuten große konservierte Haplotyptypblöcke auf relativ junge Mutationsereignisse hin (Sbalchiero et al., 2022), wie bei den Indexpatienten DDD16 und DDD14 in unserer Kohorte (Figure 1b in Kumar et al., 2024). Im Gegensatz des gemeinsamen dazu ist eine Verkürzung Haplotypen aufgrund von Rekombinationsereignissen in der Regel ein Hinweis auf weiter zurückliegende Mutationsereignisse (Ma et al., 2022), wie bei den Indexpatienten DDD19-25 (Figure 1b in Kumar et al., 2024).

Hinsichtlich zwei der Foundervarianten gab es Besonderheiten: Die rekurrente KRT5-Variante c.418dupA wurde bislang nur einmal außerhalb von Deutschland beschrieben (Lőrincz et al., 2018). Zudem sind in unserer Kohorte die Wohnorte aller Index-Träger*innen von c.418dupA in einem geografischen Gebiet von rund 41.000 Quadratkilometern in Deutschland lokalisiert. Durch den Ausschluss von drei Ausnahmefällen konnte dieses Gebiet noch weiter auf 2.600 Quadratkilometer eingegrenzt werden, was 0,7 % der Gesamtfläche Deutschlands entspricht (Figure 1a in Kumar et al., 2024). Aus dieser geographischen Nähe aller Indexpatient*innen kann abgeleitet werden, dass es sich bei c.418dupA wahrscheinlich um eine regionale Foundervariante handelt, die ihren Ursprung in Deutschland hat. Trotz dieser unerwarteten geographischen Häufung zeigte sich kein Zusammenhang zwischen der Größe des jeweiligen gemeinsamen Haplotypblockes und den Entfernungen der jeweiligen Wohnorte. Das lässt sich jedoch durch die Tatsache erklären, dass nur Informationen über den jeweils aktuellen Wohnort der Indexpatient*innen und ihrer Familien vorlagen. Eine Rückverfolgung der Wohnorte der Vorfahren könnte Hinweise auf eine Migration der Vorfahren als mögliche Erklärung für diese Ergebnisse liefern (Shinagawa et al., 2020; Solovyev et al., 2022).

Für die häufigste *POGLUT1*-Variente, c.652C>T (p.R218*), zeigte die Haplotyp-Analyse neben einem gemeinsamen Haplotyp, der in allen sieben Familien vorlag, zwei verschiedene kontinuierliche Haplotypblöcke in vier bzw. drei der Familien. Das weist darauf hin, dass zwar für alle betroffenen sieben Familien ein gemeinsamer Foundereffekt vorliegt, die beiden Zweige mit den drei bzw. vier Familien jedoch in einer noch engeren familiären Beziehung zueinander stehen könnten (Figure 1c in Kumar et al., 2024) (Sbalchiero et al., 2022).

Der Nachweis von acht verschiedenen Foundervarianten bei überwiegend deutschen Patient*innen und ihren Familien, legt die Hypothese nahe, dass der DDD zumindest in Deutschland eine etwas höhere Prävalenz als bisher angenommen aufweisen könnte. Eine höhere Dunkelziffer könnte darauf zurückzuführen sein, dass der DDD leicht übersehen, als unspezifischer und harmloser Fall von einer Lentiginose fehldiagnostiziert oder mit anderen erblichen und/oder erworbenen Störungen der Hyperpigmentierung verwechselt werden kann (Zhang et al., 2017). So sind teilweise lange Wege mit Fehldiagnosen bis zur korrekten Diagnosestellung eines DDD beschrieben

(Papadopoulou et al., 2022). Da die klinische und histologische Heterogenität des DDD die Diagnosestellung erschweren kann, sollte daher bei allen Genodermatosen stets die molekulargenetische Analyse den entscheidenden Schritt zur zweifelsfreien Diagnosesicherung darstellen. Bei einem DDD bietet eine genetische Untersuchung zudem die Möglichkeit, die vier verschiedenen DDD-Subtypen klar voneinander zu unterscheiden (Kumar et al., 2023a).

Der DDD ist eine seltene Erkrankung. Die Kenntnis regionaler Foundervarianten wie der *KRT5*-Variante c.418dupA kann durch ein besseres Bewusstsein für die Erkrankung dazu beitragen, die Diagnosestellung in bestimmten Populationen zu beschleunigen.

1.5 Zusammenfassung

Der Morbus Dowling-Degos (DDD) ist eine seltene, genetisch und klinisch heterogene Pigmentdermatose mit autosomal-dominantem Erbgang, die durch pathogene Varianten in *KRT5*, *POFUT1*, *POGLUT1* oder *PSENEN* verursacht wird. Trotz Kenntnis der Krankheitsgene, sind die zugrundeliegenden molekularen Mechanismen, die zu dem Erscheinungsbild eines DDD führen, bislang ungeklärt. Zunehmend wird jedoch dem Notch-Signaltransduktionsweg eine bedeutende Rolle in der Pathophysiologie zugeschrieben.

Die vorliegende Dissertation verfolgte als primären Schwerpunkt das Ziel eines besseren Verständnisses der Pathogenese des DDD und somit auch der molekularen Grundlagen von Pigmentierungsprozessen in der Haut. Um einen gemeinsamen zugrundeliegenden Pathomechanismus zu entschlüsseln, wurden die Folgen einer siRNA-vermittelten *POGLUT1/PSENEN*-Defizienz in Zellen keratinozytären und Zellen melanozytären Ursprungs analysiert. Hierfür fand eine Transkriptom-Sequenzierung (RNA-seq) mit nachfolgender Analyse der differentiellen Expression und *Pathway*-Analysen sowie ein Enzymimmunoassay zur Beurteilung der funktionellen Notch-Signalübertragungsaktivität Anwendung. In der melanozytären Zelllinie resultierte sowohl der *knockdown* von *POGLUT1* als auch der *knockdown* von *PSENEN* in einer differentiellen Expression von Genen des Notch-Signaltransduktionswegs, sowie in einer entsprechenden signifikanten Überrepräsentierung des Signalwegs in der *Pathway*-Analyse. Darüber hinaus zeigte sich eine deutlich verminderte funktionelle Aktivität der Notch-Signaltransduktion bei

POGLUT1/PEN2-Defizienz. Daneben wiesen ausschließlich die melanozytären Zellen eine Anreicherung folgender drei Signalwege auf: Östrogen-Signalrezeptor (ESR) *signaling*, Rezeptor-Tyrosinkinase *signaling* und *membrane trafficking*. Sie alle sind bereits in der Literatur in Verbindung mit Pigmentierungsprozessen beschrieben. Im Gegensatz dazu zeigte die keratinozytäre Zelllinie weder eine Notch-Signalaktivität, noch eine Anreicherung des Notch-Signalweges in der *Pathway*-Analyse, obwohl die RNA-seq-Daten eine erheblich reduzierte *POGLUT1-* und *PSENEN*-Expression sowie veränderte Expressionsniveaus mehrerer anderer Gene des Notch-Signalwegs belegten.

Zusammenfassend wird eine reduzierte Notch-Signaltransduktion in Melanozyten als gemeinsam zugrundeliegender Pathomechanismus beim DDD postuliert. Darüber hinaus wurden drei vielversprechende nachgeschaltete Signalwege identifiziert, die mit der Hautpigmentierung in Verbindung stehen und über die eine verminderte Notch-Signalübertragung in Melanozyten zu den phänotypischen Manifestationen der DDD führen könnte. Insgesamt trägt diese Arbeit zu einem besseren Verständnis der Rolle des Notch-Signaltransduktionsweges an Pigmentierungsprozessen in der Haut bei.

Als zweiter Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit wurde die Fragestellung beleuchtet, ob den häufigen, für einen DDD ursächlichen Varianten ein Foundereffekt zugrunde liegt. Gegenwärtig besteht unsere DDD-Kohorte aus mehr als 120 betroffenen Familien. Darunter sind uns acht rekurrente Varianten in den Genen KRT5 und POGLUT1 bekannt, die in bis zu 18 Individuen aus verschiedenen, nicht miteinander verwandten Familien aus Deutschland, Dänemark oder der Schweiz nachgewiesen wurden. Als Erklärung für häufige genetische Varianten gibt es im Allgemeinen zwei Mechanismen: sie können auf einen gemeinsamen Vorfahren zurückgehen und dementsprechend einen Foundereffekt widerspiegeln - oder aber durch einen mutative hot spot bedingt sein, also an einer Stelle lokalisiert sein, an der sich besonders häufig Mutationen ereignen. Um zu untersuchen, ob es sich bei den rekurrenten DDD-Varianten in KRT5 und POGLUT1 um Founder-Varianten handelt, erfolgten Haplotypanalysen der Regionen um die beiden Gene KRT5 und POGLUT1 in den betroffenen Patient*innen. Die Identifizierung eines gemeinsamen Haplotypen bei allen Index-Patient*innen mit der identischen genetischen POGLUT1oder KRT5-Variante bestätigte, dass es sich bei den acht rekurrenten Varianten in unserer Kohorte um Foundervarianten handelt. Hinsichtlich der rekurrenten KRT5-Variante

c.418dupA fiel eine geographische Häufung in Deutschland auf, aus der abgeleitet werden kann, dass es sich bei c.418dupA wahrscheinlich um eine regionale Foundervariante handelt.

Unseres Wissens sind unsere Daten die ersten, die zeigen, dass Founderreffekte in *KRT5* und *POGLUT1* zur Manifestation von DDD beitragen können. Darüber hinaus deuten die vorliegenden Ergebnisse darauf hin, dass der DDD zumindest in Deutschland eine etwas höhere Prävalenz haben könnte als bisher angenommen.

1.6 Literaturverzeichnis der deutschen Zusammenfassung

Alam H, Sehgal L, Kundu ST, Dalal SN, Vaidya MM. Novel function of keratins 5 and 14 in proliferation and differentiation of stratified epithelial cells. Mol Biol Cell 2011; 22: 4068-4078

Alexeev V, Yoon K. Distinctive role of the cKit receptor tyrosine kinase signaling in mammalian melanocytes. J Invest Dermatol 2006; 126: 1102-1110

Aubin-Houzelstein G, Djian-Zaouche J, Bernex F, Gadin S, Delmas V, Larue L, Panthier J-J. Melanoblasts' Proper Location and Timed Differentiation Depend on Notch/RBP-J Signaling in Postnatal Hair Follicles. J Invest Dermatol 2008; 128: 2686-2695

Auton A, Abecasis GR, Altshuler DM, Durbin RM, Abecasis GR, Bentley DR, Chakravarti A, Clark AG, Donnelly P, Eichler EE, Flicek P, Gabriel SB, Gibbs RA, Green ED, Hurles ME, Knoppers BM, Korbel JO, Lander ES, Lee C, Lehrach H, Mardis ER, Marth GT, McVean GA, Nickerson DA, Schmidt JP, Sherry ST, Wang J, Wilson RK, Gibbs RA, Boerwinkle E, Doddapaneni H, Han Y, Korchina V, Kovar C, Lee S, Muzny D, Reid JG, Zhu Y, Wang J, Chang Y, Feng Q, Fang X, Guo X, Jian M, Jiang H, Jin X, Lan T, Li G, Li J, Li Y, Liu S, Liu X, Lu Y, Ma X, Tang M, Wang B, Wang G, Wu H, Wu R, Xu X, Yin Y, Zhang D, Zhang W, Zhao J, Zhao M, Zheng X, Lander ES, Altshuler DM, Gabriel SB, Gupta N, Gharani N, Toji LH, Gerry NP, Resch AM, Flicek P, Barker J, Clarke L, Gil L, Hunt SE, Kelman G, Kulesha E, Leinonen R, McLaren WM, Radhakrishnan R, Roa A, Smirnov D, Smith RE, Streeter I, Thormann A, Toneva I, Vaughan B, Zheng-Bradley X, Bentley DR, Grocock R, Humphray S, James T, Kingsbury Z, Lehrach H, Sudbrak R, Albrecht MW, Amstislavskiy VS, Borodina TA, Lienhard M, Mertes F, Sultan M, Timmermann B, Yaspo M-L, Mardis ER, Wilson RK, Fulton L, Fulton R, Sherry ST, Ananiev V, Belaia Z, Beloslyudtsev D, Bouk N, Chen C, Church D, Cohen R, Cook C, Garner J, Hefferon T, Kimelman M, Liu C, Lopez J, Meric P, O'Sullivan C, Ostapchuk Y, Phan L, Ponomarov S, Schneider V, Shekhtman E, Sirotkin K, Slotta D, Zhang H, McVean GA, Durbin RM, Balasubramaniam S, Burton J, Danecek P, Keane TM, Kolb-Kokocinski A, McCarthy S, Stalker J, Quail M, Schmidt JP, Davies CJ, Gollub J, Webster T, Wong B, Zhan Y, Auton A, Campbell CL, Kong Y, Marcketta A, Gibbs RA, Yu F, Antunes L, Bainbridge M, Muzny D, Sabo A, Huang Z, Wang J, Coin LJM, Fang L, Guo X, Jin X, Li G, Li Q, Li Y, Li Z, Lin H, Liu B, Luo R, Shao H, Xie Y, Ye C, Yu C, Zhang F, Zheng H,

Zhu H, Alkan C, Dal E, Kahveci F, Marth GT, Garrison EP, Kural D, Lee W-P, Fung Leong W, Stromberg M, Ward AN, Wu J, Zhang M, Daly MJ, Depristo MA, Handsaker RE, Altshuler DM, Banks E, Bhatia G, Del Angel G, Gabriel SB, Genovese G, Gupta N, Li H, Kashin S, Lander ES, McCarroll SA, Nemesh JC, Poplin RE, Yoon SC, Lihm J, Makarov V, Clark AG, Gottipati S, Keinan A, Rodriguez-Flores JL, Korbel JO, Rausch T, Fritz MH, Stütz AM, Flicek P, Beal K, Clarke L, Datta A, Herrero J, McLaren WM, Ritchie GRS, Smith RE, Zerbino D, Zheng-Bradley X, Sabeti PC, Shlyakhter I, Schaffner SF, Vitti J, Cooper DN, Ball EV, Stenson PD, Bentley DR, Barnes B, Bauer M, Keira Cheetham R, Cox A, Eberle M, Humphray S, Kahn S, Murray L, Peden J, Shaw R, Kenny EE, Batzer MA, Konkel MK, Walker JA, Macarthur DG, Lek M, Sudbrak R, Amstislavskiy VS, Herwig R, Mardis ER, Ding L, Koboldt DC, Larson D, Ye K, Gravel S, Swaroop A, Chew E, Lappalainen T, Erlich Y, Gymrek M, Frederick Willems T, Simpson JT, Shriver MD, Rosenfeld JA, Bustamante CD, Montgomery SB, De La Vega FM, Byrnes JK, Carroll AW, Degorter MK, Lacroute P, Maples BK, Martin AR, Moreno-Estrada A, Shringarpure SS, Zakharia F, Halperin E, Baran Y, Lee C, Cerveira E, Hwang J, Malhotra A, Plewczynski D, Radew K, Romanovitch M, Zhang C, Hyland FCL, Craig DW, Christoforides A, Homer N, Izatt T, Kurdoglu AA, Sinari SA, Squire K, Sherry ST, Xiao C, Sebat J, Antaki D, Gujral M, Noor A, Ye K, Burchard EG, Hernandez RD, Gignoux CR, Haussler D, Katzman SJ, James Kent W, Howie B, Ruiz-Linares A, Dermitzakis ET, Devine SE, Abecasis GR, Min Kang H, Kidd JM, Blackwell T, Caron S, Chen W, Emery S, Fritsche L, Fuchsberger C, Jun G, Li B, Lyons R, Scheller C, Sidore C, Song S, Sliwerska E, Taliun D, Tan A, Welch R, Kate Wing M, Zhan X, Awadalla P, Hodgkinson A, Li Y, Shi X, Quitadamo A, Lunter G, McVean GA, Marchini JL, Myers S, Churchhouse C, Delaneau O, Gupta-Hinch A, Kretzschmar W, Igbal Z, Mathieson I, Menelaou A, Rimmer A, Xifara DK, Oleksyk TK, Fu Y, Liu X, Xiong M, Jorde L, Witherspoon D, Xing J, Eichler EE, Browning BL, Browning SR, Hormozdiari F, Sudmant PH, Khurana E, Durbin RM, Hurles ME, Tyler-Smith C, Albers CA, Ayub Q, Balasubramaniam S, Chen Y, Colonna V, Danecek P, Jostins L, Keane TM, McCarthy S, Walter K, Xue Y, Gerstein MB, Abyzov A, Balasubramanian S, Chen J, Clarke D, Fu Y, Harmanci AO, Jin M, Lee D, Liu J, Jasmine Mu X, Zhang J, Zhang Y, Li Y, Luo R, Zhu H, Alkan C, Dal E, Kahveci F, Marth GT, Garrison EP, Kural D, Lee W-P, Ward AN, Wu J, Zhang M, McCarroll SA, Handsaker RE, Altshuler DM, Banks E,

Del Angel G, Genovese G, Hartl C, Li H, Kashin S, Nemesh JC, Shakir K, Yoon SC, Lihm

30

J, Makarov V, Degenhardt J, Korbel JO, Fritz MH, Meiers S, Raeder B, Rausch T, Stütz AM, Flicek P, Paolo Casale F, Clarke L, Smith RE, Stegle O, Zheng-Bradley X, Bentley DR, Barnes B, Keira Cheetham R, Eberle M, Humphray S, Kahn S, Murray L, Shaw R, Lameijer E-W, Batzer MA, Konkel MK, Walker JA, Ding L, Hall I, Ye K, Lacroute P, Lee C, Cerveira E, Malhotra A, Hwang J, Plewczynski D, Radew K, Romanovitch M, Zhang C, Craig DW, Homer N, Church D, Xiao C, Sebat J, Antaki D, Bafna V, Michaelson J, Ye K, Devine SE, Gardner EJ, Abecasis GR, Kidd JM, Mills RE, Dayama G, Emery S, Jun G, Shi X, Quitadamo A, Lunter G, McVean GA, Chen K, Fan X, Chong Z, Chen T, Witherspoon D, Xing J, Eichler EE, Chaisson MJ, Hormozdiari F, Huddleston J, Malig M, Nelson BJ, Sudmant PH, Parrish NF, Khurana E, Hurles ME, Blackburne B, Lindsay SJ, Ning Z, Walter K, Zhang Y, Gerstein MB, Abyzov A, Chen J, Clarke D, Lam H, Jasmine Mu X, Sisu C, Zhang J, Zhang Y, Gibbs RA, Yu F, Bainbridge M, Challis D, Evani US, Kovar C, Lu J, Muzny D, Nagaswamy U, Reid JG, Sabo A, Yu J, Guo X, Li W, Li Y, Wu R, Marth GT, Garrison EP, Fung Leong W, Ward AN, Del Angel G, Depristo MA, Gabriel SB, Gupta N, Hartl C, Poplin RE, Clark AG, Rodriguez-Flores JL, Flicek P, Clarke L, Smith RE, Zheng-Bradley X, Macarthur DG, Mardis ER, Fulton R, Koboldt DC, Gravel S, Bustamante CD, Craig DW, Christoforides A, Homer N, Izatt T, Sherry ST, Xiao C, Dermitzakis ET, Abecasis GR, Min Kang H, McVean GA, Gerstein MB, Balasubramanian S, Habegger L, Yu H, Flicek P, Clarke L, Cunningham F, Dunham I, Zerbino D, Zheng-Bradley X, Lage K, Berg Jespersen J, Horn H, Montgomery SB, Degorter MK, Khurana E, Tyler-Smith C, Chen Y, Colonna V, Xue Y, Gerstein MB, Balasubramanian S, Fu Y, Kim D, Auton A, Marcketta A, Desalle R, Narechania A, Wilson Sayres MA, Garrison EP, Handsaker RE, Kashin S, McCarroll SA, Rodriguez-Flores JL, Flicek P, Clarke L, Zheng-Bradley X, Erlich Y, Gymrek M, Frederick Willems T, Bustamante CD, Mendez FL, David Poznik G, Underhill PA, Lee C, Cerveira E, Malhotra A, Romanovitch M, Zhang C, Abecasis GR, Coin L, Shao H, Mittelman D, Tyler-Smith C, Ayub Q, Banerjee R, Cerezo M, Chen Y, Fitzgerald TW, Louzada S, Massaia A, McCarthy S, Ritchie GR, Xue Y, Yang F, Gibbs RA, Kovar C, Kalra D, Hale W, Muzny D, Reid JG, Wang J, Dan X, Guo X, Li G, Li Y, Ye C, Zheng X, Altshuler DM, Flicek P, Clarke L, Zheng-Bradley X, Bentley DR, Cox A, Humphray S, Kahn S, Sudbrak R, Albrecht MW, Lienhard M, Larson D, Craig DW, Izatt T, Kurdoglu AA, Sherry ST, Xiao C, Haussler D, Abecasis GR, McVean GA, Durbin RM, Balasubramaniam S, Keane TM, McCarthy S, Stalker J, Chakravarti A, Knoppers BM,

Abecasis GR, Barnes KC, Beiswanger C, Burchard EG, Bustamante CD, Cai H, Cao H, Durbin RM, Gerry NP, Gharani N, Gibbs RA, Gignoux CR, Gravel S, Henn B, Jones D, Jorde L, Kaye JS, Keinan A, Kent A, Kerasidou A, Li Y, Mathias R, McVean GA, Moreno-Estrada A, Ossorio PN, Parker M, Resch AM, Rotimi CN, Royal CD, Sandoval K, Su Y, Sudbrak R, Tian Z, Tishkoff S, Toji LH, Tyler-Smith C, Via M, Wang Y, Yang H, Yang L, Zhu J, Bodmer W, Bedoya G, Ruiz-Linares A, Cai Z, Gao Y, Chu J, Peltonen L, Garcia-Montero A, Orfao A, Dutil J, Martinez-Cruzado JC, Oleksyk TK, Barnes KC, Mathias RA, Hennis A, Watson H, McKenzie C, Qadri F, Larocque R, Sabeti PC, Zhu J, Deng X, Sabeti PC, Asogun D, Folarin O, Happi C, Omoniwa O, Stremlau M, Tariyal R, Jallow M, Sisay Joof F, Corrah T, Rockett K, Kwiatkowski D, Kooner J, Tjnh Hiê`N TN, Dunstan SJ, Thuy Hang N, Fonnie R, Garry R, Kanneh L, Moses L, Sabeti PC, Schieffelin J, Grant DS, Gallo C, Poletti G, Saleheen D, Rasheed A, Brooks LD, Felsenfeld AL, McEwen JE, Vaydylevich Y, Green ED, Duncanson A, Dunn M, Schloss JA, Wang J, Yang H, Auton A, Brooks LD, Durbin RM, Garrison EP, Min Kang H, Korbel JO, Marchini JL, McCarthy S, McVean GA, Abecasis GR. A global reference for human genetic variation. Nature 2015; 526: 68-74

AWMF,2022:S2k-Leitlinie:LasertherapiederHaut.https://register.awmf.org/assets/guidelines/013-095I_S2k_Lasertherapie-der-Haut_2022-03.pdf (Zugriffsdatum: 20.05.23)

Basmanav FB, Fritz G, Lestringant GG, Pachat D, Hoffjan S, Fischer J, Wehner M, Wolf S, Thiele H, Altmuller J, Pulimood SA, Rutten A, Kruse R, Hanneken S, Frank J, Danda S, Bygum A, Betz RC. Pathogenicity of POFUT1 in Dowling-Degos disease: additional mutations and clinical overlap with reticulate acropigmentation of kitamura. J Invest Dermatol 2015; 135: 615-618

Basmanav FB, Oprisoreanu AM, Pasternack SM, Thiele H, Fritz G, Wenzel J, Grosser L, Wehner M, Wolf S, Fagerberg C, Bygum A, Altmuller J, Rutten A, Parmentier L, El Shabrawi-Caelen L, Hafner C, Nurnberg P, Kruse R, Schoch S, Hanneken S, Betz RC. Mutations in POGLUT1, encoding protein O-glucosyltransferase 1, cause autosomaldominant Dowling-Degos disease. Am J Hum Genet 2014; 94: 135-143

Betz RC, Planko L, Eigelshoven S, Hanneken S, Pasternack SM, Bussow H, Van Den Bogaert K, Wenzel J, Braun-Falco M, Rutten A, Rogers MA, Ruzicka T, Nothen MM, Magin TM, Kruse R. Loss-of-function mutations in the keratin 5 gene lead to Dowling-Degos disease. Am J Hum Genet 2006; 78: 510-519

Bray SJ. Notch signalling: a simple pathway becomes complex. Nat Rev Mol Cell Biol 2006; 7: 678-689

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

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

Drayna D. Founder mutations. Sci Am 2005; 293: 78-85

Fortini ME. Notch Signaling: The Core Pathway and Its Posttranslational Regulation. Dev Cell 2009; 16: 633-647

Fukuda M. Rab GTPases: Key players in melanosome biogenesis, transport, and transfer. Pigment Cell Melanoma Res 2021; 34: 222-235

Gordon WR, Vardar-Ulu D, L'Heureux S, Ashworth T, Malecki MJ, Sanchez-Irizarry C, McArthur DG, Histen G, Mitchell JL, Aster JC, Blacklow SC. Effects of S1 Cleavage on the Structure, Surface Export, and Signaling Activity of Human Notch1 and Notch2. PLoS ONE 2009; 4: e6613

Hanneken S, Rütten A, Eigelshoven S, Braun-Falco M, Pasternack SM, Ruzicka T, Nöthen MM, Betz RC, Kruse R. [Galli-Galli disease. Clinical and histopathological investigation using a case series of 18 patients]. Hautarzt 2011; 62: 842-851

Jia W, Zhang Y, Wang X, Luo L, Sun H, Jiang Y, Wang J, Mao Q, Guo Y, Kong L, Mo R, Li C. KRT5 mutation regulate melanin metabolism through notch signalling pathway between keratinocytes and melanocytes. Exp Dermatol 2023; 32: 752-765

Jones EW, Grice K. Reticulate Pigmented Anomaly of the Flexures: Dowling Degos Disease, A New Genodermatosis. Arch Dermatol 1978; 114: 1150-1157

Kasamatsu S, Hachiya A, Higuchi K, Ohuchi A, Kitahara T, Boissy RE. Production of the soluble form of KIT, s-KIT, abolishes stem cell factor-induced melanogenesis in human melanocytes. J Invest Dermatol 2008; 128: 1763-1772

Kippenberger S, Loitsch S, Solano F, Bernd A, Kaufmann R. Quantification of Tyrosinase, TRP-1, and TRP-2 Transcripts in Human Melanocytes by Reverse Transcriptase-

Competitive Multiplex PCR – Regulation by Steroid Hormones. J Invest Dermatol 1998; 110: 364-367

Kono M, Sugiura K, Suganuma M, Hayashi M, Takama H, Suzuki T, Matsunaga K, Tomita Y, Akiyama M. Whole-exome sequencing identifies ADAM10 mutations as a cause of reticulate acropigmentation of Kitamura, a clinical entity distinct from Dowling-Degos disease. Hum Mol Genet 2013; 22: 3524-3533

Kopan R. Notch Signaling. Cold Spring Harb Perspect Biol. 2012; 4: a011213-a011213

Kumano K, Masuda S, Sata M, Saito T, Lee SY, Sakata-Yanagimoto M, Tomita T, Iwatsubo T, Natsugari H, Kurokawa M, Ogawa S, Chiba S. Both Notch1 and Notch2 contribute to the regulation of melanocyte homeostasis. Pigment Cell Melanoma Res 2008; 21: 70-78

Kumar S, Borisov O, Maj C, Ralser DJ, Humbatova A, Hanneken S, Schmieder A, Groß J, Maintz L, Heineke A, Knuever J, Fagerberg C, Parmentier L, Anemüller W, Oji V, Tantcheva-Poór I, Fölster-Holst R, Wenzel J, Krawitz PM, Frank J, Betz RC. Founder Variants in KRT5 and POGLUT1 Are Implicated in Dowling-Degos Disease. J Invest Dermatol 2024; 144: 181-184

Kumar S, Wenzel J, Schon MP, Betz RC, Frank J. [POGLUT1-Varianten bei Morbus Dowling-Degos - Assoziation mit spezifischen klinischen und histopathologischen Merkmalen?]. J Dtsch Dermatol Ges 2023a; 21: 540-541

Kumar S, Hausen J, Sivalingam S, Humbatova A, Buness A, Frank J, Ralser DJ, Betz RC. Altered Notch signalling in Dowling-Degos disease: a transcriptomic insight into disease pathogenesis. Br J Dermatol 2023b; 189: 772-774

Li M, Cheng R, Liang J, Yan H, Zhang H, Yang L, Li C, Jiao Q, Lu Z, He J, Ji J, Shen Z, Li C, Hao F, Yu H, Yao Z. Mutations in POFUT1, encoding protein O-fucosyltransferase 1, cause generalized Dowling-Degos disease. Am J Hum Genet 2013; 92: 895-903

Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. Methods 2001; 25: 402-408

Logeat F, Bessia C, Brou C, LeBail O, Jarriault S, Seidah NG, Israël A. The Notch1 receptor is cleaved constitutively by a furin-like convertase. Proc Natl Acad Sci U S A 1998; 95: 8108-8112

Loh P-R, Palamara PF, Price AL. Fast and accurate long-range phasing in a UK Biobank cohort. Nat Gen 2016; 48: 811-816

Lőrincz K, Medvecz M, Kiss N, Glász-Bóna A, Hársing J, Lepesi-Benkő R, Hatvani Z, Mazán M, Kárpáti S, Wikonkál N. Confirmation of the role of a KRT5 mutation and successful management of skin lesions in a patient with Galli-Galli disease. Clin Exp Dermatol 2018; 43: 972-974

Ma Y, Wang X, Shoshany N, Jiao X, Lee A, Ku G, Baple EL, Fasham J, Nadeem R, Naeem MA, Riazuddin S, Riazuddin SA, Crosby AH, Hejtmancik JF. CLCC1 c. 75C>A Mutation in Pakistani Derived Retinitis Pigmentosa Families Likely Originated With a Single Founder Mutation 2,000-5,000 Years Ago. Front Genet 2022; 13: 804924

Mohr OL. Character Changes Caused by Mutation of an Entire Region of a Chromosome in Drosophila. Genetics 1919; 4: 275-282

Morgan TH. Sex-linked inheritance in Drosophila. Washington: Carnegie institution of Washington, 1916

Morgan TH. The theory of the gene. Am Nat 1917; 51: 513-544

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

Ohbayashi N, Fukuda M. Recent advances in understanding the molecular basis of melanogenesis in melanocytes. F1000Res 2020; 9(F1000 Faculty Rev):608

Papadopoulou K, Karsai S, Böer-Auer A. Disseminated papular variant of Dowling-Degos disease: Histopathological features in POGLUT1 mutation. J Dtsch Dermatol Ges 2022; 20: 1423-1429

Pires-daSilva A, Sommer RJ. The evolution of signalling pathways in animal development. Nat Rev Genet 2003; 4: 39-49 Ralser DJ, Basmanav FB, Tafazzoli A, Wititsuwannakul J, Delker S, Danda S, Thiele H, Wolf S, Busch M, Pulimood SA, Altmuller J, Nurnberg P, Lacombe D, Hillen U, Wenzel J, Frank J, Odermatt B, Betz RC. Mutations in gamma-secretase subunit-encoding PSENEN underlie Dowling-Degos disease associated with acne inversa. J Clin Invest 2017; 127: 1485-1490

Ralser DJ, Takeuchi H, Fritz G, Basmanav FB, Effern M, Sivalingam S, El-Shabrawi-Caelen L, Degirmentepe EN, Kocaturk E, Singh M, Booken N, Spierings NMK, Schnabel V, Heineke A, Knuever J, Wolf S, Wehner M, Tronnier M, Leverkus M, Tantcheva-Poor I, Wenzel J, Oji V, Has C, Holzel M, Frank J, Haltiwanger RS, Betz RC. Altered Notch Signaling in Dowling-Degos Disease: Additional Mutations in POGLUT1 and Further Insights into Disease Pathogenesis. J Invest Dermatol 2019; 139: 960-964

Sachan N, Sharma V, Mutsuddi M, Mukherjee A. Notch signalling: multifaceted role in development and disease. FEBS J 2023. Epub ahead of print.

Sbalchiero A, Abu Hweij Y, Mazza T, Buscarini E, Scotti C, Pagella F, Manfredi G, Matti E, Spinozzi G, Olivieri C. Hereditary hemorrhagic telangiectasia: First demonstration of a founder effect in Italy; the ACVRL1 c.289_294del variant originated in the country of Bergamo 200 years ago. Mol Genet Genomic Med 2022; 10: e1972

Schouwey K, Beermann F. The Notch pathway: hair graying and pigment cell homeostasis. Histol Histopathol 2008; 23: 609-619

Shinagawa J, Moteki H, Nishio S-y, Noguchi Y, Usami S-i. Haplotype Analysis of GJB2 Mutations: Founder Effect or Mutational Hot Spot? Genes 2020; 11: 250

Siebel C, Lendahl U. Notch Signaling in Development, Tissue Homeostasis, and Disease. Physiol Rev 2017; 97: 1235-1294

Simpson P. Introduction: Notch signalling and choice of cell fates in development. Semin Cell Dev Biol 1998; 9: 581-582

Solovyev AV, Kushniarevich A, Bliznetz E, Bady-Khoo M, Lalayants MR, Markova TG, Minárik G, Kádasi L, Metspalu E, Pshennikova VG, Teryutin FM, Khusnutdinova EK, Poliakov A, Metspalu M, Posukh OL, Barashkov NA, Fedorova SA. A common founder effect of the splice site variant c.-23 + 1G > A in GJB2 gene causing autosomal recessive deafness 1A (DFNB1A) in Eurasia. Hum Genet 2022; 141: 697-707

Stephan C, Kurban M, Abbas O. Dowling-Degos disease: a review. Int J Dermatol 2021; 60: 944-950

Thornton MJ. Oestrogen functions in skin and skin appendages. Expert Opin Ther Targets 2005; 9: 617-629

Tomita Y, Suzuki T. Genetics of pigmentary disorders. Am J Med Genet C Semin Med Genet 2004; 131c: 75-81

Toonen JA, Ronchetti A, Sidjanin DJ. A Disintegrin and Metalloproteinase10 (ADAM10) Regulates NOTCH Signaling during Early Retinal Development. PLoS One 2016; 11: e0156184

Wang W, Okajima T, Takeuchi H. Significant Roles of Notch O-Glycosylation in Cancer. Molecules 2022; 27:

Wenzel J, Tappe K, Gerdsen R, Uerlich M, Philipp-Dormston W, Bieber T, Petrow W. Successful treatment of Dowling-Degos disease with Er:YAG laser. Dermatol Surg 2002; 28: 748-750

Yoshida H, Grimm T, Nishimura EK, Nishioka E, Nishikawa S-I, Kunisada T. Review: Melanocyte Migration and Survival Controlled by SCF/c-kit Expression. J Investig Dermatol Symp Proc 2001; 6: 1-5

Yun JH, Kim JH, Choi JS, Roh JY, Lee JR. Treatment of Dowling-Degos disease with fractional Er:YAG laser. J Cosmet Laser Ther 2013; 15: 336-339

Zhang J, Li M, Yao Z. Updated review of genetic reticulate pigmentary disorders. Br J Dermatol 2017; 177: 945-959

2. Veröffentlichungen

772

Altered Notch signalling in Dowling-Degos disease: a transcriptomic insight into disease pathogenesis

https://doi.org/10.1093/bjd/ljad306

Dear Editor, Dowling-Degos disease (DDD; MIM 179850, 615327, 615696 and 613736) is a rare autosomal-dominant pigmentation disorder characterized by progressive reticulate hyperpigmentation and small hyperkeratotic dark-brown papules that affect the trunk, face, flexures, large skin folds and/or extremities. To date, research has identified causative loss-of function variants in four genes: *KRT5*, *POFUT1*,¹ *POGLUT1* and *PSENEN*.

Growing evidence implicates altered Notch signalling in DDD pathogenesis. Notably, *POFUT1*, *POGLUT1* and *PSENEN* encode Notch pathway proteins, and loss of *KRT5* expression is associated with altered Notch signalling.² However, the precise molecular mechanisms through which Notch signalling contributes to DDD pathogenesis are unknown. To decipher a common underlying pathomechanism, we examined transcriptional changes secondary to *POGLUT1/PSENEN* small interfering RNA (siRNA)-mediated knockdown via unbiased transcriptome-sequencing (RNAseq).

Transient transfection was performed in both the human keratinocyte cell line HaCaT and the melanocyte-derived cell line MZ7-mel using (i) a control siRNA (SI03650318) and (ii) siRNAs targeting different domains of POGLUT1 or PSENEN [POGLUT1: siRNA1 (SI04194022) and siRNA2 (SI04217885); PSENEN: siRNA3 (SI03084956) and siRNA4 (SI00157584)] (all QIAGEN, Hilden, Germany). Knockdown was validated by quantitative reverse transcription polymerase chain reaction (RT-gPCR; data not shown). Next, principal component analysis of RNAseq data revealed a clear differentiation between control cells and knockdown samples with a subtler distinction between POGLUT1 and PSENEN knockdown cells, except for one specific POGLUT1 siRNA (siRNA1; Figure 1a). As siRNA1 knockdown cells showed morphological abnormalities that might be attributable to off-target/toxic siRNA effects, related samples were excluded from further analysis. Subsequently, differential expression analyses revealed altered gene expression of multiple Notch genes (Figure 1b). To investigate common downstream effects for POGLUT1 and PSENEN variants, POGLUT1 and PSENEN knockdowns were combined into one dataset, and the 250 most significant genes for each cell line were subjected to PANTHER pathway analysis using Reactome as an annotation database (Figure 1c). In MZ7-mel cells, Notch signalling was the most enriched pathway, whereas no enrichment of Notch signalling was observed in HaCaT cells. Furthermore, pathways that were highly over-represented in MZ7-mel cells only included genes involved in oestrogen signalling receptor (ESR)-mediated signalling, receptor tyrosine kinase signalling and membrane trafficking.

To assess Notch signalling activity at the functional level, measurements of cleaved Notch1 (Notch1^{IC}) (PathScan[®] Sandwich ELISA Kit #7194; Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA) were made. MZ7-mel cells showed a significant decrease in Notch1^{IC} under knockdown conditions, with the decreased levels correlating to knockdown efficiencies determined by RT-qPCR and RNAseq (Figure 1d). In HaCaT cells, no baseline activity in control cells or any activity in knockdown samples was detected (Figure 1d).

In the melanocyte-derived cell line, knockdown of either POGLUT1 or PSENEN led to a pronounced decrease in Notch signalling activity. Interestingly, a comparison of the respective transcriptomic datasets revealed subtle differences across profiles, suggesting a common downstream pathomechanism. This is supported by the study of Li et al.,¹ which revealed differentially expressed Notch pathway genes in POFUT1 knockdown zebrafish larvae. In the keratinocyte-derived cell line, no Notch activity was detectable, and pathway analysis revealed no enrichment of Notch signalling, although we detected a substantial reduction in POGLUT1 and PSENEN expression, and altered expression of other Notch pathway genes in our RNAseq data. Whereas previous studies on DDD analysed effects on single Notch genes only,¹ our results go beyond. In DDD, keratinocytes show normal keratin filaments and regular interactions with hemidesmosomes and desmosomes. In contrast, melanocytes display an abnormal morphology,¹ which can be explained by our findings of relevant transcriptional and functional changes only in the melanocyte-derived cell line.

Many specific molecular effects underlie skin pigmentation disorders, including dysfunction in melanin synthesis, formation of the melanosomes and their transfer within the melanocyte, and abnormal melanocyte development.³ We identified altered membrane trafficking, receptor tyrosine kinase signalling and ESR-mediated signalling as three promising downstream pathways through which decreased Notch signalling may lead to the phenotypic manifestations of DDD. While modified membrane trafficking processes may lead to malfunctioning melanosome biogenesis, transport and transfer,⁴ research suggests that receptor tyrosine kinase signalling regulates melanocyte development and differentiation,⁵ as well as melanogenesis.⁶ Preliminary work has demonstrated that increased oestradiol levels stimulate enzymes involved in melanogenesis,⁷ and growing research over recent decades suggests a link between oestrogen and skin pigmentation.8

In conclusion, our results implicate a key role of dysfunctional melanocyte Notch signalling in DDD pathogenesis. Additionally, altered biogenesis and intracellular trafficking of melanosomes, receptor tyrosine kinase signalling and ESR-mediated signalling may represent downstream molecular mechanisms through which decreased Notch signalling leads to hyperpigmentation in DDD. Finally, a common downstream pathomechanism for both *POGLUT1* and *PSENEN* mutation carriers can be assumed.

Sheetal Kumar,¹ Jonas Hausen,² Sugirthan Sivalingam,² Aytaj Humbatova,¹ Andreas Buness,^{2,3} Jorge Frank,⁴ Damian J. Ralser¹ and Regina C. Betz¹

¹Institute of Human Genetics, University of Bonn, Medical Faculty and University Hospital Bonn, Bonn, Germany; ²Institute for Genomic Statistics and Bioinformatics, University of Bonn, Medical Faculty and University Hospital Bonn, Bonn, Germany; ³Institute for Medical Biometry, Informatics and Epidemiology, Medical Faculty, University of Bonn, Bonn Germany and

Research Letters

Research Letters



Figure 1 RNA sequencing analysis and cleaved Notch1 enzyme-linked immunosorbent assay in small interfering RNA (siRNA)-mediated *POGLUT1* and *PSENEN* knockdown MZ7-mel and HaCaT cells. (a) Principal component (PC) analysis performed with the 500 most variably expressed genes in MZ7-mel cells. siRNA1 and siRNA2: *POGLUT1* knockdown cells; control A: *POGLUT1* control cells; siRNA3 and siRNA4: *PSENEN* knockdown cells. Control B: *PSENEN* control cells. (b) Heatmap analysis of Notch signalling genes in MZ7-mel and HaCaT cells after *POGLUT1* (siRNA2) and *PSENEN* (siRNA3, siRNA4) knockdown. The colour scheme is based on the fold change, with downregulation in red, upregulation in blue and undetermined directionality in white. Crosses indicate nonsignificant results. (c) Bar graph illustrating PANTHER pathway analysis of the top 250 significant genes an annotation database. ESR, oestrogen signalling receptor; MECP2, methyl CpG binding protein 2; PAK, p21-activated kinase. (d) Cleaved Notch1 (Notch1^{IC}) shows a significantly higher expression in MZ7-mel cells compared with HaCaT siRNA control cells (top). *POGLUT1* and *PSENEN* knockdown inhibits the cleavage of Notch1 in MZ7-mel cells (bottom). Values represent the mean of three independent experiments, as performed in triplicate. Error bars represent the SD. **P* ≤ 0.05; ***P* ≤ 0.001; ****P* ≤ 0.001.

773

Research Letters



Figure 1 RNA sequencing analysis and cleaved Notch1 enzyme-linked immunosorbent assay in small interfering RNA (siRNA)-mediated *POGLUT1* and *PSENEN* knockdown MZ7-mel and HaCaT cells. (a) Principal component (PC) analysis performed with the 500 most variably expressed genes in MZ7-mel cells. siRNA1 and siRNA2: *POGLUT1* knockdown cells; control A: *POGLUT1* control cells; siRNA3 and siRNA4: *PSENEN* knockdown cells. Control B: *PSENEN* control cells. (b) Heatmap analysis of Notch signalling genes in MZ7-mel and HaCaT cells after *POGLUT1* (siRNA2) and *PSENEN* (siRNA3, siRNA4) knockdown. The colour scheme is based on the fold change, with downregulation in red, upregulation in blue and undetermined directionality in white. Crosses indicate nonsignificant results. (c) Bar graph illustrating PANTHER pathway analysis of the top 250 significant genes an annotation database. ESR, oestrogen signalling receptor; MECP2, methyl CpG binding protein 2; PAK, p21-activated kinase. (d) Cleaved Notch1 (Notch1^{IC}) shows a significantly higher expression in MZ7-mel cells compared with HaCaT siRNA control cells (top). *POGLUT1* and *PSENEN* knockdown inhibits the cleavage of Notch1 in MZ7-mel cells (bottom). Values represent the mean of three independent experiments, as performed in triplicate. Error bars represent the SD. **P* ≤ 0.05; ***P* ≤ 0.001; ****P* ≤ 0.001.

773

2.2 Publikation B

Founder Variants in *KRT5* and *POGLUT1* Are Implicated in Dowling-Degos Disease



Journal of Investigative Dermatology (2024) 144, 181–184; doi:10.1016/j.jid.2023.04.036

TO THE EDITOR

Dowling-Degos disease (DDD; MIM 179850, 615327, 615696, and 613736) is a rare, autosomal dominant skin pigmentation disorder (Degos and 1954; Dowling Ossipowski, and Freudenthal, 1938). Depending on which gene is mutated, affected individuals show progressive, reticulate hyperpigmentation that affects the trunk, face, flexures, large skin folds, genitals, and/or extremities, sometimes accompanied by pruritus. Histopathologic features encompass filiform epithelial downgrowth of the epidermal rete ridges, with deposition of melanin at the tips (Betz et al., 2006). In 2006, we identified pathogenic variants in keratin 5 (KRT5) (Betz et al., 2006) in patients with DDD who presented with hyperpigmentation in the large body folds, trunk, neck, and

face. Subsequently, we and Li et al. (2013) identified pathogenic variants in the genes encoding protein O-fucosyltransferase 1 (Basmanav et al., 2015; Li et al., 2013) and protein O-glucosyltransferase 1 (POGLUT1) (Basmanav et al., 2014; Ralser et al., 2019). The protein O-fucosyltransferase 1 variants were found in patients in whom hyperpigmentation involved wrists and genitals, whereas the POGLUT1 variants were found in patients in whom it involved extremities. Recently, we reported pathogenic variants in the gene presenilin enhancer, gamma-secretase subunit (PSENEN), which result in hyperpigmentation as well as, in susceptible individuals, concomitant acne inversa (Ralser et al., 2017).

To date, our search for pathogenic variants in the above-mentioned genes

Accepted manuscript published online 17 July 2023; corrected proof published online 24 August 2023 © 2023 The Authors. Published by Elsevier, Inc. on behalf of the Society for Investigative Dermatology. has involved >120 unrelated single DDD cases and their families from Germany, Denmark, and Switzerland after obtaining written informed consent in accordance with the principles of the Declaration of Helsinki (Basmanav et al., 2015; Betz et al., 2006; Ralser et al., 2017, 2019). Among these, we detected one recurrent *KRT5* (c.418dup [p.lle140Asnfs*39]) (Figure 1a; Table 1) and seven recurrent *POGLUT1* variants (see in subsequent section; Table 1) in a total of 18 and 21 individuals, respectively, from distinct and apparently unrelated families.

To determine whether these recurrent sequence deviations reflected mutational hotspots or a founder effect, genotyping was performed using GSAMD24v2-0 chips (Ilumina) and the Infinium HTS Assay protocol (Ilumina). Genotype phasing was performed using Eagle 2.4.1 (Loh et al., 2016) and the 1000 Genomes Phase 3 data (Auton et al., 2015) as a reference panel. Haplotypes were reconstructed in a 10 megabase (Mb) region around *KRT5* on

Abbreviations: DDD, Dowling-Degos disease; KRT5, keratin 5; Mb, megabase; POGLUT1, protein O-glucosyltransferase 1

S Kumar et al.

Founder Variants in Dowling-Degos Disease



Figure 1. Founder variants in *KRT5*: c.418dup and in *POGLUT1*: c.652C>T. (a) *KRT5*: c.418dup (p.lle140Asnfs*39): places of residence of the 18 affected individuals in our cohort. (b) *KRT5*: c.418dup (p.lle140Asnfs*39): the variant was surrounded by a common haplotype in all investigated cases. M indicates the location of the variant. The blue horizontal bars indicate the size of the shared haplotype in the 18 unrelated individuals. (c) *POGLUT1*: c.652C>T (p.Arg218*): the variant was surrounded by a common haplotype in all investigated cases. The remaining markers diverged into two distinct haplotypes. In this study, haplotype breaks were localized at the same SNV down and upstream of the locus of interest. M indicates the location of the variant. The blue and green horizontal bars indicate the size of the shared haplotype in the seven unrelated individuals.

Table 1. Haplotype Analysis of the Recurrent Pathogenic Variants in KRT5 and POGLUT1

Founder Variant	Number of Index Cases/ Families in Our Cohort	Minimum Size of Common Haplotype	Number of Markers in Minimum Common Haplotype	Flanking Markers of Minimum Common Haplotype	Maximum Size of Common Haplotype	Number of Markers in Maximum Common Haplotype	Flanking Markers of Maximum Common Haplotype	Place of Residence
<i>KRT5</i> : c.418dup (p.lle140Asnfs*39)	18	146 kb	72	rs61730590 rs199845547	6.1 Mb	1418	rs10747524 rs995901	Germany
POGLUT1: c.652C>T (p.Arg218*)	7	64 kb	16	rs114615589 rs11539377	420 kb / 581 kb	192 / 144	rs200397968 rs73854716 /rs75233365 rs72551374	Germany
<i>POGLUT1</i> : c.798- 2A>C	3	424 kb	140	rs747001 seq-rs12721613	501 kb	170	rs35807235 rs61755051	Germany
<i>POGLUT1</i> : c.835C>T (p.Arg279Trp)	3	108 kb	30	rs56129904 rs149492706	229 kb	66	rs7610546 rs2229098	Germany
POGLUT1: c.1051C>T (p.Gln351*)	2	1 Mb	253	rs61744410 rs116111919	1 Mb	253	rs61744410 rs116111919	Germany
POGLUT1: c.205C>T (p.Arg69*)	2	553 kb	170	rs4687985 rs2461817	553 kb	170	rs4687985 rs2461817	Germany, Switzerland
POGLUT1: c.1080_1081insG (p.Asn361Glufs*5)	2	163 kb	52	rs935616 rs1385520	163 kb	52	rs935616 rs1385520	Germany
POGLUT1: c.11G>A (p.Trp4*)	2	115 kb	31	rs77700423 rs7628626	115 kb	31	rs77700423 rs7628626	Germany, Denmark

chromosome 17 and in a 2 Mb region around *POGLUT1* on chromosome 3.

For the recurrent variant c.418dup (p.lle140Asnfs*39) in *KRT5*, a total of 1,420 markers spanning a region of \sim 6.1 Mb between SNV rs2544039 and SNV rs1867299 were analyzed. All patients and their families shared a minimal common haplotype of \sim 150 kilobases between SNVs rs61730590 and rs199845547, including all 10 intragenic markers (Figure 1b; Table 1).

The recurrent variants in *POGLUT1* comprised c.652C>T (p.Arg218*), c.798-2A>C, c.835C>T (p.Arg279Trp), c.1051C>T (p.Gln351*), c.205C>T (p.Arg69*), c.1080_1081insG (p.Asn361 Glufs*5), and c.11G>A (p.Trp4*). All *POGLUT1* variant carriers shared a minimal common haplotype from ~60 kilobase to 1 Mb, including all seven intragenic markers (Table 1).

The detection of a common haplotype spanning from 60 kilobase to 6.1 Mb in all patients who were indexed indicated that each of the present eight recurrent variants probably arose from a common ancestor, thus reflecting founder effects. For all pathogenic variants, sizes of the shared haplotype are probably associated with the age of the founder variant (Drayna, 2005). In general, large conserved haplotypes are indicative of relatively recent mutational events (Sbalchiero et al., 2022), as in patients indexed as DDD16 and DDD14 in this cohort (Figure 1b). In contrast, shortening of the common haplotype owing to recombination events is usually suggestive of relatively distant mutational events (Ma et al., 2022), as in patients indexed as DDD19-25 (Figure1c).

To date, the recurrent KRT5 variant c.418dup has only been reported once outside of Germany (Lőrincz et al., 2018). In the present cohort, all index carriers of c.418dup resided within a German geographic area of ~41,000 square kilometers. Excluding three exceptional cases, this area could be condensed even further to 2,600 square kilometers, which represents 0.7% of the overall area of Germany (Figure 1a). The geographic proximity of all patients who were indexed strongly supports the hypothesis that c.418dup is a novel German founder variant which probably arose in the area in which these individuals and their families reside. Despite this spatial condensation, we found no association between the size of the shared haplotype and the geographic distances of the respective places of residence. However, this is not entirely surprising, because we only had information concerning the current place of residence of each patient who was indexed and their family. Thus, thorough tracing of the specific ancestral residence might reveal migration as a possible explanation for these results (Shinagawa et al., 2020; Solovyev et al., 2022).

For the most frequent POGLUT1 pathogenic variant, c.652C>T (p.Arg218*), haplotype analysis revealed a minimal shared haplotype of ~60 kilobases in all seven affected individuals, which spanned from marker rs114615589 to rs11539377. Interestingly, however, we found two different continuous haplotypes up and downstream of markers rs1132200 and rs2293370 in four and three families, respectively, suggesting that these two branches share an even closer familial relationship (Figure 1c) (Sbalchiero et al., 2022).

To our knowledge, our data are the first to demonstrate that founder effects in KRT5 and POGLUT1 can contribute to the manifestation of DDD. Furthermore, the present results may suggest that DDD is more common than previously assumed, at least in Germany, considering that we were able to detect eight different founder variants predominantly among patients from German and their families. This may be attributable to the fact that DDD can easily be overlooked, misdiagnosed as a nonspecific and harmless case of lentiginosis, or confused with other hereditary and/or acquired disorders of hyperpigmentation (Zhang et al., 2017). Thus, DDD may have a higher prevalence than thought previously, particularly in Germany.

Ethics statement

Ethical approval was obtained from the ethics committee of the Medical Faculty of the University of Bonn.

Data availability statement

The genotyping dataset that supports this study has not been deposited in a

public repository, because the patients did not give consent for this procedure. However, datasets are available from the corresponding author on reasonable request.

ORCIDs

Sheetal Kumar: https://orcid.org/0000-0002-5240-079X Oleg Borisov: https://orcid.org/0000-0001-8700-4335 Carlo Maj: https://orcid.org/0000-0002-9559-Damian J. Ralser: https://orcid.org/0000-0001-8916-7605 Aytaj Humbatova: https://orcid.org/0000-0002-231-435 Sandra Hanneken: https://orcid.org/0009-0006-5973-4131 Schmieder: Astrid https://orcid.org/0000-0002-6421-9699 Janina Groß: https://orcid.org/0009-0000-8960-6217 Laura Maintz: https://orcid.org/0000-0001-6053-1530 Andre Heineke: https://orcid.org/0000-0002-6736-2087 https://orcid.org/0000-0003lana Knuever: 1066-6431 Christina Fagerberg: https://orcid.org/0000-002-5206-432 Parmentier: https://orcid.org/0000-Laurent 0003-1455-0620 Waltraud Anemüller: https://orcid.org/0000-0002-6326-8560 Vinzenz Oji: https://orcid.org/0000-0003-1380-4828 Iliana Tantcheva-Poór: https://orcid.org/0000-0002-2626-922 Regina Fölster-Holst: https://orcid.org/0000-0001-9114-235 Joerg W 4744-5993 Wenzel: https://orcid.org/0000-0002-Peter M. Krawitz: https://orcid.org/0000-0002-3194-8625 Jorge Frank: https://orcid.org/0000-0003-1439-Regina C. Betz: https://orcid.org/0000-0001-5024-3623

CONFLICT OF INTEREST

The authors state no conflict of interest.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors would like to thank all patients and their families for their participation. This work was supported by local funding (BONFOR to S.K., D.J.R., and R.C.B.). R.C.B. is funded by the Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG, German Research Foundation) under the auspices of the Germany Excellence Strategy – EXC2151 – 390873048, and is a past recipient of a Heisenberg Professorship of the DFG (BE 2346/4-2). L.M. was supported by the Christine Kuehne-Center for Allergy Research and Education (CK-CARE).

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Conceptualization: SK, DJR, RCB; Formal Analysis: SK, OB, CM; Investigation: SK; Resources: SH, AS, JG, LM, AH, JK, CF, LM, WM, VO, IT-P, RF-H, JW; Visualization: SK; Funding Acquisition: SK, DJR, RCB; Supervision: DJR, JF, RCB; Writing-Original Draft Preparation: SK; Writing-Review and Editing: SK, OB, DJR, AH, PK, JF, RCB.

Z Wang et al. NETosis Is Induced by Complement C5a

Sheetal Kumar¹, Oleg Borisov², Carlo Maj^{2,3}, Damian J. Ralser¹, Aytaj Humbatova¹, Sandra Hanneken⁴, Astrid Schmieder⁵, Janina Groß⁶, Laura Maintz^{6,7}, Andre Heineke⁸, Jana Knuever⁹, Christina Fagerberg¹⁰, Laurent Parmentier¹¹, Waltraud Anemüller¹², Vinzenz Oji¹³, Iliana Tantcheva-Poór⁹, Regina Fölster-Holst¹⁴, Joerg Wenzel⁵, Peter M. Krawitz², Jorge Frank^{15,16} and Regina C. Betz^{1,16,*}

¹Institute of Human Genetics, University of Bonn, Medical Faculty & University Hospital Bonn, Bonn, Germany; ²Institute for Genomic Statistics and Bioinformatics, University of Bonn, Medical Faculty & University Hospital Bonn, Bonn, Germany; ³Center for Human Genetics, University Hospital of Marburg, Marburg, Germany; ⁴Private Practice Empoderm, Duesseldorf, Germany; ⁵Department of Dermatology, Venereology and Allergology, University Hospital Wuerzburg, Wuerzburg, Germany; ⁶Department of Dermatology and Allergy, University Hospital Bonn, Bonn, Germany; ⁷Christine Kuehne - Center for Allergy Research and Education Davos (CK-CARE), Davos, Switzerland; ⁸Dermatologist practice, Dr. Karches/Dr. Thielert, Hannover, Germany; ⁹Department of Dermatology, University of Cologne, Cologne, Germany; ¹⁰Department of Clinical Genetics, Odense University Hospital, Odense, Denmark; ¹¹Department of Dermatology, Valais Hospital, Sierre, Switzerland; ¹²Department of Dermatology, Allergology and Venereology, University of Luebeck, Luebeck, Germany; ¹³Department of Dermatology, University of Muenster, Muenster, Germany; 14 Department of Dermatology, Allergology and Venereology, University Hospital Schleswig-Holstein, Campus Kiel, Kiel, Germany; and ¹⁵Department of Dermatology, Venereology

and Allergology, University Medical Center Goettingen, Goettingen, Germany

¹⁶These authors share senior authorship.

*Corresponding author e-mail: regina.betz@ uni-bonn.de

REFERENCES

- Genomes Project Consortium, Auton A, Brooks LD, Durbin RM, Garrison EP, Kang HM, Korbel JO, et al. A global reference for human genetic variation. Nature 2015;526:68–74.
- Basmanav FB, Fritz G, Lestringant GG, Pachat D, Hoffjan S, Fischer J, et al. Pathogenicity of POFUT1 in Dowling-Degos disease: additional mutations and clinical overlap with reticulate acropigmentation of kitamura. J Invest Dermatol 2015;135:615–8.
- Basmanav FB, Oprisoreanu AM, Pasternack SM, Thiele H, Fritz G, Wenzel J, et al. Mutations in POGLUT1, encoding protein O-glucosyltransferase 1, cause autosomal-dominant Dowling-Degos disease. Am J Hum Genet 2014;94:135–43.
- Betz RC, Planko L, Eigelshoven S, Hanneken S, Pasternack SM, Bussow H, et al. Loss-of-function mutations in the keratin 5 gene lead to Dowling-Degos disease. Am J Hum Genet 2006;78:510–9.
- Degos R, Ossipowski B. Dermatose pigmentaire réticulée des plis (discussion de l'acanthosis nigricans) [Reticulated pigmentary dermatosis of the folds: relation to acanthosis nigricans]. Ann Dermatol Syphiligr (Paris) 1954;81:147–51.
- Dowling GB, Freudenthal W. Acanthosis nigricans. Proc R Soc Med 1938;31:1147-50.
- Drayna D. Founder mutations. Sci Am 2005;16:58-65.
- Li M, Cheng R, Liang J, Yan H, Zhang H, Yang L, et al. Mutations in POFUT1, encoding protein O-fucosyltransferase 1, cause generalized Dowling-Degos disease. Am J Hum Genet 2013;92:895–903.
- Loh PR, Danecek P, Palamara PF, Fuchsberger C, Reshef YA, Finucane HK, et al. Reference-based

phasing using the Haplotype Reference Consortium panel. Nat Genet 2016;48:1443-8.

- Lörincz K, Medvecz M, Kiss N, Glász-Bóna A, Hársing J, Lepesi-Benkő R, et al. Confirmation of the role of a KRT5 mutation and successful management of skin lesions in a patient with Galli-Galli disease. Clin Exp Dermatol 2018;43:972–4.
- Ma Y, Wang X, Shoshany N, Jiao X, Lee A, Ku G, et al. CLCC1 c. 75C>A mutation in Pakistani derived retinitis pigmentosa families likely originated with a single founder mutation 2, 000–5,000 years ago. Front Genet 2022;13: 804924.
- Ralser DJ, Basmanav FB, Tafazzoli A, Wititsuwannakul J, Delker S, Danda S, et al. Mutations in γ -secretase subunit-encoding PSENEN underlie Dowling-Degos disease associated with acne inversa. J Clin Invest 2017;127:1485–90.
- Ralser DJ, Takeuchi H, Fritz G, Basmanav FB, Effern M, Sivalingam S, et al. Altered Notch signaling in Dowling-Degos disease: additional mutations in POGLUT1 and further insights into disease pathogenesis. J Invest Dermatol 2019;139:960–4.
- Sbalchiero A, Abu Hweij Y, Mazza T, Buscarini E, Scotti C, Pagella F, et al. Hereditary hemorrhagic telangiectasia: first demonstration of a founder effect in Italy; the ACVRL1 c. 289_294del variant originated in the country of Bergamo 200 years ago. Mol Genet Genomic Med 2022;10:e1972.
- Shinagawa J, Moteki H, Nishio SY, Noguchi Y, Usami SI. Haplotype analysis of GJB2 mutations: founder effect or mutational hot spot? Genes 2020;11:250.
- Solovyev AV, Kushniarevich A, Bliznetz E, Bady-Khoo M, Lalayants MR, Markova TG, et al. A common founder effect of the splice site variant c.-23 + 1G > A in GJB2 gene causing autosomal recessive deafness 1A (DFNB1A) in Eurasia. Hum Genet 2022;141: 697–707.
- Zhang J, Li M, Yao Z. Updated review of genetic reticulate pigmentary disorders. Br J Dermatol 2017;177:945–59.

3. Danksagung

Mein herzlicher Dank gilt vorrangig meiner Doktormutter Frau Prof. Dr. med. Regina C. Betz für die exzellente Betreuung meiner Dissertation und ihre immerwährende Unterstützung - in allen Phasen dieser Arbeit und auch darüber hinaus. Sie bot mir einen idealen Einstieg in die wissenschaftliche Forschung mit der Chance, an mehreren spannenden Projekten mitzuwirken und öffnete mir die Tür in das faszinierende Fach der Humangenetik.

Ebenso möchte ich mich bei meinem Zweitbetreuer Herrn Dr. med. Damian J. Ralser bedanken, der mich mit außergewöhnlichem persönlichem Engagement während der gesamten Arbeit betreute und bei inhaltlichen oder organisatorischen Herausforderungen stets mit Rat und Tat zur Seite stand.

Desweiteren bedanke ich mich auch herzlich bei Herrn Prof. Dr. med. Jorge A. Frank für den überaus konstruktiven Austausch und seine wertvollen Denkanstöße, die sehr zu dem guten Gelingen dieses Projektes beigetragen haben.

Ein großes Dankeschön richte ich an die gesamte Arbeitsgruppe um Frau Prof. Betz für ihre Hilfsbereitschaft, Freundlichkeit und die angenehme Arbeitsatmosphäre. Für die Einarbeitung in die Methodik bedanke ich mich besonders bei Frau Sabrina Wolf.

Darüber hinaus möchte ich mich von Herzen bei Frau Prof. Dr. med. Gesa Schwanitz für ihr stets offenes Ohr und ihr Interesse an meiner Arbeit bedanken.

Mein besonderer Dank gilt den übrigen Ko-Autor*innen für die hervorragende Zusammenarbeit. Vor allem die gemeinsame Arbeit mit Herrn Oleg Borisov, PhD, wird mir äußerst positiv in Erinnerung bleiben.

Mein ausdrücklicher Dank geht auch an die Patient*innen und Familien, ohne deren Teilnahme diese Forschungsarbeit nicht möglich gewesen wäre.

Für die fachliche und finanzielle Förderung im Rahmen des SciMed-Promotionsstipendiums danke ich der BONFOR-Forschungskommission.

Meinen lieben Freunden möchte ich für die vielen motivierenden Worte während der gesamten Zeit danken. Meinen tiefen Dank möchte ich Dr. med. Shaleen Rana aussprechen, dessen Unterstützung in der Endphase dieser Arbeit von unschätzbarem Wert war.

An letzter, doch eigentlich an erster Stelle, gebührt mein tiefster Dank meiner geliebten Familie - insbesondere meinen Eltern Sunita und Manoj Kumar, sowie meinen Großeltern Shyama Devi und Ram Singh. Sie haben mir diesen Lebensweg ermöglicht und mich mit unermüdlicher Liebe und Unterstützung in meinem Studium und in allen Lebensbereichen begleitet.

4. Akademische Laufbahn und Auszeichnungen

Promotionsstudium

2018 – 2024 Promotion am Institut für Humangenetik, Bonn Arbeitsgruppe Dermatogenetik Doktormutter: Prof. Dr. med. Regina C. Betz Note "summa cum laude (0,0)"

Auszeichnungen/Stipendien

03/2023	Posterpreis	der	Deutschen	Gesellschaft	für	Humangenetik,
	Jahrestagun	g 202	3, Kassel			
10/2018	BONFOR	SciMe	ed-Promotion	isstipendium	der	Medizinischen
	Fakultät der	Rheir	nischen Fried	rich-Wilhelms-	Unive	ersität Bonn

Wissenschaftliche Arbeiten

- Wang H, Humbatova A, Liu Y, Qin W, Lee M, Cesarato N, Kortüm F, Kumar S, Romano MT, Dai S, Mo R, Sivalingam S, Motameny S, Wu Y, Wang X, Niu X, Geng S, Bornholdt D, Kroisel PM, Tadini G, Walter SD, Hauck F, Girisha KM, Calza AM, Bottani A, Altmüller J, Buness A, Yang S, Sun X, Ma L, Kutsche K, Grzeschik KH, Betz RC, Lin Z. Mutations in SREBF1, Encoding Sterol Regulatory Element Binding Transcription Factor 1, Cause Autosomal-Dominant IFAP Syndrome. Am J Hum Genet 2020;107:34-45. doi: 10.1016/j.ajhg.2020.05.006
- Ralser DJ, Kumar S, Borisov O, Sarig O, Richard G, Wolf S, Krawitz PM, Sprecher E, Kreiß M, Betz RC. Identification of a founder mutation in KRT14 associated with Naegeli-Franceschetti-Jadassohn syndrome. Br J Dermatol 2020;183:756-757. doi.org/10.1111/bjd.19123
- Basmanav FB, Cesarato N, Kumar S, Borisov O, Kokordelis P, Ralser DJ, Wehner M, Axt D, Xiong X, Thiele H, Dolgin V, Gossmann Y, Fricker N, Dewenter MK, Weller K, Suri M, Reichenbach H, Oji V, Addor MC, Ramirez K, Stewart H, Garcia Bartels N, Weibel L, Wagner N, George S, Kilic A, Tantcheva-Poor I, Stewart A,

Dikow N, Blaumeiser B, Medvecz M, Blume-Peytavi U, Farrant P, Grimalt R, Bertok S, Bradley L, Eskin-Schwartz M, Birk OS, Bygum A, Simon M, Krawitz P, Fischer C, Hamm H, Fritz G, Betz RC. Assessment of the Genetic Spectrum of Uncombable Hair Syndrome in a Cohort of 107 Individuals. **JAMA Dermatol** 2022;158:1245-1253. doi: 10.1001/jamadermatol.2022.2319

- Lieberoth S, Kumar S, Brusgaard K, Ousager LB, Betz RC, Bygum A. Identification of a Novel PLCD1 Variant in a Danish Family with Hereditary Leukonychia. Skinmed 2023;21:44-46
- Kumar S, Wenzel J, Schön MP, Betz RC, Frank J. [POGLUT1-Varianten bei Morbus Dowling-Degos - Assoziation mit spezifischen klinischen und histopathologischen Merkmalen?]. J Dtsch Dermatol Ges 2023a;21:540-541. doi: 10.1111/ddg.15111_g
- Kumar S, Hausen J, Sivalingam S, Humbatova A, Buness A, Frank J, Ralser DJ, Betz RC. Altered Notch signalling in Dowling-Degos disease: a transcriptomic insight into disease pathogenesis. Br J Dermatol 2023b;189:772-774. doi: 10.1093/bjd/ljad306
- Kumar S, Borisov O, Maj C, Ralser DJ, Humbatova A, Hanneken S, Schmieder A, Groß J, Maintz L, Heineke A, Knuever J, Fagerberg C, Parmentier L, Anemüller W, Oji V, Tantcheva-Poór I, Fölster-Holst R, Wenzel J, Krawitz PM, Frank J, Betz RC. Founder Variants in KRT5 and POGLUT1 Are Implicated in Dowling-Degos Disease. J Invest Dermatol 2024;144:181-184. doi: 10.1016/j.jid.2023.04.036
- Xiong X, Cesarato N, Gossmann Y, Wehner M, Kumar S, Thiele H, Demuth S, Oji V, Geyer M, Hamm H, Basmanav FB, Betz RC. A nonsense variant in KRT31 is associated with autosomal-dominant monilethrix. Br J Dermatol 2024; Jul 19:ljae298. doi: 10.1093/bjd/ljae298
- Schmidt A, Danyel M, Grundmann K, Brunet T, Klinkhammer H, Hsieh TC, Engels H, Peters S, Knaus A, Moosa S, Averdunk L, Boschann F, Sczakiel HL, Schwartzmann S, Mensah MA, Pantel JT, Holtgrewe M, Bösch A, Weiß C, Weinhold N, Suter AA, Stoltenburg C, Neugebauer J, Kallinich T, Kaindl AM,

Holzhauer S, Bührer C, Bufler P, Kornak U, Ott CE, Schülke M, Nguyen HHP, Hoffjan S, Grasemann C, Rothoeft T, Brinkmann F, Matar N, Sivalingam S, Perne C, Mangold E, Kreiss M, Cremer K, Betz RC, Mücke M, Grigull L, Klockgether T, Spier I, Heimbach A, Bender T, Brand F, Stieber C, Morawiec AM, Karakostas P, Schäfer VS, Bernsen S, Weydt P, Castro-Gomez S, Aziz A, Grobe-Einsler M, Kimmich O, Kobeleva X, Önder D, Lesmann H, Kumar S, Tacik P, Basin MA, Incardona P, Lee-Kirsch MA, Berner R, Schuetz C, Körholz J, Kretschmer T, Di Donato N, Schröck E, Heinen A, Reuner U, Hanßke AM, Kaiser FJ, Manka E, Munteanu M, Kuechler A, Cordula K, Hirtz R, Schlapakow E, Schlein C, Lisfeld J, Kubisch C, Herget T, Hempel M, Weiler-Normann C, Ullrich K, Schramm C, Rudolph C, Rillig F, Groffmann M, Muntau A, Tibelius A, Schwaibold EMC, Schaaf CP, Zawada M, Kaufmann L, Hinderhofer K, Okun PM, Kotzaeridou U, Hoffmann GF, Choukair D, Bettendorf M, Spielmann M, Ripke A, Pauly M, Münchau A, Lohmann K, Hüning I, Hanker B, Bäumer T, Herzog R, Hellenbroich Y, Westphal DS. Strom T, Kovacs R, Riedhammer KM, Mayerhanser K, Graf E, Brugger M, Hoefele J, Oexle K, Mirza-Schreiber N, Berutti R, Schatz U, Krenn M, Makowski C, Weigand H, Schröder S, Rohlfs M, Vill K, Hauck F, Borggraefe I, Müller-Felber W, Kurth I, Elbracht M, Knopp C, Begemann M, Kraft F, Lemke JR, Hentschel J, Platzer K, Strehlow V, Abou Jamra R, Kehrer M, Demidov G, Beck-Wödl S, Graessner H, Sturm M, Zeltner L, Schöls LJ, Magg J, Bevot A, Kehrer C, Kaiser N, Turro E, Horn D, Grüters-Kieslich A, Klein C, Mundlos S, Nöthen M, Riess O, Meitinger T, Krude H, Krawitz PM, Haack T, Ehmke N, Wagner M. Next-generation phenotyping integrated in a national framework for patients with ultrarare disorders improves genetic diagnostics and yields new molecular findings. Nat Genet 2024;56:1644-1653. doi: 10.1038/s41588-024-01836-1