

Summary

One of the biggest challenges for mankind in the 21st century is aging, meaning the physical, physiological and psychological changes that take place in an individual with time. By 2050, more than 20% of the global population will be aged over 65 and the human society will face a variety of problems that come along with aging associated diseases. To fill the knowledge gap about aging mechanisms and to gain insight into the molecular pathogenesis of aging in general and of accelerated aging phenotypes, we used two genetic disorders, Hallermann-Streiff syndrome (HSS) and Bloom syndrome, as models in the present PhD study.

By using whole exome-sequencing, our group previously identified a *de novo* mutation in the *CHD6* gene in a patient with HSS. During my PhD study, we identified a *de novo* mutation in the *SMC2* gene in another patient with HSS. I used four HSS patient fibroblast cell lines, including the patient cell line with the *CHD6 de novo* mutation for my PhD study. I used Flow cytometry analysis (FACS), immunostaining, as well as western blot methods in order to study the DNA damage repair pathway in HSS patient cell lines. I didn't observe significant alterations of H2AX and ATM activation, which are the central factors for the DNA damage repair pathway, after treatment with stress inducing agents. Cell cycle measurements showed no checkpoint alterations, which is consistent with the results from the DNA damage repair pathway analyses. Unfortunately, there was no cell line available from the patient with the *SMC2* mutation. Therefore, I generated a heterozygous *SMC2* knockout (*SMC2*^{+/-}) HEK cell line, using the Crispr/Cas9 system. Investigations of ATM and H2AX activation, as well as cell cycle regulation, recapitulated the results from the patient fibroblast cell lines. Moreover, chromosome architecture and segregation analyses in patient fibroblasts and *SMC2*^{+/-} HEK cells indicated no severe alterations. In conclusion, we think that impaired DNA damage response and cell cycle dysregulation may not be the major underlying mechanism of HSS pathology.

Intriguingly, reduced *CHD6* RNA expression levels were observed in HSS patient cell line K617 carrying a *de novo* mutation in *CHD6* and *SMC2*^{+/-} HEK cells. Additionally, by using qPCR and western blotting, I also demonstrated significantly down-regulated *SMC2* expression in patient cell line K3016 carrying a heterozygous missense mutation in *SMC2*. These observations suggest a potential functional connection between *SMC2* and *CHD6* and their respective transcriptional regulation.

As a second part of my PhD study, we identified *PRKDC* as a novel causative gene for Bloom syndrome. *PRKDC* encodes the DNA-dependent protein kinase catalytic subunit (DNA-PKcs). Due to the known function of DNA-Pkcs in the DNA double strand break repair and the non-homologous end joining (NHEJ) pathways, I investigated the DNA damage repair pathway in *PRKDC* mutated patient cells by comet assay, micro-homologous mediated end joining (MMEJ) assay and western blot. I could observe a decreased level of DNA-PKcs, as well as a decreased level of phosphorylated DNA-PKcs in patient cells, indicating that the mutation influences protein stability and activation. The comet assay showed pronouncedly elongated comet tails in patient cells, suggesting that more unrepaired DNA fragments are present in the patient cells. MMEJ is used as a backup DNA damage repair pathway when NHEJ is impaired, as was shown for *XRCC4* mutated fibroblasts. Although DNA-PKcs and *XRCC4* both belong to the NHEJ pathway, unlike *XRCC4* mutated fibroblasts, patient cells showed no dramatic MMEJ activation in a plasmid end joining assay. This difference might indicate an unknown function for DNA-PKcs in the DNA damage repair process.

Our molecular genetic study identified the novel disease causing genes *SMC2* and *CHD6* for HSS, and *PRKDC* for Bloom syndrome. All of the respective proteins have important functions in genome integrity maintenance. Together with previous studies in the aging field, our work supports the widely accepted opinion, that dysfunction of so called “care taker” genes play a crucial role in the aging process.

Zusammenfassung

Eine der größten Herausforderungen der Menschheit im 21. Jahrhundert besteht im Altern, sprich der physischen, physiologischen und psychischen Veränderung des Individuums mit fortschreitender Zeit. Im Jahre 2050 werden mehr als 20% der globalen Bevölkerung im Alter von über 65 Jahren sein und die menschliche Gesellschaft wird vor einer Vielzahl von Problemen im Zusammenhang mit altersbedingten Krankheiten stehen. Um Wissenslücken hinsichtlich der Mechanismen des Alterns zu schließen und Einblick in die molekulare Pathogenese des Alterns im Allgemeinen sowie Phänotypen beschleunigten Alterns im Speziellen zu gewinnen, werden in der vorliegenden Doktorarbeit zwei genetische Störungen – das Hallermann-Streiff Syndrom (HSS) und das Bloom-Syndrom – als Modelle herangezogen.

Unter Anwendung einer vollständigen Exom-Sequenzierung konnte unsere Forschungsgruppe bereits eine *de novo* Mutation im *CHD6*-Gen eines HSS-Patienten identifizieren. Während meiner Studien als Doktorand ermittelten wir überdies eine *de novo* Mutation im *SMC2*-Gen eines weiteren an HSS leidenden Patienten. Für die vorliegende Doktorarbeit wurden vier Fibroblasten-Zelllinien, einschließlich der Zelllinie des Patienten mit der *CHD6 de novo* Mutation, herangezogen. Um den DNA-Reparatur-Pfad innerhalb von HSS-Zelllinien zu erforschen, wurden Durchflusszytometrie (FACS), Immunfärbung und Western Blot Methoden angewendet. Nach der Behandlung mit stressinduzierenden Wirkstoffen konnten keine signifikanten Veränderungen der H2AX- und ATM-Aktivierung beobachtet werden, den zentralen Faktoren des DNA-Reparatur-Pfades. Messungen des Zellzyklus zeigten keine Checkpoint-Veränderungen, was im Einklang mit den Ergebnissen aus den Analysen des DNA-Reparatur-Pfades steht. Da eine Zelllinie des Patienten mit der *SMC2*-Mutation leider nicht verfügbar war, wurde mithilfe des Crispr/Cas9-Systems eine heterozygote *SMC2*-Knockout (*SMC2^{+/-}*) HEK-Zelllinie generiert. Untersuchungen der ATM- und H2AX-Aktivierung sowie der Zellzyklusregulation bestätigten die Ergebnisse aus den Fibroblasten-Zelllinien der Patienten. Überdies deuteten weder eine Analyse der Chromosomarchitektur noch eine Segregationsanalyse in den Fibroblasten sowie den *SMC2^{+/-}* HEK-Zellen der Patienten auf schwerwiegende Veränderungen hin. Abschließend ziehen wir daraus die Annahme, dass eine Beeinträchtigung der DNA-Schadensantwort sowie eine Fehlregulierung des Zellzyklus möglicherweise nicht die hauptsächlichen zugrundeliegenden Mechanismen der HSS-Symptomatik sind.

Interessanterweise wurden reduzierte *CHD6* RNA-Expressionslevel in der HSS-Patienten-Zelllinie K617 beobachtet, welche Träger einer *de novo* Mutation innerhalb der *CHD6* und *SMC2*^{+/-} HEK-Zellen ist. Des Weiteren konnte mithilfe von qPCR und Western Blotting eine signifikant heruntergeregelte *SMC2*-Expression in der Patienten-Zelllinie K3016, ihrerseits Träger einer heterozygoten Missense-Mutation in *SMC2*, aufgezeigt werden. Diese Beobachtungen legen eine potentielle funktionelle Verbindung zwischen *SMC2* und *CHD6* sowie deren jeweiliger Transkriptionsregulation nahe.

Im zweiten Teil der vorliegenden Doktorarbeit haben wir *PRKDC* als ein neues ursächliches Gen für das Bloom-Syndrom identifiziert. *PRKDC* ist zuständig für die Kodierung der katalytischen Untereinheit der DNA-abhängigen Proteinkinase (DNA-PKcs). Aufgrund der bekannten Funktion der DNA-PKcs in der Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen und den Pfaden des Nicht-Homologen End-Joinings (NHEJ) wurde der DNA-Reparatur-Pfad in *PRKDC*-mutierten Patientenzellen mittels Comet-Assay, Mikro-Homology mediated End-Joining (MMEJ) Assay sowie Western Blot untersucht. Es konnten verringerte Level von DNA-PKcs sowie phosphorylierter DNA-PKcs in den Patientenzellen beobachtet werden, was nahelegt, dass die Mutation Einfluss auf Proteinstabilität und -aktivierung nimmt. Der Comet-Assay zeigte deutlich verlängerte Kometenschweife in den Patientenzellen, woraus wiederum geschlossen werden kann, dass mehr unreparierte DNA-Fragmente in den Patientenzellen vorliegen. MMEJ agiert, wie im Falle der XRCC4-mutierten Fibroblasten gezeigt, als ersatzweiser DNA-Reparatur-Pfad, wenn NHEJ beeinträchtigt ist. Obwohl DNA-PKcs und XRCC4 beide zum NHEJ-Pfad gehören, wiesen die Patientenzellen in einem Plasmid-End-Joining-Assay im Gegensatz zu den XRCC4-mutierten Fibroblasten keine dramatische MMEJ-Aktivierung auf. Dieser Unterschied könnte auf eine unbekannte Funktion der DNA-PKcs im DNA-Reparaturprozess hinweisen.

In unserer molekulargenetischen Studie wurden die neuen ursächlichen Gene *SMC2* und *CHD6* für HSS sowie *PRKDC* für das Bloom-Syndrom ermittelt. All jene Proteine übernehmen wichtige Funktionen in der Aufrechterhaltung der Genom-Stabilität. Zusammen mit vorangegangenen Studien in der Altersforschung stützt unsere Arbeit die weithin anerkannte Meinung, dass eine Dysfunktion sogenannter „care-taker“-Gene eine entscheidende Rolle im Alterungsprozess einnimmt.