

Abstract

Ageing is accompanied by a progressive and inexorable functional decline, eventually causing disability and death. Manifestation of ageing-associated diseases and progression of ageing-associated disability are a major burden of today's ageing society. Thus, there is a strong demand for research to elucidate the fundamental mechanisms underlying ageing, to improve the quality of life of millions of people. Although inevitable, ageing is strongly variable, ranging from longevity in centenarians to accelerated ageing in patients suffering from progeria. Studying the causes of progeria bears the potential to identify genes and molecular mechanisms with a major contribution to the manifestation of ageing-associated diseases and the ageing process in general. The two major aims of this thesis were to identify novel genes causing progeria syndromes and to elucidate the underlying pathomechanisms, in order to broaden our understanding of the molecular mechanisms of ageing.

Using whole-exome sequencing (WES) and subsequent copy number variation analysis in a patient suffering from Donohue syndrome, I identified a novel duplication in the *INSR* (*insulin receptor*) gene composed of two exons, and thereby expanded the mutational spectrum for this condition. Besides resolving the genetic structure of the duplication, I showed that the allele carrying the duplication is almost absent at the mRNA level, suggesting degradation of the mRNA and thus loss of insulin receptor function, which is in agreement with the severe manifestation of Donohue syndrome in this patient.

Recently, mutations in *ANO6* (*anoctamin 6*) promoting a putative gain-of-function were shown to be causative for progeria in two unrelated patients¹. With functional analyses I experimentally verified the gain-of-function hypothesis by Annexin-V flow cytometry analysis and further showed that the aberrant ANO6 function is accompanied by increased cell size and alterations in the cellular lipid composition. In addition, a specific effect on the MEK/ERK (mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase) signaling pathway, as shown by elevated phosphorylation in Western blots experiments, but not on the AKT (AKT serine/threonine kinase 1) or MTOR (mechanistic target of rapamycin) pathways was observed, linking ANO6 function to ERK-promoted cellular senescence. Strikingly, β -galactosidase activity measurement and cell proliferation analysis confirmed cellular senescence and impaired cell growth, thereby establishing for the first time a connection between ANO6 and cellular ageing.

Additionally, WES was used to identify the candidate gene in a patient suffering from progeria characterized by a strong phenotypical overlap with Hutchinson-Gilford progeria syndrome (HGPS). Strikingly, a *de novo* mutation was identified in a binding partner of LMNA (lamin A, encoded by *LMNA*), which is mutated in HGPS. Localization and co-transfection experiments revealed, that the mutation abrogates nuclear transport of this protein and in addition impairs localization of the wild type protein, suggesting a dominant-negative effect. Remarkably, examination of the nuclear phenotype in patient cells demonstrated an altered LMNA distribution and the appearance of nuclear blebbing, which is a hallmark of HGPS and other laminopathies. Additionally, similar to

other progeria syndromes, increased DNA damage was observed in the comet assay, thereby indicating a related pathomechanism.

In a severe neonatal progeria case, WES analysis resulted in the successful identification of a homozygous mutation in *MLIP* (*muscular LMNA interacting protein*), which has been shown to interact with LMNA. CRISPR/Cas9 (clustered regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR associated protein 9)- mediated knock-out of *Mlip* in C2C12 myoblasts revealed that *Mlip* is essential for C2C12 differentiation, establishing a connection to the severe phenotype of the patient, characterized among others by muscular atrophy.

In conclusion, the results presented in this thesis provide novel insights into the causes and pathomechanisms of progeria syndromes. The identification of two novel candidate genes and their functional characterization demonstrate the impact of these genes on cellular function and establish for the first time an experimental connection to accelerated ageing caused by mutations in *ANO6*, *MLIP* and a further LMNA-binding protein.

Zusammenfassung

Der Alterungsprozess ist durch einen fortschreitenden und unaufhaltsamen funktionellen Abbau gekennzeichnet, der letztendlich zur Gebrechlichkeit und Tod führt. Die Manifestation altersassoziierter Erkrankungen und das Fortschreiten von altersbedingter Gebrechlichkeit stellen große Herausforderungen an die alternde Gesellschaft dar. Somit besteht eine große Anforderung an die Wissenschaft die fundamentalen Mechanismen, die dem Alterungsprozess zugrunde liegen, aufzuklären, um die Lebensqualität von Millionen Menschen zu verbessern. Obwohl der Alterungsprozess unvermeidlich ist, ist er doch variabel und kann sich als Langlebigkeit in *Centenarians* oder als beschleunigte Alterung in Patienten mit Progerien manifestieren. Die Erforschung der Ursachen von Progerieerkrankungen birgt daher das Potenzial, Gene und molekulare Mechanismen aufzudecken, die essentiell zur Manifestation altersassoziierter Erkrankungen und zum Alterungsprozess im Allgemeinen beitragen.

Die zwei Hauptziele dieser Arbeit bestanden darin neue, für Progerien ursächliche Gene zu identifizieren und die Pathomechanismen, die diesen Syndromen zu Grunde liegen, zu entschlüsseln, um unser Wissen und unser Verständnis über die molekularen Mechanismen des Alterns zu vertiefen.

Durch den Einsatz von *Whole-Exome Sequencing* (WES) und der folgenden *Copy Number Variation* Analyse war es mir möglich eine neue zwei Exons umfassende Duplikation in dem Insulinrezeptor (*INSR*, *insulin receptor*) Gen in einem Patienten mit Donohue Syndrom zu identifizieren und auf diese Weise das Spektrum bekannter Mutationen für diese Erkrankung zu erweitern. Neben der Aufklärung der genomischen Struktur der vorliegenden Duplikation, konnte ich aufzeigen, dass das Allel mit der Duplikation auf mRNA Ebene fast vollständig fehlt. Das deutet auf einen Abbau der mRNA und damit auf einen Funktionsverlust des Insulinrezeptors, und ist daher im Einklang mit dem Schweregrad in dem vorliegenden Donohue Fall.

Mutationen in *ANO6* (*anoctamin 6*), die einen *Gain-of-Function* Effekt bewirken, wurden kürzlich als kausal für Progerie in zwei nicht verwandten Patienten identifiziert¹. Mittels funktionaler Analyse mit Annexin-V Durchflusszytometrie habe ich die *Gain-of-Function* Hypothese verifiziert und zudem aufgezeigt, dass die veränderte ANO6 Funktion mit einer Zunahme der Zellgröße und Veränderung in der Lipidzusammensetzung einhergeht. Zusätzlich konnte ein spezifischer Effekt auf den MEK/ERK (mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase) Signalweg, gekennzeichnet durch erhöhte Phosphorylierung in Western Blot Experimenten, jedoch aber nicht auf den AKT (AKT serine/threonine kinase 1) oder auf den MTOR (mechanistic target of rapamycin) Signalweg beobachtet und somit ein Zusammenhang zwischen ANO6 Funktion und ERK vermittelter Seneszenz hergestellt werden. Wichtig ist, dass β -Galactosidase Aktivitätsmessung und Zellproliferationsanalyse die zelluläre Seneszenz und eine Abnahme des Zellwachstums bestätigen konnten. Auf diese Weise wurde zum ersten Mal ein Zusammenhang zwischen ANO6 und zellulärer Seneszenz aufgedeckt.

Zusätzlich, wurde WES verwendet, um das kausale Gen in einem Patienten zu identifizieren, dessen Phänotyp eine starke Ähnlichkeit zu dem Hutchinson-Gilford Progerie Syndrom (HGPS) aufweist. Interessanterweise, wurde eine *de novo* Mutation in einem Gen identifiziert, das an LMNA (Lamin A, kodiert durch *LMNA*) bindet, welches bei HGPS mutiert ist. Mittels Bestimmung der Lokalisation und Durchführung von Kotransfektionen konnte ich aufzeigen, dass das Vorhandensein der Mutation den Transport des Proteins in den Nukleus behindert und zudem die Lokalisation des wild-typischen Proteins beeinflusst und damit einen mutmaßlichen dominant-negativen Effekt ausübt. Bemerkenswerterweise, konnte die Untersuchung des nukleären Phänotyps eine veränderte LMNA Verteilung und das Vorhandensein von nukleären Blebbings aufzeigen, das ein Kennzeichen für HGPS und andere Laminopathien darstellt. Ähnlich zu anderen Progerie Syndromen konnte zudem eine Zunahme von DNA-Schäden mittels *Comet-Assay* aufgezeigt werden, was auf einen ähnlichen zu Grunde liegenden Pathomechanismus deutet.

Abschließend wurde bei einem schwerwiegenden neonatalen Progerie Fall WES erfolgreich eingesetzt, um eine homozygote Mutation im dem *MLIP* (*muscular LMNA interacting protein*) Gen zu identifizieren, das ebenfalls ein LMNA bindendes Protein ist. Mittels CRISPR/Cas9 (clustered regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR associated protein 9) generierter *Mlip* knock-out C2C12 Zellen konnte gezeigt werden, dass *Mlip* essentiell für die Differenzierung von C2C12 Zellen ist. Somit konnte ein Zusammenhang zu dem Phänotypen des Patienten aufgezeigt werden, der unter anderem durch eine schwere muskuläre Atrophie gekennzeichnet war.

Zusammenfassend erlauben die in dieser Arbeit präsentierten Ergebnisse neue Einsichten über die Ursachen und die Pathomechanismen, die Progerie Erkrankungen zu Grunde liegen. Die Identifizierung der zwei neuen Kandidatengene sowie die funktionalen Charakterisierungen decken einen Einfluss dieser Gene auf die Zellfunktion auf, und zeigen zum ersten Mal einen Zusammenhang zwischen beschleunigter Alterung als Ursache von Mutationen in *ANO6*, *MLIP* und einem weiteren LMNA bindenden Protein.

1. Beleggia, F. Innovative strategies for gene identification and functional analysis of progeria syndromes. *Dr. Diss.* (2015).