

I. Zusammenfassung

G-Quadruplexe (G4) sind dynamische viersträngige Sekundärstrukturen, die in guaninreichen Regionen der DNA gebildet werden. Es ist bekannt, dass sie sich in transkriptionell aktiven, Nukleosom-armen Regionen bilden und eine wichtige Rolle bei der Erhaltung von Telomeren, der DNA-Replikation, der Transkriptionregulation, der Instabilität des Genoms und bei Krebs spielen. G4 können durch kleine Moleküle stabilisiert werden, was zu transkriptions- und replikationsabhängigen DNA-Doppelstrangbrüchen (DSBs) führt. Andererseits können G4 durch G4-Helikasen, die bei Alterung und Krebs häufig dereguliert sind, aufgelöst werden. Unter normalen physiologischen Bedingungen können diese Helikasen dynamische DNA-Strukturen auflösen, um die genomische Stabilität zu erhalten. Kürzlich wurde vorgeschlagen, dass die G4-Helikasen mit dem Eintreten der Seneszenz von Säugetieren korrelieren und mit dem Alterungsprozess zunehmen könnten. Die genaue Rolle der G4-Strukturen im Alterungsprozess bleibt jedoch unklar. Hier untersuchte ich diesen Zusammenhang und die zugrunde liegende Molekularbiologie.

Zur Untersuchung der Alterung verwendete ich Zellen und Gewebe, die aus Mausmodellen einer beschleunigten Alterungskrankheit, dem Hutchinson-Gilford-Progerie-Syndrom (HGPS), stammen. Bei HGPS ist das Lamin-A-Gen mutiert, was zur Expression und Akkumulation der als Progerin bekannten Lamin-A-Proteinvariante führt. Die Anhäufung von Progerin trägt zu einer Reihe von Zelldefekten und genomischen Veränderungen bei und wirkt sich direkt auf die Funktion von Schlüsselfaktoren des Alterns aus. Zu diesen Faktoren gehört Sirtuin 7 (SIRT7), ein Deacetylase-Protein, von dem bekannt ist, dass es eine grundlegende Rolle bei der Alterung und der genomischen Instabilität spielt. Jüngste Forschungen haben gezeigt, dass SIRT7 die Fähigkeit besitzt, DDX21, eine RNA-Helikase, zu deacetylieren und dadurch zu aktivieren. Wenn DDX21 aktiviert ist, kann es RNA-G4-Strukturen und RNA-DNA-Hybride, die häufig mit DNA-G4-Strukturen kolokalisiert sind, wirksam auflösen. Es wurde auch gezeigt, dass SIRT1 ein spezifisches G4-Helikaseprotein, WRN, deacetylieren und dadurch aktivieren kann, dessen Herunterregulierung zu einer vermehrten Bildung von G4-Strukturen führt. Darüber hinaus wurde gezeigt, dass die Helikase DHX36 sowohl DNA- als auch RNA-G4s unterschiedslos binden und auflösen kann. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass DDX21, wenn es deacetyliert und dadurch durch SIRT7 aktiviert wird, ebenfalls effizient an DNA-G4-Strukturen binden und diese auflösen kann.

Um eine direkte Verbindung zwischen G4s und DSBs zu finden, habe ich eine neue Methode namens CUT&Break entwickelt. Dabei handelt es sich um ein genomweites Verfahren, das die gleichzeitige Kartierung von epigenetischen Markierungen (wie G4s oder Histonmarkierungen) und DSBs auf demselben Chromatinfragment *in situ* im Kontext nativer Zellkerne ermöglicht und so einen besseren Einblick in die Regulierung epigenetischer Merkmale und der Instabilität des Genoms innerhalb des Zellkerns bietet.

In diesem Projekt wollte ich eine Verbindung zwischen G4 und dem Altern herstellen und die molekularen Aspekte aufklären, die ihre Anhäufung fördern. Ich stellte die Hypothese auf, dass Progerin durch die Beeinträchtigung der Funktionalität der Deacetylase SIRT7 und die anschließende Verringerung der Funktion von DDX21 durch verstärkte Acetylierung zu einer vermehrten Anhäufung von G4-DDX21-Komplexen führen könnte. Ich schlage vor, dass diese Kaskade von Ereignissen zu der mit HGPS verbundenen genomischen Instabilität beitragen könnte.

II. Abstract

G-quadruplexes (G4s) are dynamic four-stranded secondary structures that form in guanine-rich regions of DNA and RNA. They are known to form in transcriptionally active nucleosome-depleted regions and play important roles in telomere maintenance, DNA replication, transcriptional regulation, genome instability and cancer. G4s can be stabilized by small molecules, leading to transcription- and replication-dependent DNA double-strand breaks (DSBs). On the other hand, G4s can be unwound by G4 helicases, which are often deregulated during aging and cancer. Under normal physiological conditions, these helicases can unwind dynamic DNA structures to maintain genomic stability. Recently, it has been suggested that G4s may correlate with mammalian senescence and increase with aging. However, the precise role of G4 structures in the aging process remains unclear. Here, I investigated this relationship and the underlying molecular biology.

To study aging, I used cells and tissue derived from murine models of an accelerated aging disease, the Hutchinson-Gilford Progeria Syndrome (HGPS). In HGPS, the lamin A gene is mutated, resulting in the expression and accumulation of the lamin A protein variant known as progerin. Accumulation of progerin contributes to a variety of cellular defects and genomic alterations and directly affects the function of key aging-related factors. Among these factors is sirtuin 7 (SIRT7), a deacetylase protein known to play a fundamental role in aging and genomic instability. Recent research has shown that SIRT7 has the ability to deacetylate and thereby activate DDX21, an RNA helicase. When activated, DDX21 can effectively unwind RNA G4 structures and RNA:DNA hybrids often found colocalized with DNA G4 structures. It was also shown that SIRT1 can deacetylate and thereby activate a specific G4 helicase protein, WRN, while its downregulation results in increased formation of G4 structures. In addition, the helicase DHX36 was shown to bind and unwind both DNA and RNA G4s without discrimination. These findings raised the possibility that DDX21, when deacetylated and subsequently activated by SIRT7, could also efficiently bind to and unwind DNA G4 structures.

To find a direct link between G4s and DSBs, I developed a new method called CUT&Break. This is a genome-wide technique that allows the simultaneous mapping of epigenetic marks (such as G4s or histone marks) and DSBs on the same chromatin fragment, *in situ*, in the context of native nuclei, providing more insight into how epigenetic features and genome instability are regulated within the nucleus.

In this project, I aimed to define a link between G4s and aging and to elucidate the molecular aspects that drive their accumulation. I hypothesized that progerin, by impairing the functionality of the deacetylase SIRT7 and subsequently reducing the function of DDX21 through increased acetylation, could potentially lead to an increased accumulation of G4-DDX21 complexes. I propose that this cascade of events may contribute to the genomic instability associated with HGPS.