

Die Rolle der humanen RNase H2 bei der Mobilisierung von non-LTR-Retrotransposonen

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

am Biochemischen Institut

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von

Katharina Knittler

Kiel, 2017

Erstgutachter: Prof. Dr. Stefan Rose-John

Zweitgutachter: Prof. Dr. Thomas Roeder

Tag der mündlichen Prüfung: 04.07.2017

Zum Druck genehmigt: 04.07.2017

gez. Prof. Dr. Natascha Oppelt, Dekanin

1 Zusammenfassung

Hypomorphe Mutationen in einer der drei Untereinheiten der humanen RNase H2 führen zur Ausprägung des Autoimmun-Defekts Aicardi-Goutières-Syndrom (AGS) (Crow *et al.*, 2006b). Es handelt sich dabei um eine seltene, frühkindliche Erkrankung des zentralen Nervensystems, deren Phänotyp klinische und biochemische Überlappungen mit einer intra-uterin erworbenen Virusinfektion zeigt (Aicardi und Goutières, 1984). Ursächlich für die Aktivierung der Entzündungsantwort bei AGS ist vermutlich die Akkumulation endogener Nucleinsäuren. Bei diesen könnte es sich einerseits um geschädigte DNA handeln (Bartsch, 2016; Mackenzie *et al.*, 2016; Pokatayev *et al.*, 2016), andererseits könnten es auch die Prozessierungsprodukte aktiver endogener Retroelemente bzw. Retroviren sein, die die Interferon- α -Produktion stimulieren (Crow und Manel, 2015).

Um ein exakteres Bild von den Mechanismen der Krankheitsausprägung zu erhalten, wurden im Rahmen der vorliegenden Dissertation mit Hilfe des CRISPR-Cas9-Systems monoklonale RNase H2-defiziente, humane Zelllinien generiert. Diese wiesen signifikante Proliferationsdefizite im Vergleich zu ihren Parentalzellen auf, was auf eine Arretierung des Zellzyklus in der G2-Phase zurückzuführen war. Dieses erste Anzeichen für das Vorliegen von DNA-Schäden konnte unter Verwendung verschiedener Methoden bestätigt werden. So waren RNASEH2A-defiziente Zellen von vermehrten Strangbrüchen, cytoplasmatischen DNA-haltigen Strukturen (sog. Mikronuklei) sowie höheren Mutationsraten betroffen, was als Ausdruck für genomische Instabilität gedeutet wurde. Des Weiteren gab es Hinweise auf eine leicht vermehrte Inkorporation von Ribonucleotiden in die genomische DNA der RNase H2-*knockout*-Zellen. Beim Vorliegen eines intakten cGAS-STING-Signalweges führte diese Beeinträchtigung der genomischen Integrität zu der Ausprägung einer für AGS typischen ISG-Signatur, was die Relevanz der Untersuchungsergebnisse unterstreicht.

Darüber hinaus konnte in dieser Arbeit erstmalig festgestellt werden, dass die RNase H2 einen positiven Einfluss auf die Mobilisierung von non-LTR-Retrotransposonen ausübt. Damit rückt sie die Regulation endogener Retroelemente sowie damit einhergehende Veränderungen der Homöostase retroelementabgeleiteter Nucleinsäurederivate zunehmend in den Fokus weiterführender Analysen zur Entstehung von AGS und anderer Autoimmun-Erkrankungen.

2 Summary

Hypomorphic mutations in one of the three subunits of the human RNase H2 lead to the manifestation of the autoimmune defect Aicardi-Goutières syndrome (AGS) (Crow *et al.*, 2006b). AGS is a rare, early-onset neurodevelopmental disorder that displays clinical and biochemical overlap with an intra-uterine acquired viral infection (Aicardi and Goutières, 1984). Activation of the inflammatory response in AGS is potentially caused by the accumulation of endogenous nucleic acids. The interferon- α production might either be stimulated by damaged DNA (Bartsch, 2016; Mackenzie *et al.*, 2016; Pokatayev *et al.*, 2016) or by processing intermediates of active endogenous retroelements and retroviruses, respectively (Crow and Manel, 2015).

To gain a more detailed insight into the mechanisms underlying the disease's development and progression within the framework of this dissertation, monoclonal RNase H2-deficient human cell lines were generated by means of the CRISPR-Cas9 system. They featured a significant proliferative deficit compared to their parental cells that was ascribed to a G2-dependent cell cycle arrest. This first hint towards the existence of DNA-damage could subsequently be confirmed by the use of various techniques. The RNASEH2A-deficient cells were affected by increased numbers of strand breaks as well as cytoplasmic DNA-containing structures called micronuclei plus higher mutation rates, which was interpreted as a signal for elevated genomic instability. In addition to that, a lightly increased incorporation rate of ribonucleotides within the genomic DNA of RNase H2 knockout cells could be detected. In the presence of an intact cGAS-STING signalling pathway, impairment of the genomic integrity led to the development of an ISG signature, as typically seen in AGS patients, which underlines the relevance of the obtained findings.

Beyond that, it could be proved for the first time within this work that the RNase H2 exerts a positive influence on the mobilisation of non-LTR-retrotransposons. Thereby it spotlights the regulation of endogenous retroelements and the therewith accompanied alterations in the homeostasis of retroelement-derived nucleic acid derivatives for future analyses concerning the development of AGS and other autoimmune diseases.