

Bipartite recognition of DNA adducts in human excision repair

Doctoral Thesis

Author(s):

Hess, Martin

Publication date:

1999

Permanent link:

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-002014262>

Rights / license:

[In Copyright - Non-Commercial Use Permitted](#)

Diss. ETH No. 12910

Bipartite Recognition of DNA Adducts in Human Excision Repair

A Dissertation submitted to the
SWISS FEDERAL INSTITUTE OF TECHNOLOGY
for the degree of
DOCTOR OF NATURAL SCIENCES

Presented by
MARTIN HESS
Dipl. Natw. ETH
Born August 26th, 1967
Citizen of Unterägeri, ZG

Accepted on the recommendation of
Prof. Dr. MARKUS AEBI, examiner
Prof. Dr. FRITZ THOMA, co-examiner
PD Dr. HANSPETER NAEGELI, co-examiner

Zürich, 1999

5. Summary

The integrity of our genome depends on several DNA repair mechanisms. Damaged bases are eliminated from human chromosomes by two completely different excision pathways: repair by base excision and repair by nucleotide excision. Bulky DNA adducts, generated mainly by UV radiation or chemical carcinogens are repaired by nucleotide excision repair (NER). Human patients suffering from xeroderma pigmentosum have a deficiency in this repair pathway: these individuals accumulate UV radiation products in their DNA and, as a consequence, exhibit hypersensitivity to sunlight, increased mutagenesis and high frequencies of skin cancer.

NER is a cut and patch mechanism that is initiated by hydrolysis of two phosphodiester bonds, resulting in excision of DNA damage as the component of oligonucleotide segments. Our current knowledge of the sequence of human NER events may be summarized as follows. Four factors (XPA, RPA, XPC-HHR23B and TFIIH) lead to the formation of an unwound preincision complex that is flanked by single-stranded to double-stranded DNA junctions both 5' and 3' to the offending lesion. Double DNA incision at these junctions by structure-specific endonucleases (XPF-ERCC1 on the 5' side and XPG on the 3' side) generates excision products of 24-32 residues in length containing the damaged base. The released deoxyribonucleotide segments are replaced by DNA polymerase ϵ in combination with RPA, RFC and PCNA. Finally, DNA ligase I reestablishes the continuity of DNA.

These enzymatic reactions, involving either breakage or formation of phosphodiester bonds, have been explored in great detail but the early molecular recognition steps that initiate human NER by locating DNA damage in the genome are poorly understood. Interestingly, using a limited set of proteins this system is capable of recognizing a nearly infinite variety of base lesions. The unresolved problem of DNA damage recognition prompted me to use a novel series of backbone modifications as molecular tools to dissect the mechanism of substrate discrimination by human NER enzymes. The C4' atom of deoxyribose was chosen as principal target for this chemical approach because of its position diametrically opposite to the *N*-glycosidic bond that links the bases to their backbone. As a consequence, such C4' modifications do not interfere with Watson-Crick hydrogen bonding interactions between complementary bases. Measurements of NER activity using the oligonucleotide excision assay in human cell extracts demonstrated

that non-distorting backbone adducts stimulate NER activity only when combined with one, or more effectively, three mispaired bases. Importantly, the same short sequence heterologies, in the absence of concurrent backbone modifications, fail to activate oligonucleotide excision. Thus, neither disruption of base pairing nor non-distorting backbone lesions are capable of eliciting NER activity, but the combination of these two substrate alterations constitutes a very potent signal for double DNA incision. I propose the term "bipartite recognition" to denote such a requirement for two separate determinants of recognition, i.e. a base pair destabilizing defect in the secondary structure (or conformation) of DNA accompanied by a modification of its primary structure (or chemistry). Because of this bipartite damage recognition strategy, human NER is preferentially recruited to carcinogen-DNA adducts that disrupt complementary hydrogen bonding between partner bases. In contrast, carcinogen-DNA adducts that maintain Watson-Crick alignment of bases are processed poorly or not at all. Also, the identification of a two-component substrate discrimination strategy indicates that two distinct recognition subunits may coexist in human NER, i.e. a sensor of defective hybridization and a sensor of defective deoxyribonucleotide chemistry. Based on the recent biochemical characterization of human NER factors, it appears that XPA in conjunction with RPA may constitute a conformational sensor of Watson-Crick base pairing stability, whereas the helicase components of TFIIH may act as sensors of defective DNA chemistry.

Zusammenfassung

Die Integrität unseres Genoms hängt von diversen DNA Reparaturmechanismen ab. Geschädigte Basen werden durch zwei komplett verschiedene Exzisionsmechanismen von den menschlichen Chromosomen entfernt: durch die Basenexzisionsreparatur (BER) und durch die Nukleotidexzisionsreparatur (NER). Sperrige DNA Addukte werden hauptsächlich durch UV Strahlung und chemische Karzinogene verursacht und durch die NER prozessiert. Xeroderma pigmentosum Patienten steht dieser Reparaturmechanismus nicht oder nur bedingt zur Verfügung: sie akkumulieren UV Schäden in ihrer DNS und reagieren folglich extrem empfindlich auf Sonnenlicht. Sie haben eine erhöhte Mutationsrate und ein hohes Risiko, an Hautkrebs zu erkranken.

NER ist ein Schneid- und Flickverfahren, das durch Trennung von zwei Phosphodiesterbindungen eingeleitet wird und in der Elimination des DNS Schaden als Teil eines Oligonukleotides resultiert. Unser gegenwärtiges Wissen über die Abläufe in der menschlichen NER kann folgendermassen zusammengefasst werden: Vier Faktoren (XPA, RPA, XPC-HHR23B und TFIIH) sind für die Bildung eines lokal denaturierten Pre-Inzisionskomplexes verantwortlich. Dieser ist sowohl auf der 3' Seite, wie auch auf der 5' Seite des Schadens von Einzelstrang-Doppelstrang Uebergängen flankiert. Strukturspezifische Endonukleasen schneiden an diesen DNS Verzweigungsstellen, XPF-ERCC1 auf der 5' Seite und XPG auf der 3' Seite, worauf der Schaden als Komponente eines 24-32 Nukleotiden umfassenden Einzelstranges entfernt wird. Die freigesetzten Oligonukleotiden werden durch Polymerase ϵ unter Einbezug der Hilfsfaktoren RPA, RFC und PCNA neu synthetisiert. Schliesslich stellt die DNA Ligase I die ursprüngliche DNS Kontinuität wieder her.

Jene Enzymreaktionen, welche das Aufbrechen oder Schliessen von Phosphodiesterbindungen beinhalten, wurden im Detail studiert. Wenig ist hingegen über den frühen molekulare Schadenserkenngungsschritt bekannt. Es ist bemerkenswert, dass dieses Reparatursystem mit einer limitierten Anzahl an Proteinen eine fast unendliche Vielfalt von DNS Schäden erkennen kann. Das ungelöste Problem der Schandenserkenngung liess mich eine neuartige Reihe von Deoxyribosemodifikationen als molekulare Werkzeuge einsetzen, um damit den Mechanismus der Schadenerkenngung durch die NER Enzyme in Teilaspekte zerlegen zu können. Das C4' Atom der

Deoxyribose wurde als Angriffspunkt für dieses Vorgehen gewählt, weil diese Position der N-glycosidischen Bindung, welche die Basen mit dem DNS Backbone verbindet, diametral gegenübersteht. Folglich stört eine solche C4' Modifikation die Watson-Crick Basenpaarung nicht. Die Messung der NER Aktivität in Gegenwart von menschlichen Zellextrakten im Oligonukletid-Exzisionsassay zeigt auf, dass Backbone-Addukte, welche die DNS Konformation nicht verzerren, die NER Aktivität erst stimulieren, wenn sie mit einer, besser noch mit drei, ungepaarten Basen kombiniert werden. Es bleibt anzumerken, dass solche kurzen Sequenzheterologien in Abwesenheit von Backbone-Modifikationen keine Oligonucleotid-Exzision hervorrufen. Das bedeutet, dass weder das Aufbrechen von Basenpaarungen noch das Vorhandensein von solchen Modifikationen genügen, um eine Exzisions-Reaktion hervorzurufen. Die Kombination beider Manipulationen stellt hingegen ein sehr starkes Signal für die doppelte DNS Strang-Inzision durch NER enzyme dar. Ich schlage daher den Ausdruck "Bipartite Recognition" vor, um damit das Erfordernis von zwei verschiedene Erkennungsstrategien darzustellen: das Suchen nach einem destabilisierenden Defekt in der Sekundärstruktur (oder DNS Konformation) begleitet von einer Veränderung der Primärstruktur (oder DNS Chemie). Wegen dieser bipartiten Schadenserkenungsstrategie wird das menschliche NER System bevorzugt zu Karzinogen-Addukten hingeführt, welche die komplementäre Wasserstoffbrückenbildung zwischen den Partner Basen stören. Karzinogen-Addukte, welche die Watson-Crick Basenanordnung beibehalten, werden hingegen schlecht oder überhaupt nicht prozessiert. Eine solche Zweikomponenten Erkennungsstrategie weist darauf hin, dass möglicherweise gleichzeitig zwei verschiedene Erkennungsuntereinheiten in der menschlichen NER bestehen, also ein Sensor für gestörte Basenpaarung und ein Sensor für abnormale DNS Chemie. Basierend auf der kürzlich aufgenommen biochemischen Charakterisierung von menschlichen NER Faktoren scheint es naheliegend, dass XPA in Verbindung mit RPA einen Sensor für die Stabilität von Watson-Crick Basenpaarung bildet, während die Helikasen des TFIIH möglicherweise als Sensoren für defekte DNS Chemie agieren.