

Biochemical characterization of KIAA1018/FAN1, a novel endonuclease involved in interstrand cross-link repair

Doctoral Thesis

Author(s):

Kratz, Katja

Publication date:

2010

Permanent link:

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-006205392>

Rights / license:

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

DISS. ETH NO. 19183

Biochemical characterization of KIAA1018/FAN1,
a novel endonuclease involved in interstrand cross-link
repair

A dissertation submitted to

ETH ZURICH

for the degree of

Dr. sc. ETH Zurich

presented by

KATJA KRATZ

Dipl. Biol. Technische Universität Darmstadt

23.04.1979

citizen of

GERMANY

Accepted on the recommendation of

Prof. Josef Jiricny

Prof. Fritz Thoma

2010

1. Summary

Fanconi anemia (FA) is a rare, inherited disease characterized by bone marrow failure and a predisposition to cancer. Cells derived from FA patients exhibit chromosomal instability and hypersensitivity to DNA interstrand cross-linking agents. In the last two decades, 13 FA proteins have been identified, but their functions remain largely elusive. Current studies try to unravel the processing of interstrand cross-links (ICLs) and the functions of the proteins involved. However, the continued identification of new FA-associated proteins, as well as the involvement of other DNA repair pathways in ICL repair, reflect the complexity of this DNA repair process.

The work presented here is based on a screen for unknown interaction partners of the mismatch repair (MMR) protein MLH1. One newly identified interaction partner was FANCI, a protein involved in FA. The second, strong interaction partner of MLH1 was KIAA1018, an uncharacterized protein. Bioinformatic analyses predicted that KIAA1018 would contain a RAD18-like zinc finger motif at its N-terminus and a putative PD-(D/E)XK endonuclease domain at its C-terminus. These assumptions implicated a role for KIAA1018 in DNA repair. Preliminary results showed that KIAA1018-deficient cells are hypersensitive to DNA interstrand cross-linking agents, a phenotype characteristic of FA cells. Consequently, the possible enzymatic role of KIAA1018 in ICL repair became of great interest.

In this thesis, the biochemical function of KIAA1018 in DNA repair was characterized. We could show that KIAA1018 is indeed a nuclease that possesses both, endonucleolytic as well as exonucleolytic activity. Its preferred *in vitro* substrates are DNA 5'-flaps, structures that can arise during DNA replication and repair. These results allowed us to formulate a hypothesis about the function and the steps of ICL repair in which KIAA1018 could participate and its relevance to this DNA repair pathway.

To further analyse the interconnection between MMR and FA, especially between MLH1 and FANCI, and MLH1 and KIAA1018, an MLH1 deficient DT40 cell line was generated. This cell line can be used to study the possible involvement of MLH1 in the FA repair pathway. Furthermore, double knock-outs of MLH1/FANCI and MLH1/KIAA1018 can be generated to determine the importance of their roles in the MMR- and FA- pathway.

2. Zusammenfassung

Fanconi Anämie ist eine seltene Erbkrankheit die durch Rückbildung des Rückenmarks und ein erhöhtes Krebsrisiko charakterisiert ist. Zellen von FA-Patienten weisen zudem chromosomale Instabilität auf und reagieren hypersensitiv auf DNS vernetzende Chemikalien. In den letzten zwei Dekaden konnten 13 FA Proteine identifiziert werden, aber ihre Funktionen blieben weitgehend unbekannt. Aktuelle Studien versuchen, die Reparatur von DNS-Vernetzungen aufzuklären und die einzelnen Aufgaben der beteiligten Proteine zu verstehen. Dabei werden immer wieder neue Proteine entdeckt, die an diesem Reparaturweg beteiligt sind. Zudem scheinen auch schon bekannte Reparaturmechanismen an der Auflösung von DNS-Vernetzungen beteiligt zu sein. Dieses Zusammenspiel von mehreren DNS-Reparaturmechanismen und unterschiedlichsten Proteinen spiegelt die Komplexität der Reparatur von DNA-Vernetzungen wider.

Die hier vorgestellte Studie basiert auf einer Suche nach neuen Interaktionspartnern des Basenfehlpaarungs-Reparatur Proteins MLH1. Ein neu gefundener Interaktionspartner war FANCI, ein Protein involviert in FA. Der zweite, starke Interaktionspartner von MLH1 war KIAA1018, ein uncharakterisiertes Protein. Bioinformatische Analysen berechneten, dass KIAA1018 ein RAD18-ähnliches Zink-Finger Motiv in seinem N-terminalen Ende und ein mögliches PD-(D/E)XK Endonuclease Motiv in seinem C-terminalen Ende besitzen könnte. Diese beiden Motive würden für eine Rolle für KIAA1018 in DNS-Reparatur sprechen. Erste Ergebnisse zeigten, dass KIAA1018-defiziente Zellen hypersensitiv auf DNS vernetzende Chemikalien reagieren, wie es auch der Fall für FA-Zellen ist. Infolgedessen wollten wir die eventuelle enzymatische Funktion von KIAA1018 in der Reparatur von DNS-Vernetzungen genauer untersuchen.

In dieser Dissertation wurde die biochemische Funktion von KIAA1018 näher charakterisiert. Wir konnten zeigen, dass KIAA1018 tatsächlich eine Nuklease ist und sowohl endonukleolytisch als auch exonukleolytisch aktiv ist. Das bevorzugte Substrat von KIAA1018 *in vitro* sind DNA 5'-flaps, Strukturen die während der DNS Replikation und auch Reparatur entstehen können. Diese Ergebnisse erlaubten uns, eine Hypothese über die Funktion von KIAA1018 in der Reparatur von DNS-Vernetzungen aufzustellen und die Relevanz dieses Proteins für diesen Reparaturmechanismus abzuschätzen.

Um genauer die Verbindung zwischen Basenfehlpaarungs-Reparatur und der Reparatur von DNS-Vernetzungen untersuchen zu können, wurde zudem eine MLH1 defiziente DT40 Zelllinie hergestellt. Zum einen kann diese Zelllinie genutzt werden, um den Effekt von MLH1 auf die Reparatur von DNS-Vernetzungen zu untersuchen, aber auch um MLH1/FANCI und MLH1/KIAA1018 defiziente Zelllinien herzustellen. Diese können dann dazu verwendet werden, um mögliche Funktionen dieser beiden Komplexe in Basenfehlpaarungs-Reparatur und in der Reparatur von DNS-Vernetzungen zu untersuchen.