

DISS. ETH NO. 19267

In vivo characterisation of KIAA1018/FAN1 and its role in DNA repair

A dissertation submitted to
ETH ZURICH

For the degree of
Dr. sc. ETH Zurich

Presented by
Svenja Kaden

Dipl. Biol. t. o. (techn. orientiert) Universität Stuttgart

02.12.1980

Citizen of
GERMANY

Accepted on the recommendation of

Prof. Josef Jiricny
Prof. Fritz Thoma
Prof. Michael Hengartner
Prof. Kevin Hiom

2010

1 Zusammenfassung

Die DNS eines jeden Organismus ist ständig schädlichen Substanzen ausgesetzt. Um die genomische Stabilität zu garantieren, hat die Zelle während ihrer Evolution verschiedenartige Reparaturwege entwickelt.

Zu einem der schwerwiegendsten DNS-Schäden gehört die kovalente Verlinkung beider komplementärer DNS-Stränge. Um diese aufzulösen sind mehrere DNS-Reparaturmechanismen notwendig: Das Überwinden der beschädigten Stelle durch spezifische „Transläsionspolymerasen“, das Ausschneiden der betroffenen Nukleotide durch Exzisionsreparatur, homologe Rekombination und speziell in höher entwickelten Eukaryoten der sogenannte *Fanconi Anämie* (FA)-Weg.

Der FA-Weg wurde nach einer Erbkrankheit benannt, die erstmals von Guido Fanconi beschrieben wurde. Bisher konnten 13 Gene entdeckt werden, welche in verschiedenen FA-Patienten mutiert sind, was zu Knochenmarksversagen und einer Prädisposition für Krebs führt. Man bezeichnet sie als Komplementationsgruppen *FANCA, B, C, D1, D2, E, F, G, I, J, L, M* und *N*. Charakteristika der Zellen dieser FA-Patienten sind genomische Instabilität und eine erhöhte Sensitivität gegenüber Substanzen, die beide komplementären DNS-Stränge kovalent verbinden.

Die folgende Studie beschreibt das kürzlich identifizierte Protein KIAA1018/FAN1, eine FANCD2-assoziierte Nuklease. KIAA1018 wurde zuerst auf der Suche nach neuen Interaktionspartnern von Proteinen des Fehlpaarungsreparaturwegs entdeckt. Es enthält ein dem RAD18-Zinkfinger ähnliches Motiv und eine Nukleasedomäne der PD-(D/E)XK-Superfamilie. Wir konnten nachweisen, dass KIAA1018 tatsächlich eine funktionale Nuklease ist, welche durch monoubiquitiniertes FANCD2 zu kovalent verbundenen DNS-Strängen rekrutiert wird.

Diese Doktorarbeit konzentriert sich auf die phänotypische Charakterisierung von KIAA1018 *in vivo* und zeigt, dass die Depletion dieses Proteins chromosomale Instabilität und Sensitivität gegenüber Substanzen, welche DNS-Stränge kovalent verbinden, verursacht. Außerdem gibt diese Arbeit Hinweise auf mögliche Wirkungsweisen des Proteins aufgrund von Analysen

der Aufenthaltsdauer von RPA und γ H2AX an Stellen der DNS-Reparatur und anhand des FANCD2-Monoubiquitinierungsstatus in KIAA1018 depletierten Zellen. Des Weiteren wird die erste posttranslationale Modifikation in KIAA1018 beschrieben. Dabei handelt es sich um eine wahrscheinlich durch ATR ausgeführte, verstärkte Phosphorylierung nach DNS-Schaden.

2 Summary

The DNA of every organism is permanently exposed to damaging agents. To maintain genomic stability, the cell has evolved numerous DNA repair pathways. Among the most deleterious DNA lesions are interstrand crosslinks, which are targeted by translesion synthesis, excision repair, homologous recombination and, specifically in higher eukaryotes, by the *Fanconi anemia* (FA) pathway.

The FA pathway was named after an inherited disease first described by Guido Fanconi. 13 genes, termed *FANCA, B, C, D1, D2, E, F, G, I, J, L, M* and *N* have been discovered so far to be mutated in different FA patients leading to bone marrow failure and a higher susceptibility to cancer. Hallmarks of cells derived from FA patients are chromosomal instability and an increased sensitivity to DNA crosslinking agents.

The following study describes the newly identified FANCD2-associated nuclease KIAA1018/FAN1. KIAA1018 was discovered in a screen for new interaction partners of mismatch repair proteins. It contains a RAD18-like zinc finger motif and a nuclease domain of the PD-(D/E)XK family of endonucleases. We could show that *KIAA1018* indeed encodes a functional nuclease which is recruited to DNA interstrand crosslinks by mono-ubiquitinated FANCD2.

This thesis concentrates on the phenotypical characterisation of KIAA1018 *in vivo* and demonstrates that its depletion results in increased sensitivity to DNA crosslinkers and chromosomal instability. It provides indications for possible modes of action for KIAA1018 by analyses of γ H2AX and RPA foci persistence and the FANCD2-monoubiquitination status in KIAA1018 depleted cells. Furthermore, it describes the first post-translational modification of KIAA1018, its increased phosphorylation upon DNA damage, most likely mediated by ATR.