

A humán Ape2 fehérje szerepe a DNS reparációban

Burkovics Péter

Ph.D. értekezés

Témavezető: **Dr. Haracska Lajos**

Az értekezés a Szegedi **Tudományegyetem Molekuláris biológiai Ph.D** programjának keretében, az MTA Szegedi Biológiai Központ Genetika Intézetének Mutáció és Karcinogenezis Munkacsoportjában készült

2006

Szeged

Tartalomjegyzék

I. Rövidítések jegyzéke	3
II. Bevezetés	4
II.1 A DNS reparáció fő útjai	5
II. 2 A DNS szintézis és hibajavítás a replikációs villában	6
II.3 A PCNA	9
II.4 A bázis excíziós reparáció	9
II.5 A II. típusú AP endonukleázok	12
II.6 Az Ape1 és Ape2 fehérje	13
III. Célkitűzések	15
IV. Anyagok és módszerek	16
IV.1 A vad típusú Ape2 klónozása	16
IV.2 Az Ape2 pontmutások előállítása	16
IV.3 A PCNA, a vad típusú és a mutáns Ape2 túltermeltetése és tisztítása	16
IV.4 DNS Szubsztrátok	17
IV.5 A DNS szubsztrátok radioaktív jelölése	19
IV.6 Az AP endonukleáz, 3'-foszfodiészteráz és 3'-5' exonukleáz aktivitás vizsgálata	19
IV.7 Enzimkinetikai analízis	20
IV.8 Az enzimreakciók kiértékelése	20
V. Eredmények	21
V.1 A vad típusú és a D277A pontmutáns Ape2 tisztítása	21
V.2 Az Ape2 gyenge AP endonukleáz aktivitással rendelkezik	22
V.3 Az Ape2 3'-foszfodiészteráz aktivitással rendelkezik	23
V.4 Az Ape2 3'-5' exonukleáz aktivitással rendelkezik	23
V.5 Az Ape2 3'-5' exonukleáz aktivitásának jellemzése	24
V.6 A PCNA kölcsönhat az Ape2 fehérjével és stimulálja annak 3'-5' exonukleáz aktivitását	26
V.7 Az Ape2-ben két PCNA kötő hely kooperatív működése szükséges a PCNA fehérje 3'-5' exonukleáz aktivitást aktiváló hatásának kifejtéséhez	27

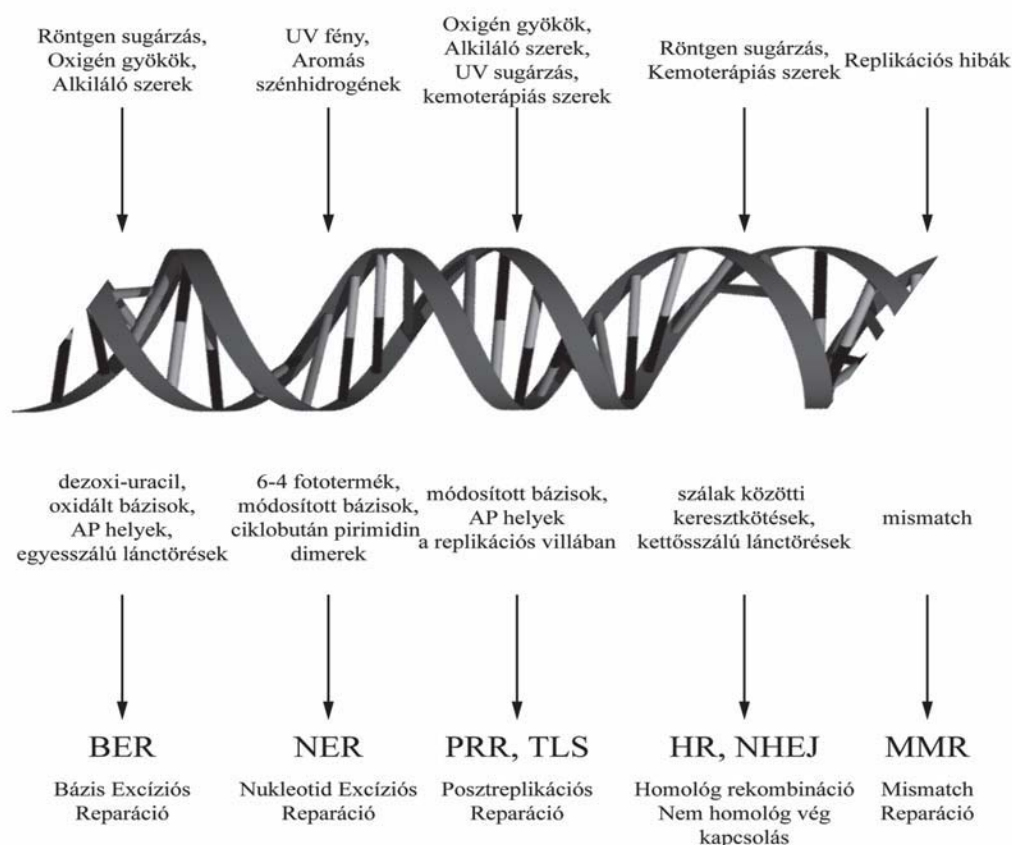
V.8 Az Ape2 3'-5' exonukleáz aktivitása specifikus a 3' végi hibásan beépült bázisokra	29
V.9 Az Ape2 specifikusan eltávolítja a 3' végre beépült dezoxi-uracilt	30
V.10 Az Ape2 specifikusan eltávolítja a 3' végre a templát szál 8-oxo-guaninjával szemben beépült adenint	31
VI. Megbeszélés	33
VI.1 Az Ape2 fehérje enzimatis aktivitásai	33
VI.2 Az Ape2 a PCNA-vel együtt működik, ami stimulálja Ape2 3'-5' exonukleáz aktivitását	33
VI.3 Az Ape2 specificitást mutat a 3' végen található sérült vagy rosszul párosodott nukleotidokra	34
VI.4 Az Ape2 fehérje lehetséges szerepe a DNS reparációban	37
VII. Összefoglalás	39
VIII. Magyar nyelvű összefoglaló	40
IX. Summary of the PhD thesis (Angol nyelvű összefoglaló)	47
X. Referenciák	54
XI. Köszönetnyilvánítás	61
XII. Közlemények jegyzéke	62

I. Rövidítések jegyzéke

BER:	bázis excíziós reparáció
NER:	nukleotid excíziós reparáció
TCR:	transcription coupled repair (transzkripcióhoz kapcsolt reparáció)
PRR:	posztreplicációs reparáció
NHEJ:	non-homologous end-joining (nem homológ vég kapcsolás)
MMR:	mismatch reparáció
AP hely:	abázikus hely
dRP:	dezoxi-ribóz-foszfát
PCNA:	proliferating cell nuclear antigen
RFC:	replikációs faktor C
RPA:	replikációs protein A
PIP motívum:	PCNA interacting protein box
IDCL:	interdomain connector loop
8-oxoG:	8-oxo-guanin
8-oxoA:	8-oxo adenin
FEN1:	Flap endonukleáz 1
OGG1:	8-oxo-guanin glükóziláz 1
GST:	glutathion-S metil-transzferáz
PG:	foszfo-glikolát
TLS:	transzléziós szintézis

II. Bevezetés

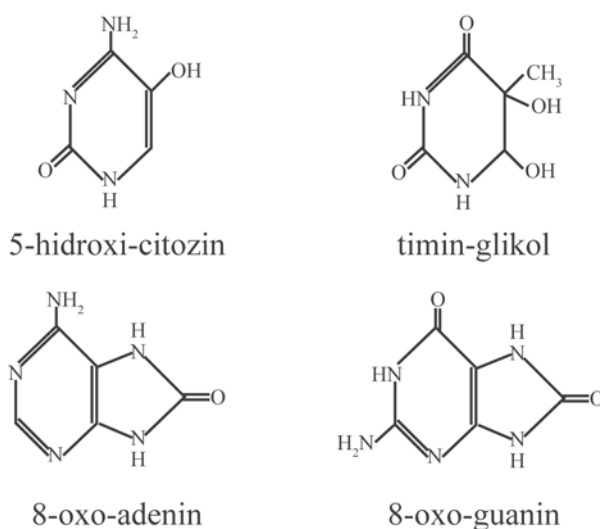
A sejteket folyamatosan érik külső és belső hatások, amelyek károsítják a DNS-t, illetve a sejtmagban található szabad nukleotidokat. DNS sérülést okoz például a nap által kibocsátott UV sugárzás, radioaktív sugárzás, különböző kémiai anyagok vagy a sejt normális metabolikus működése során keletkező reaktív oxigén gyökök. A keletkező DNS hibákat folyamatosan javítani kell, ennek hiányában a felhalmozódó mutációk karcinogenezist indukálhatnak, vagy a sejt halálát okozhatják. Ezért a DNS reparációs rendszerek hibája számos súlyos genetikai betegség forrása lehet, amelyek egy-egy reparációs fehérje hibájának következményei (1;2). Ilyen betegségek például a Xeroderma pigmentosum, Cockayne szindróma, Trichotiodistrófia, Bloom szindróma, Werner szindróma, Ataxia telangiectasia, Fanconi anémia, örökletes nempolipózus vastagbél karcinóma. A daganatos megbetegedések kialakulásának jobb megértéséhez meg kell ismernünk a DNS reparációs folyamatok mechanizmusait.



1. Ábra: A különböző endogén és exogén hatásokra kialakuló DNS hibák és az azokat javítani képes reparációs rendszerek.

II.1 A DNS reparáció fő útjai

A DNS reparációnak számos útját ismerjük (1. ábra). Bár a reparációs utak nagymértékben átfednek, mégsem képesek teljes mértékben kompenzálni egyetlen út kiesését sem. A bázis excíziós reparáció (BER) elsősorban a kettősszalú DNS-en található hibás bázisok (oxidált, alkilált, dezaminált bázisok), abázikus helyek és az egyesszalú lánc törések javítását végzi. Ennek az útnak a pontos mechanizmusát a későbbiekben részletezni fogom. A felsorolt károsodások közül külső károsító hatás nélkül a legnagyobb számban az oxidált bázisok keletkeznek. A leggyakoribb oxidált bázisok az 5-hidroxi-citozin, a timin-glikol, a 8-oxoA (8-oxo-adenin) és a 8-oxoG (8-oxo-guanin) (ábra 2). Kialakulásukat *in vivo* elsősorban az OH gyökök indukálják (3). Ha a BER során a G1 fázisban nem javított, valamint a replikáció ideje alatt keletkező oxidált bázisok megjelennek a replikációs villában, akkor komoly mutációs forrássá válhatnak, aminek oka a replikatív polimeráz mutagén működése, amelyet a későbbiek során részletesen ismertettek.



2. Ábra: Néhány gyakori oxidált bázis szerkezete.

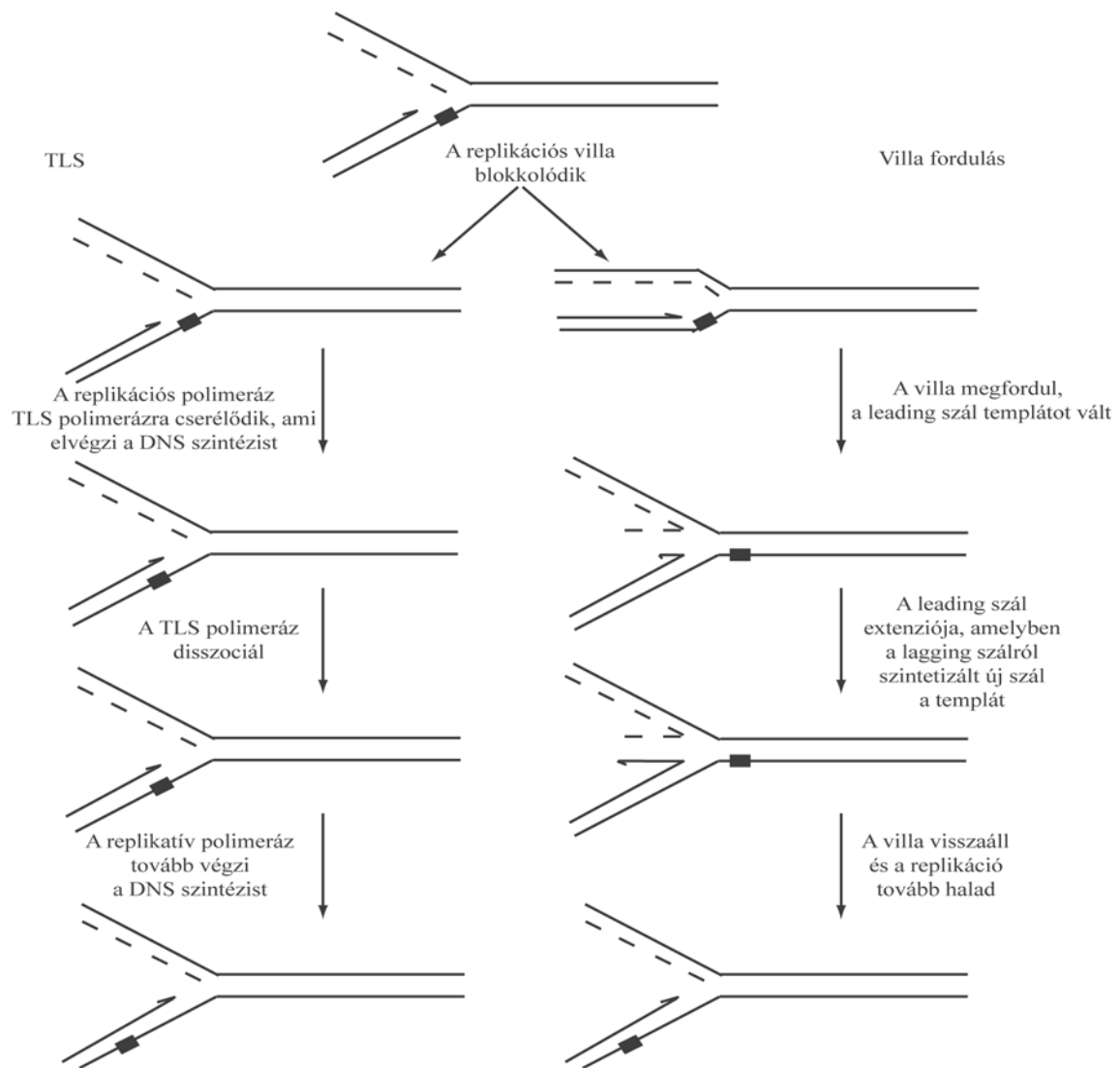
A nukleotid excíziós reparáció (NER) vesz részt számos gyakori DNS hiba, mint például az UV által indukált timin dimerek javításában. A NER során az első lépés a hiba felismerése (4). Ezután helikázok (XPB, XPD) „felnyitják” a sérült részt, amit a cukor-foszfát lánc bemetszése követ, lehetővé téve, hogy a sérült rész egy átlagosan 25 nt hosszú szakasszal együtt kihalásadjon. A keletkező rés feltöltését a DNS polimeráz- δ/ϵ végzi, a PCNA fehérjéhez kapcsolva. Az újonnan szintetizált szál az eredetivel a DNS ligáz I kapcsolja össze (5;6). Ha a sérült DNS javítása transzkripcióban aktív helyen játszódik le, akkor a NER egy altípusa, a transzkripcióhoz kapcsolt reparáció (TCR) végzi a hibajavítást, amely főbb lépéseiben megegyezik a NER-rel (5;7;8).

A DNS reparáció végbemehet rekombinációval is. Ez a mechanizmus elsősorban kettősszájú lánctörések javításáért felelős (9). Két útja a homológ rekombináció és a nem homológ végek kapcsolása (NHEJ: non-homologous end-joining). A homológ rekombináció több úton is végbemehet (10), amelyekben elsősorban helikázok és exonukleázok vesznek részt. A NHEJ út működésében elsősorban a szabad DNS véget kötő fehérjék (Ku70, Ku80), DNS polimeráz, ligáz (DNS ligáz IV) és DNS függő protein kinázok vesznek részt (11). A számos rekombinációs reparációs út azonos DNS szubsztrátért versenyez, így ennek az útnak a szabályozása meglehetősen bonyolult és eddig csak kis részében feltárt. A rekombinációs reparáció képes szubsztrátként kezelni a NER során keletkezett intermediereket is, ezért ez egy kapcsolódási pont lehet a két reparációs rendszer között.

DNS replikáció során folyamatosan ellenőrzésre kerülnek a beépített nukleotidok. A replikáció pontossága kb. 10^{10} (1 hiba/ 10^{10} beépített nukleotidonként). Ezzel szemben a replikatív DNS polimeráz 10^6 - 10^7 beépített nukleotidonként (1 hiba/ 10^6 - 10^7 beépített nukleotid) hibázik. A két érték közötti négy nagyságrendi különbség oka, a replikatív DNS polimerázok saját proofreader aktivitása és a mismatch reparáció (MMR) működése. A mismatch reparáció hatékonysága igen nagy (megközelíti a 100%-ot). A bakteriális MutS és MutL fehérjék homológjai végzik eukariótákban a hiba felismerését, a sérült rész eltávolítását és a hibajavítást. A MMR számára esszenciális a „szülői” szál felismerése. Ennek a mechanizmusa a templát szál metiláltságának felismerésén alapul (12;13).

II. 2 A DNS szintézis és hibajavítás a replikációs villában

A genetikai információ pontos másolása és az utódoknak való átadása minden élőlény létéhez alapvetően szükséges. A genetikai információ, azaz a DNS másolása, a replikáció. A szintézis szemikonzervatív, a keletkező két DNS lánc egy-egy szála származik az eredeti („szülői”) DNS-ből, a másik szál pedig a replikáció során szintetizálódott új DNS. A replikáció során a DNS kettősspirál a replikációs origónál szétnyílik és az így szabaddá váló két polinukleotid lánc szolgál templátul a DNS szintézishez. Itt alakul ki a replikációs komplex. A replikációs komplex kialakulása után egy DNS polimeráz, a DNS polimeráz- α egy rövid primert szintetizál a replikációs origónál (primáz) (14;15), amelyet aztán a DNS replikációt végző DNS polimerázok: a DNS polimeráz- δ holoenzim (DNS polimeráz- α , δ , RFC, PCNA) folytatnak (16-21). A PCNA (proliferating nuclear cell antigene) egy homotrimer, gyűrű alakú molekula, amely az RFC (replikációs faktor C) segítségével szétnyílik, majd összezáródik, miközben a DNS bekerül a homotrimer gyűrű belsejébe. Ez a struktúra biztosítja a későbbiekben a DNS szintézist végző enzimek nagy processzivitását. A DNS szintézis mindig 5'-3' irányban történik. A replikáció egy pontból kiindulva mindig egy irányba halad, amely haladás során mindkét templátszállal szemben történik DNS szintézis. Mivel a templát DNS szálak ellentétes polaritásúak, csak az egyik szállal szemben haladhat folyamatosan a DNS



3. Ábra: **A posztreplikációs reparáció és a Transzléziós szintézis.** A transzléziós szintézis (TLS) lépései: a DNS sérülés blokkolja a replikációs villát, mert a sérüléssel szemben a replikatív polimeráz nem képes nukleotidot beépíteni, a replikatív DNS polimeráz TLS polimerázra cserélődik, a TLS polimeráz elvégzi a sérült bázissal szemben a nukleotidok beépítését a szintetizálódó szálba, a TLS polimeráz disszociál, helyét újra a replikatív DNS polimeráz foglalja el, ami tovább végzi a replikációt. PRR út a replikációs villa fordulásával járó út. Főbb lépései: a DNS sérülés blokkolja a replikációs villát, mert a sérüléssel szemben a replikatív polimeráz nem képes nukleotidot beépíteni, de a másik szálon tovább halad a szintézis, a blokkolt szál templátot vált, és az ép szárról szintetizálódott új szálat használja templátnak, ezen a templáton folytatódik a DNS szintézis, amíg áthalad a sérült részen, majd a villa visszafordul és a replikáció tovább halad. Fekete téglalappal jelöltük a sérült bázist.

szintézis (vezető szál). A másik szálon (késlekedő szál) a DNS szintézis szakaszosan megy végbe, mivel a replikáció haladási iránya miatt itt 3'-5' irányban kellene DNS-t szintetizálni, ami nem lehetséges. Ezért a késlekedő szálon szakaszosan 5'-3' irányban történik DNS szintézis, minden szakaszt (Okazaki fragmentum) külön iniciál a DNS polimeráz-á, majd a replikációs komplex

továbbhaladása után a szakaszok közötti esetleges hézagokat DNS polimerázok kitöltik, majd a szakaszokat a DNS ligázok kapcsolják össze.

A folyamatos DNS károsodás miatt azonban a replikáció során templátként használt DNS-en is előfordulnak hibák. Általában a replikációs villában a templát szálon található DNS károsodások (módosított bázis, TT dimer, AP hely) miatt a DNS polimeráz- δ holoenzim megakadhat, mivel a szűk aktív centrumába nem képesek bekötni a károsodás miatt megváltozott - általában megnövekedett méretű - bázisok. Az inkomplett replikáció miatt a sejtciklus megreked az S fázisban, amely ha hosszabb ideig tart a sejt halálához vezet. Ennek megakadályozására több reparációs út alakult ki: a posztreplikációs reparáció (PRR) mechanizmusa és a transzléziós szintézis (TLS). Mindkét reparációs út célja, hogy a replikáció mindenképpen befejeződjön és a sejt akár mutációk árán is, de túléljen (22;23).

A PRR-t és a TLS-t is reparációs útnak tekintik, habár a szó szoros értelmében itt nem történik DNS hibajavítás (3. ábra). A PRR mechanizmusa kevésbé ismert. Az eddigi ismereteink alapján olyan modell vált elfogadottá, amelyben a replikációs villában templát szál váltás történik, amely során a villa visszafordul, amíg a sérült részt átírja, az ép szálról már megszintetizált DNS láncot használva templátnak (23). Ez a mechanizmus hibamentes átírást tesz lehetővé úgy, hogy a normális replikációs komplex végzi a DNS szintézisét. A TLS lényegesen jobban feltárt reparációs út. Ebben a folyamatban transzléziós (TLS) DNS polimerázok vesznek részt. Ezek a DNS polimerázok (az Y család és B család egyes tagjai) nem rendelkeznek a „klasszikus” DNS polimerázokra jellemző szekvenciamotívummal, ugyanakkor a térszerkezetük nagy hasonlóságot mutat. A lényegi különbség a szerkezetben az, hogy a TLS polimerázok aktív centruma nagyobb és flexibilisebb, így a sérült nukleotidok kötésére is alkalmas. A TLS polimerázok biokémiai jellemzőiben nagymértékű eltérést mutatnak a replikatív DNS polimerázoktól. Kis processzivitású és kis pontosságú DNS polimerázok (22;24-26), ami azt jelenti, hogy bár sok hibát vétenek, de működésük csak egy rövid DNS szakaszra korlátozódik. A TLS és a replikatív polimerázok közös tulajdonsága, hogy *in vivo* a PCNA-hez (a replikációs komplex központi fehérjéje) kapcsolva működnek (27-31). Ugyanakkor a TLS polimerázok által átírt DNS szakasz hosszát (a TLS polimeráz processzivitását) ellentétben a replikatív polimerázokkal nem növeli meg a PCNA-vel való interakció. Éppen ezért valószínűleg a PCNA lehet az a felület, amelyen keresztül szabályozódik a replikatív és TLS DNS polimerázok cseréje a replikációs komplexben (32;33). A TLS polimerázok lehetnek hibamentes (error-free) és mutagén (error-prone) működésűek (22;34), amely tulajdonság elsősorban az éppen átírt DNS hiba és az átírást végző TLS polimeráz minőségétől függ. *In vitro* kísérletek azt mutatták, hogy a TLS polimerázok működése nem korlátozódik csak a DNS hibára, hanem ép

templát szállal szemben is nukleotidokat építenek be. A működésük során fellépő nagy hibaszázalék miatt a sejt számára káros, ha a TLS polimerázok a DNS hibán áthaladva az ép templátszállal szemben további nukleotidokat építenének be. Ennek egyik gátja a TLS polimerázok alacsony processzivitása. Ugyanakkor a TLS polimerázok nem rendelkeznek saját 3'-5' exonukleáz (proofreader) aktivitással, ami az alacsony pontosságuk egyik oka a tág és flexibilis aktív centrum mellett. Ezért feltételezhető, hogy *in vivo* létezik egy eddig azonosítatlan proofreader alegység, amelynek funkciója kettős lehet: egyrészt, mint egy proofreader, a helytelenül beépített nukleotidok eltávolításában és így a TLS polimerázok pontosságának *in vivo* növelésében lehet szerepe, másrészt elképzelhető, hogy 3'-5' exonukleáz aktivitása az a mechanizmus, amely csak a hiba átírására korlátozza a TLS polimerázt, meggátolva, hogy az ép templáttal szemben is működjön.

II.3 A PCNA

A PCNA (proliferating cell nuclear antigen) fehérje egy gyűrű alakú homotrimer molekula, amelyet a replikatív DNS polimeráz, a DNS polimeráz- α és DNS polimeráz- β processzivitási faktoraként írtak le (35). A PCNA homotrimer körbeöleli a DNS-t, és mint egy csúszó kapocs halad rajta. Az RFC (replikációs faktor C) fehérje képes a PCNA-t a DNS-re juttatni (kinyitni, majd újra összezární) az RPA (replikációs protein A) jelenlétében. Az utóbbi évek eredményei azt mutatják, hogy a PCNA számos, a sejtciklusban (ciklin D, p21) és a DNS reparációban (XPG, UNG, transzléziós polimerázok) szerepet játszó fehérjével is kölcsönhatásba lép. Ezek alapján egyértelműnek tűnik, hogy a PCNA központi szerepet játszik a DNS szintetizálás és javítás folyamataiban, valamint a sejtciklus szabályozásának is az egyik célpontja lehet (36).

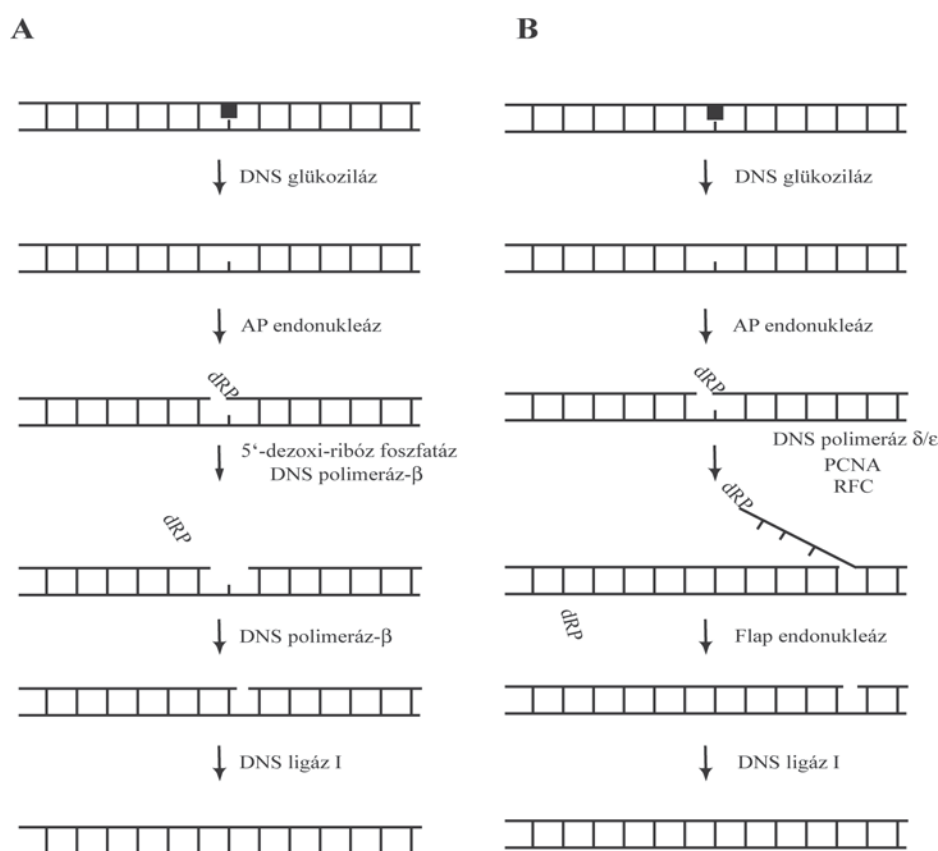
A PCNA-vel kölcsönható fehérjék egy ún. PIP motívumon (PCNA interaction protein box) keresztül képesek kötni a PCNA-t (37). A PIP motívum konszenzus szekvenciája: Q-x-x(h)-x-x-(a)-(a), ahol a (h) valamilyen hidrofób aminosav (L, I vagy M), míg az (a) aromás aminosavat jelöl (F, Y). Az x helyén bármilyen aminosav lehet. Azonban ismerünk számos PCNA-vel kölcsönható fehérjét (DNS polimeráz- α , ciklin D) amelyek nem tartalmazzak PIP motívumot. Ezek a fehérjék egy ún. KA motívumot tartalmazzak, ami kevésbé konzervált és ezért szekvencia analízissel nehezen azonosítható (38).

II.4 A bázis excíziós reparáció

A bázis excíziós reparáció egy igen fontos, általános és nagy kapacitású reparációs út, amelynek hibás működése esetén a sejt mutációs rátája jelentősen megnő. Ezen az úton kerülnek kijavításra a sejt nyugvó szakaszaiban (G1, G2) a károsodott bázisok (alkilált, oxidált, dezaminált

bázis), valamint az abázikus helyek (AP hely), amelyek az egyik leggyakrabban kialakuló spontán DNS hibák, amelyekből külső károsító hatások nélkül is naponta több mint 10000 keletkezik minden egyes sejtünkben (39-41). A bázis excíziós reparáció öt egymás utáni lépésből áll (4. ábra).

1: A károsodott bázis felismerése, majd a DNS-glükozilázok által a cukor-foszfát láncról történő eltávolítása az N-glikozil kötés hasításával. A DNS-glükozilázok működésének eredménye egy szabad sérült bázis és egy abázikus hely. A legtöbb DNS-glükoziláz kis molekulatömegű (20 - 40 kDa) fehérje, működésükhöz általában nem szükséges kofaktor. Ezek a fehérjék biztosítják a BER szubsztrátspecifitását (42-44).



4. Ábra: **A Bázis excíziós reparáció.** (A) A „short-patch” BER lépései. 1. A sérült bázis lehasítása, 2. A DNS szál bemetszése az AP hely 5' végénél. 3. A keletkező vég továbbalakítása, 4. A keletkező rés feltöltése, 5. A láncvégek egyesítése. (B) A „long-patch” BER lépései. 1. A sérült bázis eltávolítása 2. A DNS szál bemetszése, 3. A szabad 3' OH végen megindul a DNS szintézis, 4. Az így keletkező 5' „Flap” struktúra eltávolítása, 5. A láncvégek újraegyesítése. Fekete négyzettel jelöltük a sérült bázist.

2: Az így keletkezett abázikus (AP) helyeknél történő bemetszés, amit a II. típusú AP endonukleázok katalizálnak. Az AP helyek 5' végénél történő behasítás, ami Mg^{2+} által katalizált folyamat eredménye: egy 3' OH és egy 5'-deoxiribóz-foszfát (dRP) vég (45).

3: A bemetszéssel keletkező láncvégek átalakítása. Jelenlegi ismereteink alapján itt kettéágazik a BER út. Az egyik lehetőség az ún.: „short-patch” BER. Ebben az esetben az AP endonukleázok által létrehozott 5'-deoxiribóz-foszfát véget a DNS polimeráz- α távolítja el a saját 5' deoxiribóz-foszfát liáz aktivitása révén, amiért a polimeráz- α N-terminális 8 kDa-os alegysége felelős (46). A keletkezett dRP vég eltávolításának másik lehetősége az ún.: „long-patch” BER. Ebben az esetben a DNS szintézis lépése (ami a szabad 3' vég néhány nukleotid hosszan történő extenziója) megelőzi a dRP vég eltávolítását. A FEN1 endonukleáz végzi a dRP vég és a végtől 5' irányba lévő további néhány nukleotid eltávolítását. A FEN1 5'-3' struktúra specifikus exonukleáz aktivitással rendelkezik. Kettős szálú, 5' túlnyúló véget tartalmazó („flap”) szubsztrátra és bemetszést (nick-et) tartalmazó szubsztrátra specifikus. A rést (gap-et) tartalmazó szubsztráton már csak csökkent aktivitást mutat (47;48). Képes kölcsönhatni a PCNA-vel (37;49), ami valószínűsíti, hogy a replikatív DNS polimerázokkal (α/β) együtt működik.

Ezen a ponton kapcsolódik a BER-hez egy mellékút is, amelyben a károsító hatások (például a radioaktív sugárzás, reaktív oxigéngyökök) által létrehozott egyesszalú lánctörések során keletkező 3'-foszfát, 3'-foszfoglukolát végek javítása megy végbe. Ezek a 3' végek blokkolják az eltört DNS lánc végeinek újraegyesítését és ezzel a sérülés javítását. Az AP endonukleázok 3'-foszfodiészteráz aktivitásuk révén el tudják távolítani ezeket a 3' blokkoló csoportokat, lehetőséget teremtve a láncvégek újraegyesítésére (50;51).

4: A keletkezett folytonossági hiány (gap) feltöltése. A „short-patch” BER esetében ezt a DNS polimeráz- α végzi (52-55). A C-terminális 31 kDa-os domén felel a DNS polimeráz aktivitásáért (46). A polimeráz- α alacsony processzivitású és alacsony pontosságú enzim, hiányzik a saját 3'-5' exonukleáz aktivitása. A „long-patch” BER-ben a hosszabb rés (2-4 nt) feltöltését a polimeráz- α/β végzi, a PCNA-hez kapcsolatosan (56-59).

5: A ligálás, amit elsősorban a DNS ligáz I végez. A DNS ligáz I mind a replikációban (az Okazaki fragmentek összekapcsolásában), mind a BER-ben szerepet játszik. N-terminális doménje képes kölcsönhatásba lépni mind a polimeráz- α -val, mind a PCNA-vel egymástól függetlenül (60-63). A ligáz működése növeli a BER pontosságának növelését. Kimutatták, hogy a DNS ligáz I azokat a láncvégeket, ahol a 3' végen hibás bázispár található, kisebb hatékonysággal képes csak az eredeti DNS láncsal összekapcsolni, mint a helyes bázispárt tartalmazót. Ez a mechanizmus segít abban, hogy a BER-ben működő alacsony pontosságú polimeráz- α működése során nagy

gyakorisággal beépült hibás nukleotidokat valamilyen proofreader mechanizmussal eltávolítsa a rendszer a láncvégek újraegyesítése előtt (64).

A bázis excíziós reparáció nagy kapacitása miatt szükséges a hibajavítás során történő nukleotidok beépítésének nagy pontossága. A bázis excíziós reparáció pontossága a folyamatban elsősorban részt vevő DNS polimeráz, a DNS polimeráz-â pontosságától függ. Meglepő módon a DNS polimeráz-â pontossága nagyon alacsony (5 – 10 ezer nukleotidonként épít be hibás nukleotidot) (54;65). Ez az *in vitro* mért adat éles ellentétben áll a bázis excíziós reparáció *in vivo* megfigyelt alacsony hibaszázalékával. Mi lehet ennek az eltérésnek az oka? Mivel a DNS polimeráz-â *in vitro* mért pontossága ilyen alacsony, szükségszerű, hogy kell lennie *in vivo* valamilyen mechanizmusnak, ami ezt jelentősen meg tudja növelni. Feltételezésünk szerint a bázis excíziós reparációban részt vevő II. típusú AP endonukleázok kínálnak egy lehetséges megoldást erre a problémára.

II.5 A II. típusú AP endonukleázok

A II. típusú AP endonukleázoknak két családja ismert (1. táblázat). Az egyik család az Endonukleáz IV család, amelybe az *Escherichia coli* Endonukleáz IV és az élesztő Apn1 fehérje tartozik. A másik család az Exonukleáz III család, ahova az *E. coli* Exonukleáz III, az élesztő Apn2, és a humán Ape1 és Ape2 fehérjék tartoznak (66;67). Ezek közül a fehérjék közül az élesztőben az Apn1, emberben az Ape1 a fő AP endonukleáz. Ezekre a fehérjékre jellemző, hogy AP endonukleáz aktivitásuk a domináns. Ezzel ellentétben az élesztő Apn2 AP endonukleáz aktivitása gyenge, viszont erős 3'-5' exonukleáz aktivitása figyelhető meg, amelynek az *in vivo* szerepe ismeretlen (67-69). Az Apn1 és Apn2 szerepét a bázis excíziós reparációban már vizsgálták. Az apn2-â élesztő sejtek növekedésében és túlélésében nem találtak különbséget a vad típushoz viszonyítva. Az apn2-â sejtek MMS (alkiláló szer, amely hatására a kezelt sejt abázikus helyeket generál a DNS-en) kezelésre csak gyengén érzékenyek. Ugyanakkor az apn1-â közepes MMS érzékenysége az apn1-â apn2-â kettős mutáns törzsben extrém módon megemelkedik. A kettős mutáns törzsben a mutációs ráta is

II. típusú AP endonukleázok

Endonukleáz IV család:

Organizmus:

Exonukleáz III család:

Endonukleáz IV

Escherichia coli

Exonukleáz III

Apn1

Saccharomyces cerevisiae

Apn2

Homo sapiens

Ape1 Ape2

1. Táblázat: A II. típusú AP endonukleázok csoportosítása.

drámaian megugrik az *apn1* törzshöz képest (70-73). Ezek az eredmények azt mutatják, hogy az *Apn1* a fő AP endonukleáz az élesztőben és az *Apn2* csak, mintegy tartalékútként vesz részt az abázikus helyek javításában, vagyis az *Apn1* kiesése esetén az *Apn2* feltételezhetően képes részlegesen átvenni annak funkcióját. Ezzel szemben a 3' végen található blokkoló csoportok eltávolításában, vagyis az egyesszálú lánc törések BER-en keresztüli javításában, hasonló arányban vesznek részt (68;74). Ugyanakkor az *Apn2* erős 3'-5' exonukleáz aktivitása miatt feltételezhető, hogy más DNS reparációs folyamatokban játszik elsősorban szerepet.

II.6 Az *Ape1* és *Ape2* fehérje

Az *Ape1* régóta ismert (40;75) jól jellemzett humán II típusú AP endonukleáz. Kimutatták, hogy mind a három, a családra jellemző enzimaktivitás: az AP endonukleáz, a 3' foszfodiészteráz és a 3'-5' exonukleáz aktivitás megfigyelhető (50;51;76;77). Meghatározták az enzimaktivitáshoz nélkülözhetetlen kétértékű kationok kötéseért felelős aminosavakat (78). A kutatások eredményeként az a sok ponton bizonyított elképzelés terjedt el, hogy az *Ape1* központi szerepet játszik a BER működésében. Mind élesztőben, mind humán sejtekben az *Ape1* (és élesztő homológja az *Apn1*) adja a sejtekben található AP endonukleáz aktivitás 90 %-át (68). A BER-nek mindkét útjában részt vesz, bizonyították, hogy növeli a DNS polimeráz pontosságát (64), és kölcsönhatásba lép számos a'' BER útban részt vevő fehérjével (79-81). Az *Ape1* jelentőségét jelzi, hogy az *Ape1* knock-out egér embrionális letalitást mutat (82;83), valamint számos tumorban az *Ape1* kiszorul a sejtmagból és csak citoplazmatikus lokalizációja figyelhető meg (84-86).

A humán *Ape2* egy újonnan felfedezett és kevésbé ismert tagja a II. típusú AP endonukleázoknak. Az *Ape2* az élesztő *Apn2* fehérjével külön alcsaládot képez a II. típusú AP endonukleázokon belül. Erre a csoportra jellemző, hogy az N-terminális katalitikus domén mellett tartalmaznak egy hosszú, C-terminális extenziót. Ez az extenzió az *Apn1* és *Ape1* fehérjékből hiányzik. Ez a C-terminális rész tartalmazza az *Apn2* fehérje PCNA kötő motívumát, amely a PCNA IDCL (interdomain connector loop) régiójával lép kölcsönhatásba (67;69). Ez a kölcsönhatás stimulálja az élesztő *Apn2* 3'-5' exonukleáz aktivitását, amiből feltételezhető, hogy a két fehérje *in vivo* együtt működik. Az *Apn2* PIP motívumának mutációja a kölcsönhatást megszünteti.

A humán *Ape2* fehérje a legújabban felfedezett és még nagyon kevésbé ismert tagja a II. típusú AP endonukleázoknak (87;88). Bakteriális expressziós rendszerben próbálták tisztítani, ezidáig sikertelenül. Egy részlegesen tisztított *Ape2* preparátumról leírták, hogy gyenge AP endonukleáz aktivitással rendelkezik (87). Ugyanakkor nem bizonyították, hogy ez az aktivitás az *Ape2* sajátja, valamint nem jellemezték egyéb aktivitásait sem. Az *Ape2* N-terminálisán egy mitokondriális lokalizációs szignál található, valamint kimutatták, hogy a sejtmag mellett nagy mennyiségben

található a mitokondriumokban is (89). Mivel a mitokondrium saját genommal (mtDNS) rendelkezik, feltételezhető, hogy az Ape2-nek a mitokondriális genom integritásának megőrzésében is szerepe lehet. A mitokondriumokban a DNS oxidatív károsodása a leggyakoribb, a normális metabolikus működés során folyamatosan keletkező, nagy mennyiségű reaktív oxigéngyök miatt, amik folyamatosan károsítják a mtDNS-t a bázisok oxidálásával (pl. 8-oxoG) és egyesszálú lánc törések generálásával. Ezért joggal feltételezhető, hogy az Ape2 fehérjének az oxidatív DNS károsodások javításában kiemelt szerepe lehet. A mitokondriális lokalizáció jelenlétének ellenére az Ape2 főleg nukleáris lokalizációt mutat, amelyet a fehérje C-terminálisa határoz meg (87). Az Ape2 tartalmaz PCNA kötő motívumot, valamint kimutatták, hogy *in vivo* bizonyos esetekben egy komplexben találhatók (89). Kimutatták, hogy az Ape2 hiányos egerek érésben levő T limfocitáinak sejtciklusában G2/M blokk figyelhető meg, valamint az Ape2 mRNS-ének expressziós maximuma az S fázisban található (90). Ezekből az adatokból egyértelműen az következtethető, hogy az Ape2 jelentős sejtmagi szerepet lát el a sejtciklus S fázisában, aminek az egyik lehetséges módja az új DNS szintézissel járó folyamatokban való részvétel. Az Ape2 *in vivo* jelentőségét tovább erősíti az Ape2 knock-out egéren megfigyelhető tulajdonságok: a növekedési rendellenességek, az érésben lévő limfociták sejtciklusában bekövetkező G2/M blokk, a vérképzés hibái. (91). Annak a kérdésnek a megválaszolásához, hogy vajon ezeknek a hibáknak a hátterében milyen folyamatok húzódnak meg, szükség van az Ape2 fehérje enzimatis aktivitásainak jellemzésére.

III. Célkitűzések

Célul tűztük ki, hogy biokémiaailag jellemezzük a humán Ape2 fehérjét, és ezen keresztül vizsgáljuk a DNS reparációban betöltött szerepét.

Ennek során megvizsgáltuk, hogy az Ape2 rendelkezik-e a II. típusú AP endonukleázokra jellemző enzimaktivitásokkal, úgymint az AP endonukleáz, a 3'-foszfodiászteráz és 3'-5' exonukleáz aktivitás.

Célunk volt az *in vitro* vizsgálatok során meghatározott fő enzimatis aktivitás, a 3'-5' exonukleáz aktivitás további jellemzése és vizsgálata, amely megadhatja a választ arra a kérdésre, hogy mi az Ape2 *in vivo* funkciója.

Vizsgáltuk:

- a 3'-5' exonukleáz aktivitás szubsztrátspecifitását
- az Ape2 és a PCNA fehérje kölcsönhatása hogyan befolyásolja az Ape2 3'-5' exonukleáz aktivitását
- az Ape2 fehérje 3'-5' exonukleáz aktivitásának működését mismatch-et és helyes bázispárt tartalmazó 3' végen
- az Ape2 3'-5' exonukleáz aktivitása hogyan viselkedik azokban az esetekben, ha a szubsztrát DNS-en *in vivo* gyakran előforduló DNS sérülések találhatók.
 - Vizsgáltuk az Ape2 3'-5' exonukleáz aktivitását olyan DNS szubsztráton, amelynek 3' visszahúzó végén egy dezoxi-uracilt helyeztünk el. Ebben a kísérleti elrendezésben a frissen szintetizálódó DNS lánc 3' végére beépült sérült nukleotid eltávolításának hatékonyságát vizsgáltuk.
 - Vizsgáltuk az Ape2 3'-5' exonukleáz aktivitását olyan DNS szubsztráton, amely a replikatív DNS polimeráz hibával szembeni mutagén működését modellezi. Ebben a kísérleti elrendezésben olyan szubsztrát DNS-t terveztünk használni, amely a 3' végén a templát szálon egy 8-oxoG-t tartalmazott, vele szemben pedig egy adenint

IV. Anyagok és módszerek

IV.1 A vad típusú Ape2 klónozása

A klónozáshoz egy már meglévő, pontmutációt nem tartalmazó humán Ape2 cDNS-t tartalmazó plazmid konstrukciót használtunk. Ebből a vektorból az Ape2 cDNS-t klónoztuk pENTR3C vektorba (*Invitrogene*) *KpnI* *NotI* restrikciós enzimeket (*Fermentas*) használva.

IV.2 Az Ape2 pontmutások előállítása

Az Ape2 pontmutásokat (8. ábra A) a QuickChange Site-Directed Mutagenesis Kittel (*Stratagene*) készítettük. A D277A pontmutánshoz az O1026 (5'-CTC CCG GCT TGC CTA TGT GCT GGG-3') O1027 (5'-CCC AGC ACA TAG GCA AGC CGG GAG-3'), a Y396A F397A pontmutánshoz az O1052 (5'-GAAAAA CCT GAA GAG CGC CGC TCA GTC CTC CCC TAG CTG-3') O1053 (5'-CAG CTA GGG GAG GAC TGA GCG GCG CTC TTC AGG TTT TTC-3'), a Y492A F493A pontmutánshoz az O1077 (5'-CAA CTT GGG CCG CCG CGC CGC CAT GTG TGC CAG GCC CC-3') és az O1078 (5'-GGG GCC TGG CAC ACA TGG CGG CGC GGC GGC CCA AGT TG-3') és az F511A F512A pontmutánshoz az O1079 (5'-CTC CTC CCG GTG CAA CGC CGC CCT CTG GAG CAG GCC C-3') és O1080 (5'-GGG CCT GCT CCA GAG GGC GGC GTT GCA CCG GGA GGA G-3') mutagén primereket használtuk, amelyekben a vastagon szedett betű jelzi a megváltoztatott nukleotidokat. A PCR reakcióban a templát az Ape2 pENTR3C klón volt. A hármas PCNA kötő hely mutáns Ape2-t az egyes pontmutások készítésénél használt primerekkel végeztük három egymás utáni mutagenézissel, ahol mindig a már elkészült egyes, illetve kettős mutánst használtuk templátnak. A PCR reakció a következő komponenseket tartalmazta: (30 ng templát DNS, 5 μ l 10X *Pfu* DNS polimeráz puffer (*Fermentas*) 1mM MgSO₄, 125 ng O1026 primer, 125 ng O1027 primer, 2 μ l 2,5 mM dNTP, 2,5 U *Pfu* DNS polimeráz (*Fermentas*)). A mutagén PCR reakció a következő ciklusokból állt: 30 másodperc 95°C-on (denaturáció), 30 másodperc 55°C-on (primer kapcsolás), 8 perc 68°C-on (átírás). A fenti három lépés 16 cikluson keresztül ismétlődött. Ezután a mintákat 60 percig emésztettük *DpnI* restrikciós enzimmal, majd transzformáltunk a reakcióból 1 μ l-t *E. coli* DH5 α -ba. A kapott plazmidból kivágtuk az Ape2 mutációt tartalmazó szakaszát *EheI* és *XbaI* restrikciós enzimekkel és klónoztuk az *EheI*, *XbaI* enzimekkel hasított Ape2 pENTR3C-be. Az így kapott plazmid klónozott részét szekvenáltattuk.

IV.3 A PCNA, a vad típusú és a mutáns Ape2 túltermeltetése és tisztítása

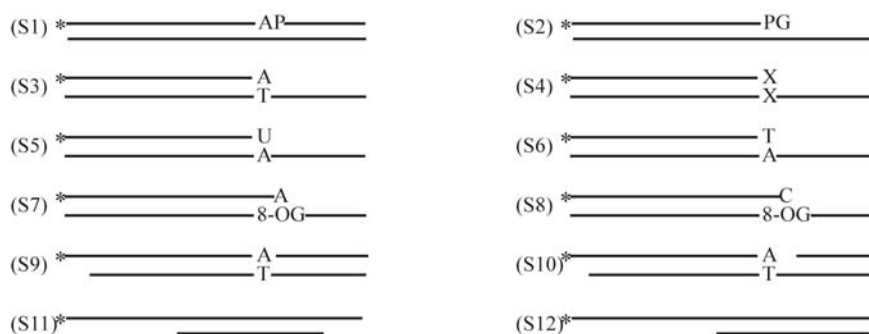
A vad típusú és a különböző mutáns Ape2 cDNS-eket tovább klónoztuk pBJ842d élesztő protein expressziós vektorba, a gateway klónozó rendszer alkalmazásával (*Invitrogen*). A pBJ842d

a glutation-S metil-transzferáz (GST) gént tartalmazza egy galaktóz indukálható promóter kontrollja alatt. A meglévő humán PCNA cDNS-t klónoztuk pBJ842 élesztő protein expressziós vektorba *Bgl*II enzimmal (*Fermentas*) A fehérjét proteáz hiányos BJ5464 élesztő törzsben termeltettük. A sejteket stacioner fázisig növesztettük inkomplett szintetikus tápoldatban 30°C-on, amelyből hiányzott a leucin. A kultúrát tízszeresére hígítottuk leucin hiányos inkomplett tápoldattal, amely nem tartalmazott glükózt. A sejteket egész éjjel növesztettük ilyen körülmények között 30°C-on, majd indukáltuk 0,2% galaktózzal. Három óra indukció után a sejteket összegyűjtöttük centrifugálással (5000 g 5 perc 4°C). A sejteket felvettük a kötő pufferban (20 mM Tris-HCl pH 7.5, 1 M NaCl, 1 mM dithiotreitol, 0.01% Nonidet P-40, 10% glicerol, 5 mM EDTA és porteáz inhibitor koktél (Complete PI mix with EDTA (*Roche*)). A sejteket üveggyönggyel rázatva tártuk fel, centrifugáltuk, majd glutation Sepharose (*Amersham*) oszlopra kötöttük. A kötés után mostuk 10 oszloptérfogat feltárási pufferral, majd 10 oszloptérfogat mosó pufferral (20 mM Tris-HCl pH 7.5, 100 mM NaCl, 1 mM dithiotreitol, 0.01% Nonidet P-40, 10% glicerol). A fehérjét mosóoldattal eluáltuk, amely 20 mM redukált glutationt tartalmazott.

IV.4 DNS szubsztrátok

A DNS szubsztrátokat és az elkészítésükhöz használt oligonukleotidok szekvenciáját a 5. ábra mutatja. Az AP endonukleáz kísérlethez (S1) egy 75 nt hosszú templát DNS-hez (O 01) hibridizáltunk egy 5' végén ³²P-vel jelölt 75 nt hosszú oligonukleotidot (O 02), amely szekvenciájában az X egy tetrahydrofuránt jelez, ami egy abázikus hely analóg. A 3'-foszfodiészteráz kísérlethez olyan szubsztrátot használtunk (S2), ahol egy 70 nt hosszú templát DNS-hez (O 03) hibridizáltunk egy 5' végén ³²P-vel jelölt 35 nt hosszú oligonukleotidot (O 04), amely a 3' végén egy foszfo-glikolát véget tartalmazott. A 3'-5' exonukleáz aktivitás vizsgálatához használt szubsztrát (S3) készítésekor az 52 nt hosszú templát DNS-hez (O 05) hibridizáltunk egy 5' végén ³²P-vel jelölt 33 nt hosszú oligonukleotidot (O 06). Hogy létrehozzuk azokat a szubsztrátokat (S4), amelyek 3' végén mind a 16 lehetséges bázispárosodást tartalmazták, az 52nt-os templátokhoz (O 05) hibridizáltuk a ³²P-vel jelölt 33 nt hosszú oligonukleotidokat (O 07). A szekvenciákban az X jelöli azt a helyet, ahol a különböző bázisok találhatóak. A 3' végi sérült nukleotidok exonukleotikus javításának vizsgálatához az S5, S6 szubsztrátot használtuk. Ebben az esetben az 52 nt hosszú templát DNS-hez (O 05), amely az X helyén adenint tartalmazott, hibridizáltuk a ³²P-vel jelölt 33 nt hosszú oligonukleotidot (O 06), amely a 3' végén dezoxi-uracilt, vagy timint tartalmazott az X helyén. A 8-oxoG-nal szemben beépített hibás bázis eltávolításának vizsgálatához használtuk az S7, S8 szubsztrátot. Ezek előállításánál a 75 nt hosszú templát DNS-hez (O 02), ahol az X jelöli a 8-oxoG-t, hibridizáltuk a radioaktívan jelölt 32 nt hosszú komplementer oligonukleotidot (O 07),

A



B

O 01

5'-GTT TTC CCA GTC ACG ACG ATG CTC CGG TAC TCC AGT GTA GGC ATC TTA CGA ATT CTT GAG GCA GGC ATG GTA GCT-3'

O 02

5'-AGC TAC CAT GCC TGC CTC AAG AAT TCG TAA XAT GCC TAC ACT AGA GTA CCG GAG CAT CGT CGT GAC TGG GAA AAC-3'

O 03

5'-AGC TGG ATT CGT GTC AGC CGC TAG CCA TTA GCT GGC GCA TTC CTC GAG AGA GTC CCG AGC ATC GTG ACT G-3'

O 04

5'-CAG TCA CGA TGC TCG GGA CTC TCT CGA GGA ATG CG-PG-3'

O 05

5'-TTC GTA TAA TGC CTA CAC TXG AGT ACC GGA GCA TCG TCG TGA CTG GGA AAA C-3'

O 06

5'-GTT TTC CCA GTC ACG ACG ATG CTC CGG TAC TCX-3'

O 07

5'-CGA CGA TGC TCC GGT ACT CCA GTG TAG GCA TX-3'

O 08

5'-AGC AAG TCA CCA ATG TCT AAG AGT TCG TAT TAT GCC TAC ACT GGA GTA CCG GAG CAT CGT CGT GAC-3'

O 09

5'-ATA GCA ACT CTT AGA CAT TGG TGA CTT GCT -3'

O 10

5'-TAG CAA CTC TTA GAC ATT GGT GAC TTG CT -3'

O 11

5'-AGC AAC TCT TAG ACA TTG GTG ACT TGC T -3'

O 12

5'-GCA ACT CTT AGA CAT TGG TGA CTT GCT -3'

O 13

5'-CAA CTC TTA GAC ATT GGT GAC TTG CT -3'

5. Ábra: **A felhasznált DNS szubsztrátok.** (A) A kísérletek során felhasznált DNS szubsztrátok szerkezete. **(B)** A DNS szubsztrátok készítéséhez felhasznált oligonukleotidok és szekvenciák.

amely az X helyén adenint vagy citozint tartalmazott. Az Ape2 3'-5' exonukleáz aktivitás szubsztrátspecifitásának meghatározásához több szubsztrátot használtunk. A bemetszést tartalmazó szubsztrát (S9) előállításához a 66 nt hosszúságú templátot (O 08) hibridizáltuk ^{32}P -vel jelölt 32 nt hosszú oligonukleotidhoz (O 07), valamint az O 09 oligonukleotidhoz. A különböző méretű rés előállításához (S10) az S9-nél használt oligonukleotidokat hibridizáltuk össze, csak az O 09-et helyettesítettük különböző hosszúságú oligonukleotidokkal (O 10 – O 13). Az egyesszálú DNS szubsztrát vizsgálatához ^{32}P -vel jelölt 52 nt hosszú oligonukleotidot használtunk (O 05). A 3' túlnyúló vég előállításához (S11) ezt a jelölt oligonukleotidot hibridizáltuk egy 32 nt hosszú oligonukleotidhoz (O 07), a tompa vég előállításához (S12) a jelzett oligonukleotidot (O 05) egy 33 nt hosszú oligonukleotidhoz hibridizáltuk (O 06).

IV.5 A DNS szubsztrátok radioaktív jelölése

A radioaktív jelölés során a reakció a következő komponenseket tartalmazta: 5 pmol oligonukleotid, 1 μl 10X T4 polinukleotid kináz reakciópuffer (*Fermentas*), 2 μl ^{32}P - αATP (~ 0,8 MBq), 3U T4 polinukleotid kináz (*Fermentas*). A reakciót 37°C-on inkubáltuk 60 percig. Ezután az enzimet inaktiváltuk 65°C-on 20 percig. A reakcióból ezután tisztítottuk a jelölt oligonukleotidot Sephadex G-50 oszlopon (*Pharmacia*) szűrve. A tisztított oligonukleotidok koncentrációját 0,1 pmol/ μl -re állítottuk be. A szubsztrát DNS elkészítéséhez a jelölt oligonukleotidot és megfelelő hideg komplementerét összemértük 1:1,3 arányban. A keveréket 100°C-ra melegítettük, majd hagytuk lassan lehűlni. A hibridizálás után az oldatban a jelölt oligonukleotidok 100%-a kettősszálú formában volt jelen, amit a DNS szubsztrátok natív gélelektorforézisével ellenőriztünk.

IV.6 Az AP endonukleáz, 3'-foszfodiészteráz és 3'-5' exonukleáz aktivitás vizsgálata

Egy standard reakció a következő komponenseket tartalmazta: 40 mM Tris-HCl (pH 7.5), 0,5 mM MnCl_2 , 1 mM dithiotreitol, 100 $\mu\text{g/ml}$ BSA, 10 nM DNS szubsztrát és 5 nM Ape2 fehérje. A reakciókat jégen mértük össze, majd inkubáltuk 37°C-on 5 percig. Az Ape2 exonukleáz aktivitásának jellemzésénél a 0,5 mM MnCl_2 -ot 5 mM MgCl_2 -vel helyettesítettük, ahol ezt külön megjelöltük. A pH függés vizsgálatánál HEPES-t használtunk pH 5,0; 5,5 és 6,0 esetében, míg Tris-HCl-t pH 7,0; 7,5; 8,0; 8,8 és 10,0 esetében. A reakció sóérzékenységének meghatározásakor a standard reakciópuffert egészítettük ki a megfelelő koncentrációjú NaCl-dal. A reakciót 20 μl stop pufferral állítottuk le (20 mM EDTA 95% formamid 0,25 % bromofenol kék, 0,25 % xylene cianol). A reakciókat 10%-os denaturáló poliakrilamid gélen futtattuk 1X TBE pufferban. A denaturáló poliakrilamid gél a következőket tartalmazta: 1 X TBE puffer (89 mM Tris- HCl, 89 mM Bórsav, 4 mM EDTA), 10% akrilamid (40 akrilamid : 2 bisakrilamnid), 8 M urea. A futtatás előtt a géleket a

futtatással megegyező kondíciók között minimum 20 percig előfutattuk. A futtatás paraméterei: 2000 V, 60 mA, 65 W voltak. A futtatást 120 percig végeztük.

A PCNA-nek az Ape2 aktivitásra gyakorolt hatásának vizsgálatához a 3'-5' exonukleáz reakciót 1 nM PCNA jelenlétében végeztük el, valamint a standard reakció puffert kiegészítettük 10% glicerollal. A mutáns és a vad típusú Ape2 fehérjékből mindig azonos mennyiséget használtunk reakciónként. A kontroll Ape1 fehérjéből (*Trevigen*) 1U-t használtunk reakciónként.

IV.7 Enzimkinetikai analízis

A kinetikai analízishez a standard reakciót használtuk, amely azonos mennyiségű ^{32}P jelzett szubsztrát DNS-t (3 nM) és változó koncentrációjú (3 nM, 15 nM, 33 nM, 51 nM, 105 nM, 159 nM) hideg szubsztrát DNS-t tartalmazott. A reakciókat 37°C-on inkubáltuk, majd mértük az egy perc alatt elhasadt DNS szubsztrát mennyiségét. Az így kapott értékek alapján a Sigmaplot 2001 programmal határoztuk meg az enzimreakció paramétereit. A kinetikai kísérlet eredményei 5 kísérlet átlagát tükrözik.

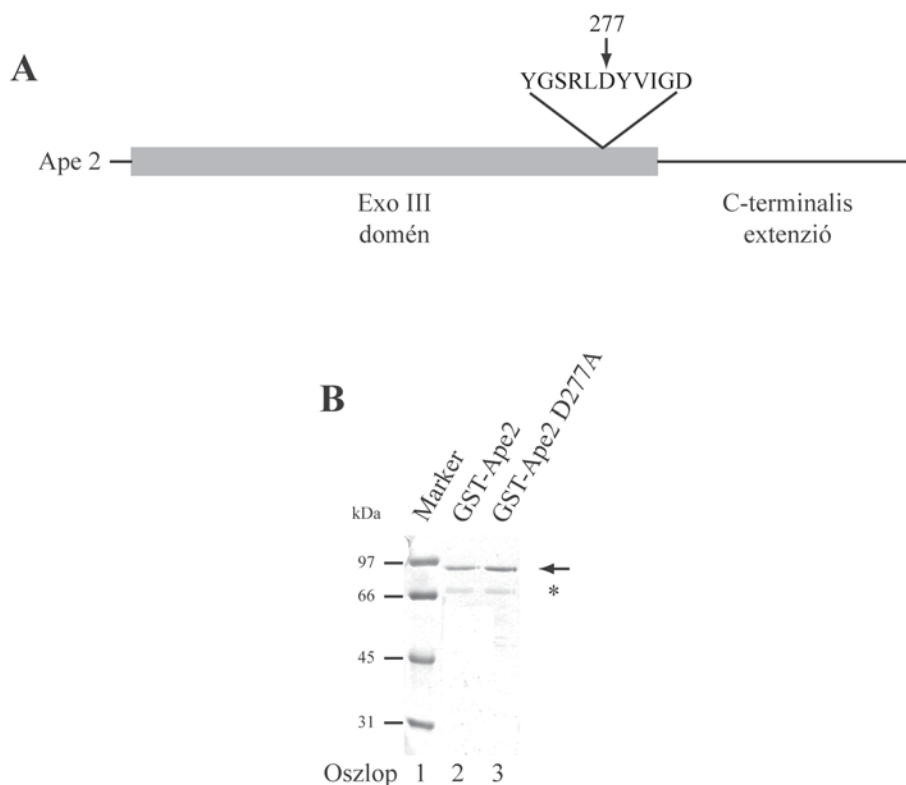
IV.8 Az enzimreakciók kiértékelése

Az eredmények kvantitálásához a Molecular Dynamics STORM Phosphorimagert és az ImageQuant 5.0 programot használtuk. Az eredményekben szereplő adatok 3 – 5 független kísérlet átlagai. Az Ape2 aktivitásának vizsgálatánál a hasított szubsztrát mennyiségét a jel denzitásának mérésével állapítottuk meg.

V. Eredmények

V.1 A vad típusú és a D277A pontmutáns Ape2 tisztítása

Ahhoz, hogy az Ape2 aktivitását biokémiaailag jellemezzük klónoznunk, túltermeltetnünk, majd tisztítanunk kellett a fehérjét. Mind az Ape1 mind az Ape2 fehérje katalitikus doménje a fehérje N-terminálisán található (6. ábra A). Az Ape2 fehérje a katalitikus doménen kívül tartalmaz még egy C-terminális extenziót is, amely csak az Apn2 alcsaládra jellemző. Az Ape1 katalitikus doménjében már korábban meghatározták azokat az aminosavakat, amelyek a katalitikus aktivitásért felelősek. Az egyik ilyen aminosav az Ape1-ben a 283. Asp, amelynek az Ape2 homológja a 277. Asp (67;88). Ezért ezen a ponton hoztunk létre mutációt, hogy funkcióképtelen Ape2 fehérjét tudjunk tisztítani. Bakteriális expressziós rendszerben próbálkozva nem tudtunk Ape2 fehérjét tisztítani. Ezért élesztő expressziós rendszerben próbáltuk túltermeltetni, majd tisztítani az Ape2 fehérjét. Élesztő sejtekben sikerült expresszálnunk és homogenitásig tisztítanunk mind a vad típusú, mind a

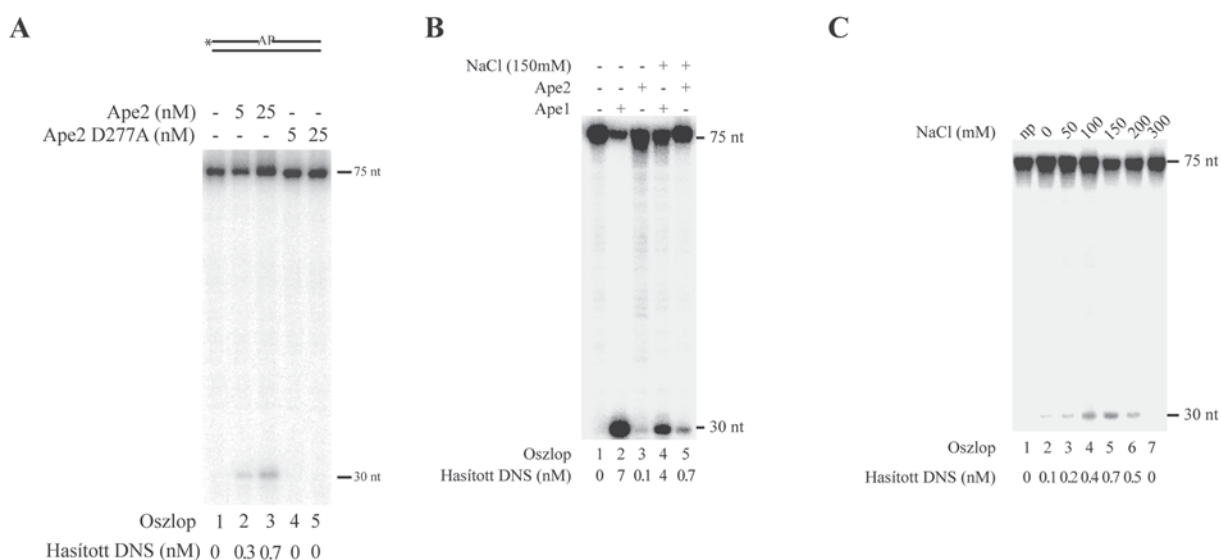


6. Ábra: **Az Ape2 fehérje tisztítása.** (A) Az Ape2 fehérje sematikus szerkezete. Szürke téglalappal jelöltük az N terminális katalitikus domént, amely konzervált a családban. Fekete vonal jelzi az Apn2 alcsaládra jellemző C-terminális extenziót. Nyíllal jelöltük a 277. aszparaginsavat, amelyet alaninra mutáltunk. (B) A vad típusú és a D277A mutáns Ape2 fehérje tisztítása. Az első oszlopban látható a molekulatömeg marker. A 2. oszlopban a vad típusú GST-Ape2 a harmadikban a D277A Ape2 tisztításának elúciós frakciója látható. A két tisztítást egymással párhuzamosan végeztük, azonos körülmények között. Nyíllal jelöltük a teljes hosszúságú GST-Ape fehérjét, csillaggal a degradált GST-Ape2-t.

D277A mutáns Ape2 fehérjét (6. ábra B). A fehérjét párhuzamosan, az N-termiális GST fúziós partneren keresztül tisztítottuk. Mind a vad típus, mind a pontmutáns esetében megfigyelhető volt egy kis mértékű degradáció.

V.2 Az Ape2 gyenge AP endonukleáz aktivitással rendelkezik

A II. típusú AP endonukleázok elsődleges funkciója, hogy az abázikus hely 5' végénél bemetszi a DNS-t. Ezért megvizsgáltuk, hogy az Ape2 fehérje rendelkezik-e ezzel, a családra jellemző aktivitással. A kísérletben az S1 szubsztrát DNS-t használtuk (5. ábra), amely a jelzett szálán a 31. pozícióban egy tetrahidrofuránt tartalmazott, ami az abázikus hely analógja. Az AP endonukleáz aktivitás működéseként a jelzett oligonukleotid az AP hely 5' végénél hasad el és egy 30 nt hosszúságú terméket ad ebben a kísérleti elrendezésben. Kísérleteink során az Ape2 fehérje csak nagyon gyenge AP endonukleáz aktivitással rendelkezett (7. ábra A 2. 3. oszlop). A D277A pontmutánst használva megállapítottuk, hogy ez az AP endonukleáz aktivitás az Ape2 sajátja (7. ábra A. 4. 5. oszlop). Kontrollként Ape1 fehérjét használtunk ugyanezen a szubsztráton, amelyről már korábban bizonyították, hogy AP endonukleáz, ezért a két fehérje működéseként kapott termékek összehasonlítása egyértelműen bizonyítja, hogy az Ape2 fehérje pontosan ugyanott hasít, ahol az Ape1, vagyis AP endonukleázként működik (7. ábra B 2-5 oszlop). Az optimális reakció körülményeket keresve megállapítottuk, hogy az Ape2 150 mM NaCl jelenlétében sokkal aktívabb,

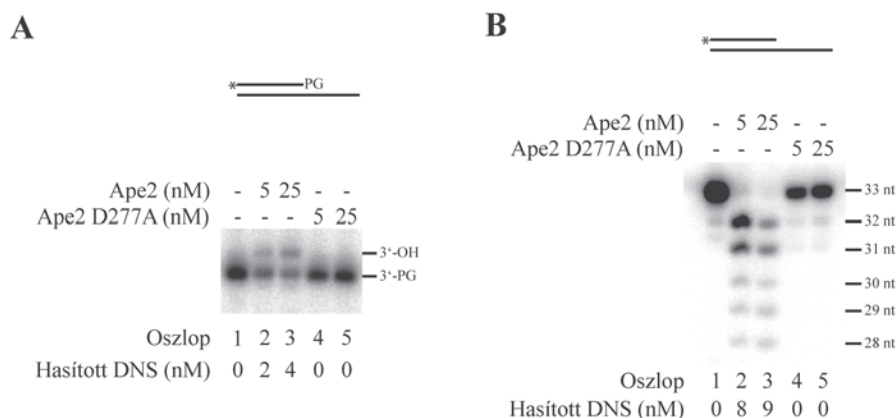


7. Ábra: Az Ape2 AP endonukleáz aktivitása. (A) A vad típusú (2. 3. oszlop) és a D277A mutáns (4. 5. oszlop) Ape2 AP endonukleáz aktivitása. (B) Az Ape1 (2. 4. oszlop) és az Ape2 (3. 5. oszlop) hasítási helyének összehasonlítása az AP helyet tartalmazó DNS szubsztráton. (C) Az Ape2 fehérje AP endonukleáz aktivitásának sófüggése. A standard reakcióoldatot növekvő koncentrációjú NaCl oldattal egészítettük ki (3-7 oszlop), majd 37°C-on inkubáltuk 5 percig.

mint sómentes oldatban (7. ábra C). A fehérjét két és félszeres moláris feleslegben adva a szubsztrát DNS-hez optimális körülmények között, annak mindössze 7%-át (0,7 nM) hasította el. Ez alapján feltételezhetjük, hogy az Ape2 gyenge AP endonukleázként működik.

V.3 Az Ape2 3'-foszfodiészteráz aktivitással rendelkezik

A BER-ben a II. típusú AP endonukleázok fontos feladata az egyesszálú lánc törések során keletkező 3' blokkoló csoportok eltávolítása. Ennek az aktivitásnak a vizsgálatára az S2 szubsztrát DNS-t használtuk (5. ábra), ahol az 5' végen jelzett, 35 nt hosszú szál 3' végén egy foszfo-glikolát (PG) vég helyezkedett el. A 3'-foszfodiészteráz aktivitás működéseként a 3' PG végből 3' szabad OH (hidroxil) vég keletkezik. Az OH véget tartalmazó oligonukleotid kisebb mobilitással rendelkezik a 10%-os szekvenáló gélen, mint a PG véget tartalmazó, így elválasztható egymástól a két különböző 3' végű DNS. Az Ape2-t két és félszeres moláris feleslegben adva a szubsztrát DNS-hez, annak 40%-át (4 nM) hasította el (8. ábra A. 3. oszlop). Mivel a D277A mutáns nem mutatta ezt az aktivitást, így bizonyítottuk, hogy ez is az Ape2 fehérje endogén aktivitása (8. ábra A. 4. 5. oszlop). Ezek az eredmények arra engednek következtetni, hogy az Ape2 valóban jelentős szerepet játszhat a BER 3' blokkoló végek eltávolítását végző mechanizmusában.



8. Ábra: Az Ape2 3'-5' exonukleáz és 3'-foszfodiészteráz aktivitása. **(A)** A vad típusú (2 – 3 oszlop) és a D277A mutáns (4 – 5 oszlop) Ape2 3'-foszfodiészteráz aktivitása. **(B)** A vad típusú (2 – 3 oszlop) és a D277A mutáns (4 – 5 oszlop) Ape2 3'-5' exonukleáz aktivitása.

V.4 Az Ape2 3'-5' exonukleáz aktivitással rendelkezik

Mivel a II. típusú AP endonukleázok rendelkeznek 3'-5' exonukleáz aktivitással, megvizsgáltuk az Ape2 fehérje exonukleáz aktivitását is. Az Ape2 3'-5' exonukleáz aktivitásának kimutatását az S3 szubsztrát DNS-en végeztük (5. ábra), amely egy 3' visszahúzódó véget tartalmazó

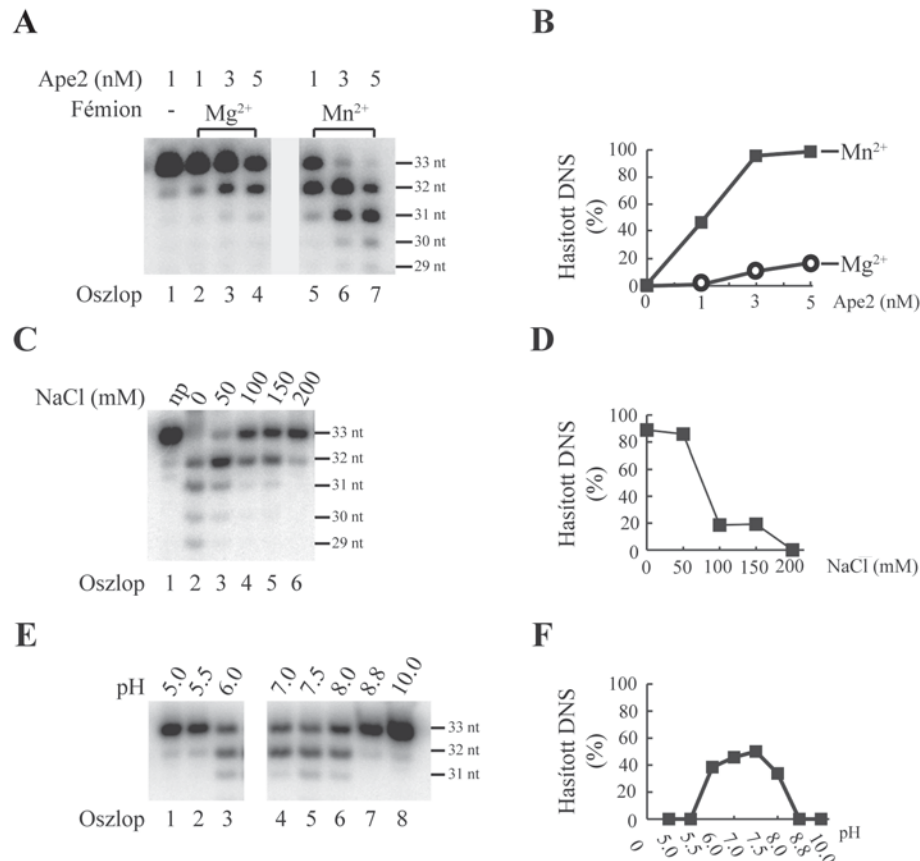
radioaktívan jelölt dupla szálú DNS. Az 5' végen jelölt oligonukleotid rövidebb formáinak sorozatának a megjelenése jelezte, hogy az Ape2 3'-5' irányból hasította a DNS-t (8. Ábra B. 2. 3. oszlop). A D277A mutáns Ape2 fehérjével nem tudtuk kimutatni ezt az erős exonukleáz aktivitást (8. ábra B. 4. 5. oszlop). Mivel párhuzamosan vizsgáltuk a vad típusú és a D277A mutáns Ape2 fehérjét, így bizonyítottuk, hogy a kapott és a továbbiakban vizsgált exonukleáz aktivitás az Ape2 fehérje sajátja. Amikor a DNS szubsztrát kétszeres moláris feleslegben volt az Ape2 fehérjéhez képest, akkor a hasítás közel 100%-os volt (8. ábra A. 2. oszlop). Mivel azonos mennyiségű Ape2-t azonos ideig inkubálva a 3'-5' exonukleáz aktivitás (több mint 10 nM-t hasított) a 3' foszfodiészteráz aktivitásnál mintegy egy, az AP endonukleáz aktivitásnál pedig mintegy két nagyságrenddel volt nagyobb, ezért ehhez az aktivitáshoz kapcsolódhat az Ape2 fő funkciója.

V.5 Az Ape2 3'-5' exonukleáz aktivitásának jellemzése

Meghatároztuk az optimális reakciókörülményeit a 3'-5' exonukleáz aktivitásnak az S3 szubsztrát (5. ábra) segítségével. Az Ape2 exonukleáz aktivitása erősen függ a kétértékű kationok jelenlététől (9. ábra A. B.). Mn^{2+} jelenlétében sokkal aktívabb a fehérje (9. ábra A. 5 - 7 oszlop), mint Mg^{2+} jelenlétében (9. ábra A. 2 - 4 oszlop). Kétértékű kation hiányában nincs megfigyelhető exonukleáz aktivitás (9. ábra A. 1. oszlop). Az Ape2 3'-5' exonukleáz aktivitása érzékeny a sókoncentrációra (9. ábra C. D.). 100 mM NaCl már erőteljesen lecsökkenti az aktivitást (9. ábra C. 4. oszlop), míg 200 mM-os koncentrációban az Ape2-nek nincs detektálható 3'-5' exonukleáz aktivitása (9. ábra C. 6. oszlop). A reakció pH-ra kevésbé érzékeny (9. ábra E. F.), bár a pH optimuma 7,5-nél van (9. ábra E. 5. oszlop), de az Ape2 3'-5' exonukleáz aktivitása pH 6,0 és 8,8 közt közel azonos intenzitású (9. ábra E 3 – 6 oszlop).

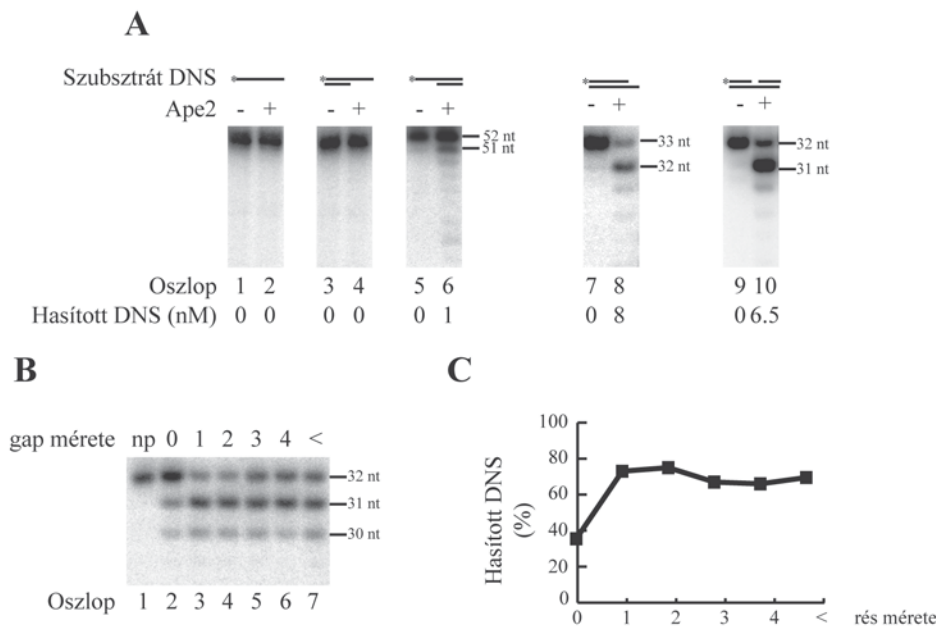
Megvizsgáltuk, hogy az Ape2 fehérje 3'-5' exonukleáz aktivitása hogyan változik különböző DNS szubsztrátokon (10. ábra A). Egyesszálú és 3' túlnyúló végű DNS szubsztráton (5. ábra S11) az exonukleáz aktivitás nem figyelhető meg (10. ábra A. 2. 4. oszlop). Kettősszálú tompa végű DNS szubsztráton (5. ábra S12) gyenge 3'-5' exonukleáz aktivitás figyelhető meg (10. ábra A. 6. oszlop). Az Ape2 exonukleáz aktivitása preferenciát mutat a 3' visszahúzódó végű (recessed end) szubsztrátra (5. ábra S3, S10; 10. ábra A. 8. 10. oszlop). Ez a preferencia megfigyelhető mind a szabad 3' visszahúzódó végén, mind olyan 3' visszahúzódó végnél, amely 3' irányba egy rést tartalmaz.

Mivel a II. típusú AP endonukleázok a bázis excíziós reparációban (BER) részt vevő fehérjék, megvizsgáltuk, hogy a bázis excíziós reparáció jellegzetes 3'-5' exonukleáz szubsztrátjára, amelyen a szabad 3' vég mellett közvetlen egy bemetszés található (5. ábra S9), mutat-e specificitást (10. ábra B. C.) az Ape2 3'-5' exonukleáz aktivitása. Kísérleteink azt az eredményt mutatták, hogy a



9. Ábra: **Az Ape2 3'-5' exonukleáz aktivitásának jellemzése.** (A) Az Ape2 exonukleáz aktivitásának fémion függése. A standard exonukleáz reakció oldatból kihagytuk a fémiont (1 oszlop), a 0,5 mM MnCl₂-ot 5 mM MgCl₂-dal helyettesítettük (2 – 4 oszlop) illetve a standard reakció puffert használtuk (5 – 7 oszlop). (B) Az A pontban kapott aktivitást grafikusán ábrázoltuk. (C) Az Ape2 3'-5' exonukleáz aktivitásának függése a sókoncentrációtól. A standard reakciópufferben inkubáltuk az Ape2-t (2. oszlop), illetve a standard puffert növekvő sókoncentrációval egészítettük ki (3 – 6). Kontrollként Ape2 mentes puffert használtunk (1. oszlop). (D) A C. pontban kapott enzimaktivitás grafikus ábrázolása. (E) Az Ape2 3'-5' exonukleáz aktivitásának pH függése. A pH 5,0; 5,5; 6,0 reakciók esetében a standard reakciópufferben a 40 mM Tris-HCl helyett 40 mM HEPES-t használtunk. A pH 7,0; 7,5; 8,0; 8,8; 10,0 reakciókban 40 mM Tris használtunk. (F) Az E. pontban kapott adatok grafikus ábrázolása.

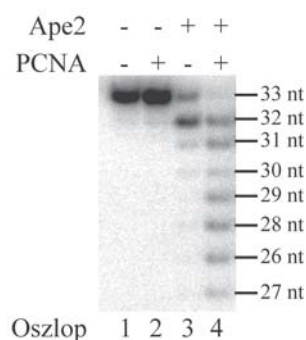
bemetszést tartalmazó szubsztráton lényegesen kisebb (kb. 50%-a) az Ape2 3'-5' exonukleáz aktivitása (10. ábra B 2. oszlop), mint a rést vagy szabad 3' véget tartalmazó DNS szubsztráton (10. ábra B 3 - 7 oszlop). Ugyanakkor a rés hossza nem befolyásolja az Ape2 3'-5' exonukleáz aktivitását (10. ábra B 3 - 7 oszlop). Mivel a bemetszést tartalmazó szubsztráton csökkent aktivitást tapasztaltunk, feltételezhető, hogy az Ape2 fehérje 3'-5' exonukleáz aktivitása nem a BER-ben vesz részt. Ugyanakkor a 3' visszahúzó véget tartalmazó DNS szubsztráton tapasztalt erős aktivitás alapján azt feltételezzük, hogy az Ape2-nek más, DNS szintézissel kapcsolt hibajavító folyamatban lehet meghatározó szerepe, amelyekben szabadon vagy rés részeként 3' visszahúzó DNS szubsztrát vég áll rendelkezésre.



10. Ábra: **Az Ape2 3'-5' exonukleáz aktivitásának szubsztrátspecifitása.** **(A)** Az Ape2 3'-5' exonukleáz aktivitása egyesszálu (1 -2 oszlop), 3' túlnyúló végű (3 – 4 oszlop), tompa végű (5 – 6 oszlop), 3' visszahúzódó végű (7 – 8 oszlop) és egy nukleotidos rést tartalmazó (9 – 10 oszlop) DNS szubsztráton. **(B)** Az Ape2 3'-5' exonukleáz aktivitásának hatékonysága bemetszést (nick) (2. oszlop) és különböző hosszúságú rést (3 – 6) tartalmazó DNS szubsztráton. Kontrollként (7. oszlop) 3' visszahúzódó végű DNS szubsztrátot használtunk. **(C)** A B. pontban kapott aktivitások grafikus ábrázolása.

V.6 A PCNA kölcsönhat az Ape2 fehérjével és stimulálja annak 3'-5' exonukleáz aktivitását

Számos DNS hibajavítási mechanizmus központi szerepet játszó fehérjéje a PCNA. A DNS hibajavításban résztvevő fehérjék nagy részében azonosították már a PCNA-val való kölcsönhatásért felelős szekvenciamotívumot (PIP motívum), amely az Ape2-ben is megtalálható. Ezért megvizsgáltuk, hogy a PCNA képes-e megváltoztatni az Ape2 általunk vizsgált 3'-5' exonukleáz aktivitását. A standard exonukleáz reakcióhoz 1 nM PCNA hozzáadása drámaian megnöveli az Ape2 3'-5' exonukleáz aktivitását (11. ábra 4. oszlop). A kísérletben olyan kontrollt is használtunk, amely a PCNA preparátumban található esetleges 3'-5' exonukleáz szennyeződés kimutatására volt alkalmas (11. ábra 2. oszlop). Mivel ebben az esetben semmilyen 3'-5' exonukleáz aktivitást nem tapasztaltunk, ezért csak az Ape2 PCNA kölcsönhatás az, ami ezt az aktivitásnövekedést előidézhette. A PCNA kulcsszerepet játszik a DNS hibajavítás során az új DNS szintézissel járó folyamatokban, ezért feltételezhetjük, hogy az Ape2-nek is ezekben a folyamatokban lehet szerepe.

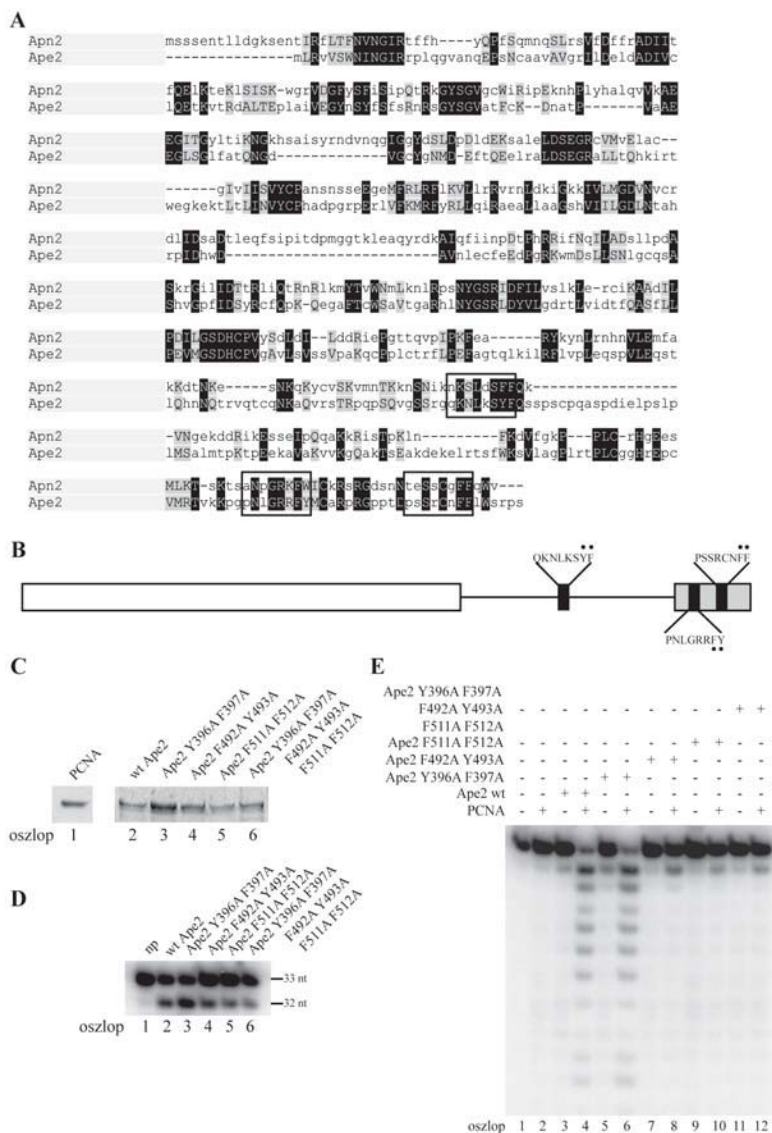


11. Ábra: **A PCNA stimulálja az Ape2 3'-5' exonukleáz aktivitását.** A reakciót standard reakciópufferben végeztük, amely 10 % glicerolt és 1 nM PCNA-t tartalmazott (2. 4. oszlop). Minden reakciót 37°C-on inkubáltunk 5 percig. Negatív kontrollként (1 - 2 oszlop) Ape2-mentes reakciópuffert használtunk.

V.7 Az Ape2-ben két PCNA kötő hely kooperatív működése szükséges a PCNA fehérje 3'-5' exonukleáz aktivitást stimuláló hatásának kifejtéséhez

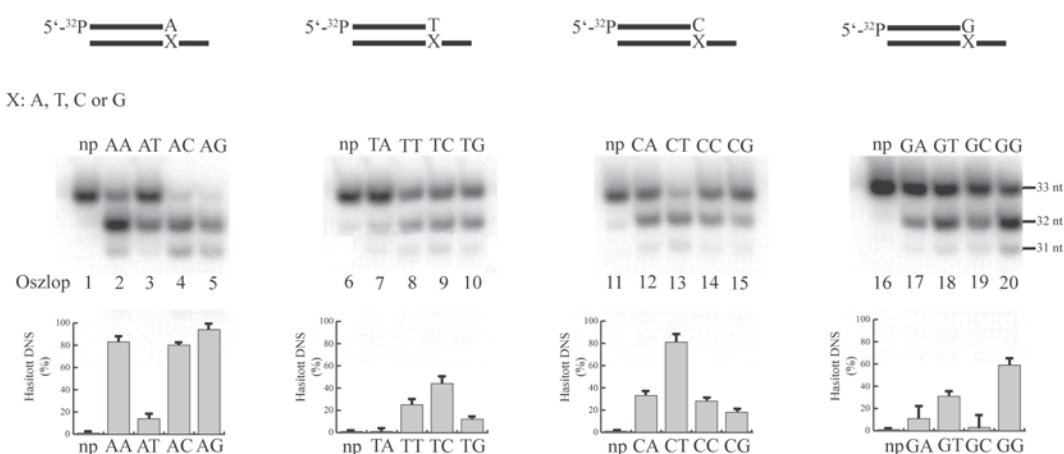
Korábban Tsuchimoto és munkatársai közölték, hogy az Ape2 PIP motívuma a 390 és 397 aminosav között található **QKNLKS**YF szekvencia (89). Ennek és a PCNA aktiváló hatásának bizonyítására elmutáltuk a motívumban található két konzervált aromás aminosavat. Ezt a kettős pontmutáns Ape2-t (Y396A F397A) a várakozásainkkal ellentétben a vad típussal megegyező mértékben volt képes stimulálni PCNA (12. ábra E 3–6 oszlop). Részletesen megvizsgálva az Ape2 szekvenciáját sikerült további két lehetséges PCNA kötő motívumot meghatározni. Ez a két motívum a 486 és 493 aminosav között található **PNLGRR**FY és az 505 és 512 aminosav között található **PSSRCN**FF szekvencia, amelyek az Ape2 C terminálisán találhatóak. Mindkét motívumban közös, hogy részben konzervált, eltér a konszenzus PCNA kötő motívumtól (Q-x-x-(h)-x-x-(a)-(a)), de tartalmazza a két konzervált aromás aminosavat (12. ábra A), valamint Xu és munkatársai kimutatták, hogy ehhez a szekvenciához hasonló polipeptid képes kötni a PCNA-t (38). Ezért elkészítettük a két új motívumban pontmutáns Ape2 fehérjét is (F492A Y493A és F511A F512A). Ezen kívül elkészítettünk egy olyan többszörösen pontmutáns Ape2-t (12. ábra B), amely mind a három lehetséges PCNA kötő helyben tartalmazott mutációt (Y396A F397A F492A Y493A F511A F512A). Ezeket a PCNA kötőhelyben mutáns Ape2-eket a vad típusúval megegyező módon tisztítottuk (12. ábra C), majd azonos mennyiségeket használva elvégeztük az exonukleáz kísérletet önmagában és a PCNA-val együtt. Önmagában a standard reakciókörülményeket használva minden Ape2 mutáns aktív volt (12. ábra D). Ezzel szemben, amennyiben PCNA-val együtt vizsgáltuk a pontmutánsok 3'-5' exonukleáz aktivitását, azt az eredményt kaptuk, hogy a két újonnan talált PCNA kötő szekvencia

12. Ábra: **Az Ape2 PCNA kötő helyei. (A)** A feltételezett PCNA kötő helyek konzerváltsága. Összehasonlítottuk az élesztő Apr2 és az ember Ape2 fehérjéinek szekvenciáit. A megegyező aminosavak feketével a hasonló karakterű aminosavak szürkével felülfestve jelöltek. A feltételezett PCNA kötő helyeket bekereteztük. **(B)** Az Ape2 sematikus szerkezete. Üres téglalappal jelöltük a katalitikus domént, szürke téglalappal a Zn finger domént. A fekete téglalapok a feltételezett PCNA kötő motívumokat jelölik. A PCNA kötő motívumok szekvenciája fölött, ponttal jelöltük az elmutált aminosavakat. **(C)** A kísérletek során használt tisztított PCNA és Ape2 fehérjék. **(D)** A vad típusú és a mutáns Ape2 fehérjék 3'-5' exonukleáz aktivitása (2 – 6. oszlop). **(E)** A PCNA 3'-5' exonukleáz aktivitás stimuláló hatása a mutáns Ape2 fehérjéken. A vad típusú és a Y396A F397A mutánst azonos mértékben stimulálja a PCNA (2 -6 oszlop), az F492A Y493A és F511A F512A mutánsokat ellenben nem képes stimulálni a PCNA (7 – 10 oszlop), ahogy a hármas mutáns Ape2 se (11, 12 oszlop).



V.8 Az Ape2 3'-5' exonukleáz aktivitása specifikus a 3' végi hibásan beépült bázisokra

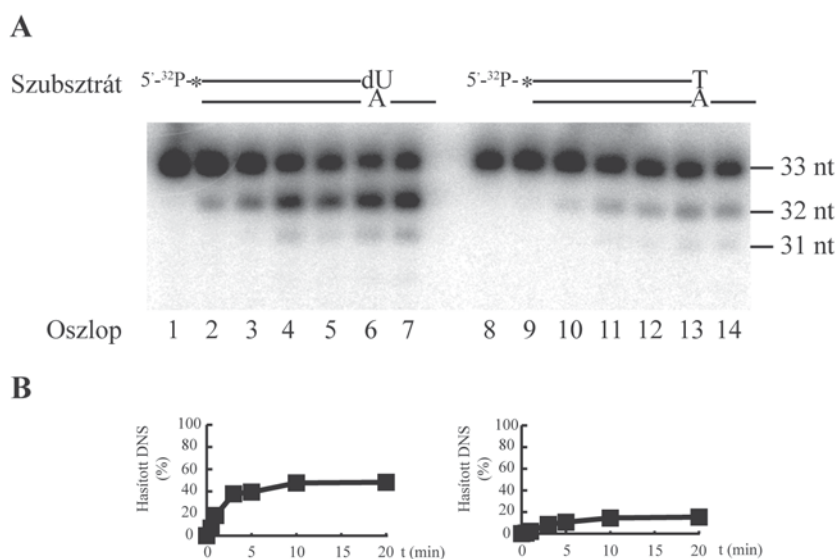
Ha igaz a feltételezésünk, hogy az Ape2 az új DNS szintézishez kapcsolt folyamatokban vesz részt, érdekes kérdés, hogy a hibásan beépült nukleotidokra mutat-e valamilyen preferenciát a 3'-5' exonukleáz aktivitása. Ezért megvizsgáltuk az Ape2 3'-5' exonukleáz aktivitását olyan DNS szubsztrátokon, amelyek 3' végén mind a 16 lehetséges bázis pár megtalálható (13. ábra). A kísérlet során egyenlő mennyiségű GST-Ape2-vel inkubáltuk a különböző duplaszálú szubsztrátokat. Az Ape2 minden esetben nagyobb preferenciával hasította a 3' végén hibás párosodást tartalmazó szubsztrátot (13. ábra 2. 4 -5; 8 -10; 12 -14; 17. 18. 20. oszlop), mint a helyes bázispárral rendelkezőt (13. ábra 3. 7. 15. 19. oszlop). A hasítás hatékonyságát kvantitatívan is meghatároztuk, ennek eredményét a 13. ábrán található oszlopdiagram mutatja. Az Ape2 eltérő hatékonysággal távolítja el a különböző nukleotidokat a 3' végről. Legnagyobb hatékonysággal a 3' végi adenint távolítja el, ezért ezen a példán keresztül mutatom be az Ape2 3'-5' exonukleáz aktivitásának a helyes bázispáron illetve mismatchen való működését. Ha a templát szál timinjével szemben található meg az adenin (13. ábra 3. oszlop), akkor mintegy négy – hatszor gyengébb aktivitást kapunk, mintha az adenin valamelyik másik bázissal szemben épülne be, amellyel nem képes a megfelelő bázispárosodásra (13. ábra 2. 4. 5. oszlop). Kísérleteink eredménye azt bizonyítja, hogy az Ape2 3'-5' exonukleáz aktivitása specifikus a 3' végén található mismatchekre.



13. Ábra: Az Ape2 3'-5' exonukleáz aktivitása különböző 3' véggel rendelkező DNS szubsztrátokon. Az összes lehetséges 3' végi bázispárosodást előállítottuk. Így minden egyes jelölt primer szubsztrát végéhez három hibás (2. 4 -5, 8 – 10, 12 – 14, 17 – 18 és 20. oszlop) és egy helyes bázispárosodást biztosító komplementer oligonukleotid (3. 7. 15. 19. oszlop) tartozik. Az oszlopdiagrammok az Ape2 adott szubsztrátra vonatkozó 3'-5' exonukleáz aktivitásának kvantitatív értékeit mutatják (3 kísérlet átlaga).

V.9 Az Ape2 specifikusan eltávolítja a 3' végre beépült dezoxi-uracilt

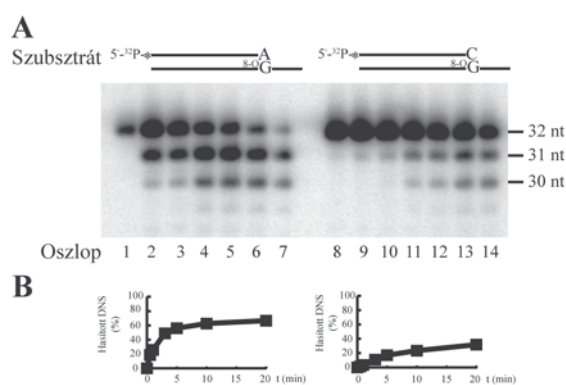
Egy korábbi publikációból ismerjük, hogy HeLa sejteket dezoxi-uridinnel kezelve, megnő az Ape2 fehérje mennyisége az új DNS-t szintetizáló helyeken (89). Ebből az eredményből kiindulva feltételeztük, hogy az Ape2 fehérje 3'-5' exonukleáz aktivitása talán a 3' végre beépült dezoxi-uracilok eltávolítását végzi. Ezért megvizsgáltuk *in vitro*, hogy az Ape2 fehérje 3'-5' exonukleáz aktivitása hogyan működik olyan DNS szubsztráton (5. ábra S5, S6), ahol a 3' végen az adeninnal szemben dezoxi-uracil található (14. ábra). Meghatároztuk az Ape2 fehérje 3'-5' exonukleáz aktivitásának enzimatis paramétereit mind az uracilt, mind a kontrollként használt, timint tartalmazó DNS szubsztrátra (2. táblázat 1. 2. sor). A reakció sebességét meghatározó paraméterben ($V_{(max)}$) a két szubsztrát között jelentős (mintegy tízszeres) különbséget figyeltünk meg. A másik jellemző paraméterben (K_M , a fél telítési szubsztrát koncentráció), amely az enzim szubsztrát asszociációjának és disszociációjának a jellemzője, nem találtunk szignifikáns különbséget. A két paraméter hányadosa ($V_{(max)}/K_M$) az enzimaktivitás hatékonyságának a jelzésére használható. Minél nagyobb ez a hányados, az adott enzim annál hatékonyabban működik. Ebben az összehasonlításban az Ape2 a dezoxi-uracilt tízszer jobban távolítja el a 3' végről, mint a kontrollként használt timint (2. táblázat 1. 2. sor).



14. Ábra: Az Ape2 3'-5' exonukleáz aktivitásának működése olyan DNS szubsztráton, amelynek 3' végén az adeninnal szemben dezoxi-uracil vagy timin található. (A) Azonos mennyiségű Ape2-vel inkubáltuk a DNS szubsztrátokat 0,5; 1; 3; 5; 10; 20 percig (2 – 7, 9 – 14 oszlop). (B) Az A pontban végzett kísérlet kvantitatív eredménye.

V.10 Az Ape2 specifikusan eltávolítja a 3' végre a templát szál 8-oxo-guaninjával szemben beépült adenint

A mitokondriumok normális metabolikus működése során felszabaduló reaktív oxigén gyökök folyamatosan indukálják az oxidált bázisok keletkezését, amelyek a leggyakoribb DNS hibák közé tartoznak. Az oxidált bázisok egyik nagy mennyiségben előforduló típusa a 8-oxo-guanin (8-oxoG). A 8-oxoG blokkolja a replikációs villát, mivel a DNS polimeráz- α csak kis gyakorisággal képes nukleotidot beépíteni ezzel a sérült bázissal szemben (92). *In vitro* vizsgálatokkal azt a meglepő eredményt mutatták ki, hogy azokban az esetekben, amikor a polimeráz- α áthalad a sérüléssel szembeni részen, az esetek 90%-ban adenint, vagyis hibás nukleotidot épít be a helyes citozin helyett (92). Ez a hiba, amennyiben nem javítódik azonnal, a későbbiekben mutációt okoz. Ennek az az oka, hogy a replikáció befejeződése után a kettősszálú DNS-en más javító mechanizmusok (elsősorban a BER) eltávolítják a 8-oxoG-t. Ez a nukleotid azonban eredetileg templát DNS szálon volt, ami miatt a hibásan beépült adeninnel szemben egy timin épül be, és nem az eredeti guanin. Így a GC bázispárból TA bázispár alakul ki (transzverzió). Mivel ez a folyamat erősen mutagén, megvizsgáltuk, hogy az Ape2 képes-e preferenciálisan eltávolítani a 8-oxoG-nal szembeni adenint a DNS szubsztrát 3' végéről (15. ábra), amely eseteket speciális DNS szubsztrátokkal modelleztünk (5. ábra S7, S8). Megvizsgálva az Ape2 3'-5' exonukleáz aktivitásának kinetikai paramétereit ezeknek a DNS szubsztrátoknak, azt az eredményt kaptuk, hogy a $V_{(max)}$ értékben jelentős (mintegy ötszörös) különbség figyelhető meg a két szubsztrát esetében (2. táblázat 3. 4 sor). Ugyanakkor a K_M értékek kismértékű eltérése megfigyelhető meg. Az eredményként kapott kinetikai paraméterek összehasonlítása alapján ($V_{(max)}/K_M$), azt a következtetést vonhattuk le, hogy az Ape2 nyolcszor jobban távolítja el a 8-oxoG-nal szembeni adenint a 3' végről, mint a citozint, tehát egyértelmű preferenciát mutat a mutagén párosodásra (2. táblázat 3. 4. sora).



15. Ábra: Az Ape2 3'-5' exonukleáz aktivitásának működése olyan DNS szubsztráton, amelynek 3' végén a 8-oxo-guaninnal szemben adenin vagy citozin található. (A) Azonos mennyiségű Ape2-vel inkubáltuk a DNS szubsztrátokat 0,5; 1; 3; 5; 10; 20 percig (2 – 7, 9 – 14 oszlop). (B) Az A pontban végzett kísérlet kvantitatív eredménye.

DNS szubsztrát	$V_{(\max)}$	K_m	$V_{(\max)}/K_m$
--- GGTACTCU --- CCATGAGATCA	$5,3 \pm 0,9159$	$20,19 \pm 4,132$	0,262
--- GGTACTCT --- CCATGAGATCA	$0,5147 \pm 0,1269$	$20,45 \pm 6,767$	0,025
--- TAGGTACA --- ATCCATGGTAT 8-oxo	$7,87 \pm 1,104$	$35,62 \pm 15,67$	0,221
--- TAGGTACC --- ATCCATGGTAT 8-oxo	$1,4078 \pm 0,3434$	$54,31 \pm 13,9$	0,026

2. Táblázat: Az Ape2 3'-5' exonukleáz aktivitásának kinetikai paraméterei az adenninal szembeni timin és dezoxi-uracil, valamint a 8-oxo-guaninnal szembeni adenin és citozin eltávolítására.

VI. Megbeszélés

VI.1 Az Ape2 fehérje enzimatis aktivitásai

Az Ape2 biokémiai jellemzéséhez klónoztuk, expresszáltuk majd tisztítottuk az Ape2 fehérjét. Összhangban az eddigi irodalmi adatokkal bakteriális expressziós rendszerben nem tudtuk tisztítani az Ape2 fehérjét (87), ezért az élesztő expressziós rendszer alkalmazása mellett döntöttünk. Az élesztő rendszerben sikerült expresszálni a fehérjét. A vad típussal párhuzamosan tisztítottuk a D277A pontmutánst is. A 277 aszparaginsav egyike azoknak a konzervált kétértékű kationt kötő aminosavaknak, amelyek szükségesek az II. típusú AP endonukleázok (Ape1, ExoIII) működéséhez (88;93). Ez a katalitikusan inaktív fehérje szolgált a későbbiekben kontrollként, hogy bizonyítsuk, hogy az általunk megfigyelt enzimaktivitás az Ape2 fehérjétől származik és nem valamilyen a tisztítás során a preparátumban maradt szennyező élesztő fehérjétől. A kísérleteink során az Ape2 fehérjének gyenge AP endonukleáz aktivitása volt. Ezzel szemben, mivel a D277A pontmutáns Ape2 fehérjével végzett kísérletekben az AP endonukleáz aktivitás nem volt megfigyelhető, egyértelműen bizonyítható, hogy ez az aktivitás az Ape2 sajátja. További kísérleteink során kimutattuk, hogy az Ape2 3'-foszfodiészteráz és 3'-5' exonukleáz aktivitásokkal is rendelkezik. Ezeket az aktivitásokat szintén nem tudtuk kimutatni a párhuzamosan tisztított D277A pontmutáns Ape2 preparátumban. Összehasonlítva az egységnyi Ape2 által egységnyi idő alatt elhasított szubsztrát DNS-ek mennyiségét megállapítottuk, hogy a 3'-foszfodiészteráz aktivitás egy, a 3'-5' exonukleáz aktivitás két nagyságrenddel volt erősebb, mint az AP endonukleáz aktivitás. Ezek az eredmények arra utalnak, hogy a humán Ape1 és Ape2 hasonló funkciómegosztást mutathat, mint az élesztő Apn1 és Apn2. Élesztőben az Apn1 hiánya miatt a sejt sokkal nagyobb érzékenységet mutat az AP helyek számának növekedésére, mint az Apn2 hiánya miatt, ugyanakkor az oxidatív károsodás utáni egyesszálú lánc-törés javításában már megközelítőleg egyenlő mértékben vesznek részt (68;93). Az Ape2 fő enzimatis aktivitásának, a 3'-5' exonukleáz aktivitásnak *in vivo* jelentőségéről eddig nem álltak rendelkezésre ismeretek. Munkánk során arra kerestük a választ, hogy ennek az aktivitásnak mi lehet az *in vivo* szerepe.

VI.2 Az Ape2 a PCNA-val együtt működik, ami stimulálja az Ape2 3'-5' exonukleáz aktivitását

Mivel az Ape2 PCNA kötő motívumot tartalmaz (89), megvizsgáltuk, hogy a PCNA milyen hatást gyakorol a humán Ape2 fehérjére. Eredményeink azt mutatták, a PCNA erősen stimulálja a 3'-5' exonukleáz aktivitást. Vizsgálataink igazolták, hogy a PCNA kötés az ami stimulálja az Ape2

3'-5' exonukleáz aktivitását, azáltal, hogy képesek voltunk olyan Ape2 pontmutánst előállítani, amely aktív volt, de a PCNA nem volt képes kifejteni rajta stimuláló hatását. Meglepő módon az Ape2 két funkcionális PIP motívumot tartalmaz, amelyek erőteljesen eltérnek a konszenzus szekvenciától. Ezek a szekvenciák kooperatívan működhetnek, mivel a két motívum egyikének inaktívvá tétele már gátolja a PCNA stimuláló hatásának kifejtését. Hogy nem az Ape2 teljes konformációjának megváltozása okozza ezt a hatást amellett több bizonyíték is szól. Az egyik, hogy a pontmutációtól nem változik meg az Ape2 enzimaktivitása. A másik bizonyíték lehet erre, hogy Xu és munkatársai hasonló peptidszekvenciáról kimutatták, hogy hatékonyan képes a PCNA-t kötni (38). Az irodalmi adatok (89) és az általunk kapott stimuláció arra utal, hogy az Ape2 fehérje *in vivo* a PCNA-val együtt, egy komplexben működik. Mivel a DNS polimerázok aktivitását is stimulálja a PCNA-val való kölcsönhatás (22;27-31;94), így nagyon valószínű, hogy az Ape2 fehérje a PCNA-n keresztül kapcsolódva egy komplexben található a DNS polimerázokkal. Ez az eredmény azt sugallja, hogy az Ape2 DNS szintézissel kapcsolt folyamatokban vesz részt, hiszen a PCNA-n keresztül valósul meg szinte az összes DNS szintetizáló folyamat mind a replikációban, mind a reparációban.

VI.3 Az Ape2 specificitást mutat a 3' végen található sérült vagy rosszul párosodott nukleotidokra

Mivel az Ape2 erős, és a PCNA által stimulált 3'-5' exonukleáz aktivitással rendelkezik, felmerül a kérdés, hogy vajon mutat-e ez az exonukleáz aktivitás valamilyen specificitást a 3' végen található rosszul párosodott bázisokra. Megvizsgáltuk, hogy az Ape2 fehérje milyen preferenciával hasítja a 3' végen található nukleotidot annak a függvényében, hogy ez a nukleotid létrehoz-e korrekt bázispárt a vele szemben lévő templát szálon található nukleotiddal, vagy nem. Eredményeink egyértelműen azt mutatták, hogy az Ape2 fehérje 3'-5' exonukleáz aktivitása specifikus a 3' végi mismatchekre, vagyis a korrekt bázispárok eltávolítását sokkal kisebb hatékonysággal végzi, mint a hibásan beépültekét. Ez a hasítási preferencia és az a tény, hogy az Ape2 *in vivo* a PCNA-val együtt működik, arra enged következtetni, hogy az Ape2 *in vivo* valamilyen proofreader funkciót láthat el. Számos olyan kis pontosságú DNS polimeráz ismert (TLS polimerázok, polimeráz- η), amelyek elvesztették saját 3'-5' exonukleáz aktivitásukat (22;24-26), ezért szükségük lehet egy proofreader alegységre. Ezért a továbbiakban érdemes megvizsgálni, melyek lehetnek azok a DNS polimerázok, amelyeknek az Ape2 potenciálisan a proofreadere lehet. A BER mechanizmusának keretein belül maradvá kézenfekvő megoldást kínálhat a polimeráz- η , hiszen ez az a DNS polimeráz, amely a short-patch BER-ben a DNS szintézist végzi, és elvesztette saját 3'-5' exonukleáz aktivitását. A

DNS polimeráz- α működése során egy egynukleotidos rés feltöltése zajlik. Így a DNS polimeráz- α feltételezett proofreader alegységnek egy olyan DNS szubsztráton kell dolgoznia, amely az eltávolítandó nukleotidtól 3' irányba egy bemetszést (nick-et) tartalmaz. Megvizsgálva az Ape2 szubsztrát specificitását azt az eredményt kaptuk, hogy a 3' végen bemetszést tartalmazó DNS szubsztráton az aktivitás a felére csökken a rést (gap-et) tartalmazó szubsztráthoz képest. Ezzel szemben az Ape1-ről korábban kimutatták, hogy gyenge 3'-5' exonukleáz aktivitása specificitást mutat a bemetszést tartalmazó DNS szubsztrátra, ezért feltételezhető, hogy az Ape1-nek és nem az Ape2-nek van szerepe a polimeráz- α pontosságának növelésében (64). Ezért azt feltételezzük, hogy az Ape2 3'-5' exonukleáz aktivitása nemcsak a BER-ben, hanem valószínűleg más, DNS polimeráz működésével kapcsolatos DNS hibajavításban is szerepet játszhat.

A TLS polimerázok szintén elvesztették önálló 3'-5' exonukleáz aktivitásukat, így lehetséges, hogy az Ape2-nek a TLS polimerázok proofreadereként működik. Ennek a feltételezésnek az alátámasztására vagy cáfolására nem áll rendelkezésre irodalmi adat. Ugyanakkor mivel mind az Ape2, mind a TLS polimerázok a PCNA-vel egy komplexben működnek, megvan a lehetőség arra, hogy az Ape2 3'-5' exonukleáz aktivitása befolyásolja a TLS polimerázok működését.

Gyakori hiba a DNS szintézis során, hogy a szabad nukleotid készletből károsodott nukleotid épül be a frissen szintetizálódó lánc 3' végére. A 3' végi sérült nukleotid gátolja a BER-ben a láncvégek ligálását (64), illetve csökkentheti a replikáció hatékonyságát, ezért szükség lehet egy mechanizmusra, amely a 3' végi sérült nukleotidok hatékony eltávolítását végzi. Erre a működésre jó jelölt lehet az Ape2 fehérje, mivel HeLa sejteket dezoxi-uridinnel kezelve megnő a PCNA-vel együtt működő Ape2 fehérje mennyisége (89). Ez arra utal, hogy az Ape2-nek lehet szerepe a 3' végi sérült nukleotidok eltávolításában. Eredményünk, miszerint a 3' végre beépült dezoxi-uracilt sokkal nagyobb affinitással távolítja el az Ape2, mint a kontrollként használt timint, bizonyítja ezt a feltételezést. Ugyanakkor mégis meglepő az, hogy az Ape2 3'-5' exonukleáz aktivitása a dUA és TA bázispárok között is különbséget tud tenni, hiszen ezekben az esetekben a szabad 3' végeken mind a helyes, mind a hibásan beépült nukleotid tökéletes bázispárosodásra képes, vagyis ebben az esetben nem áll fenn olyan jelentős strukturális különbség a két szubsztrát 3' vég között, mint a mismatchek esetén.

A 8-oxoG az egyik leggyakoribb külső károsító hatás nélkül is nagy mennyiségben kialakuló DNS hiba. Javításáért elsősorban a BER felelős, amelynek a 8-oxoG-ra való specificitását egy DNS glükóziláz, az OGG1 (oxo-guanin-glükóziláz 1) fehérje biztosítja. Az utóbbi időben kezdték el intenzíven tanulmányozni, hogy a BER-en kívül milyen reparációs mechanizmusok javíthatják még a 8-oxoG-t. Ezek a vizsgálatok mind arra az esetre vonatkoztak, amely során a szabad nukleotid

készletben keletkező 8-oxoG épül be a frissen szintetizálódó DNS szálba. A kísérletek során az Ape1 és Apn1 fehérjéket vizsgálva sikerült kimutatni, hogy az Ape1 és Apn1 fehérjék képesek eltávolítani a 8-oxoG-t és 8-oxoA-t a 3' végről (95). Ugyanakkor ezen vizsgálatok nem érintették azt a nagyon fontos kérdést, hogy a mutagén és nem mutagén bázispárosodás (a 8-oxo-guaninnal szembeni adenin és citozin eltávolítása) között megfigyelhető-e aktivitáskülönbség. Munkájuk azt bizonyítja, hogy a 8-oxoG-t jobban eltávolítják az általuk vizsgált fehérjék, mint a sérülésmentes guanint a szintetizálódó DNS 3' végéről. Ugyanakkor az *ogg1* mutáns és *ogg1* *apn1* kettősmutáns élesztők vizsgálatával kimutatták, hogy a II. típusú AP endonukleázoknak, jelen esetben az Apn1-nek szerepe van a 8-oxoG OGG1 független javításában (95).

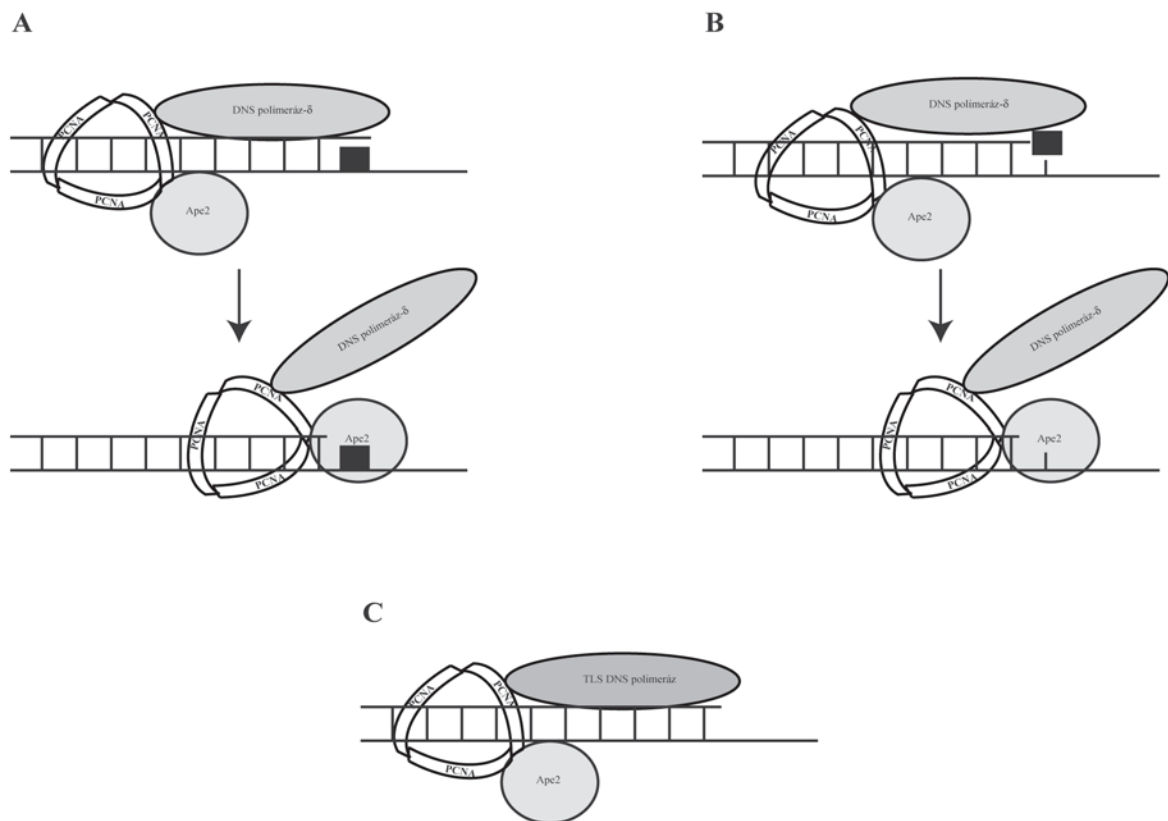
Ha a templát DNS szálon 8-oxoG sérülést találunk, akkor a replikációs komplex általában mutagén módon épít be nukleotidot a sérüléssel szemben. Ennek bizonyítéka, hogy a replikatív DNS polimeráz *in vitro* rendszerben csak kis hatékonysággal képes a 8-oxoG-nal szemben nukleotidot beépíteni és folytatni a DNS szintézist. Amennyiben nukleotidot épít be a sérüléssel szemben, az esetek 90%-ában adenint, vagyis rossz nukleotidot épít be (96). Ennek a jelenségnek *in vivo* sokkal nagyobb jelentősége lehet, mint annak a jelenségnek, amit az Ape1 és Apn1 fehérjék kapcsán vizsgáltak, vagyis amikor a 8-oxoG sérülést a frissen szintetizálódó láncba építi be a DNS polimeráz. A két folyamat ugyan látszólag hasonló, de a kétféle hibás 3' végi bázispár javítása között hatalmas jelentőségbeli különbség van, amit a 8-oxoG OGG1 függő, azaz a BER-en keresztüli javítása okoz. Ha a replikáció komplett, akkor a 8-oxoG mintegy 100%-ban a BER mechanizmusán keresztül javítódik. Ennek során a 8-oxoG kivágódik a kettősszálu hélixből, majd a keletkező rést helyére egy ép guanin épül be, így a hiba mutációmentesen tűnik el a DNS-ből, csak a BER mechanizmusának terhelését növeli. Ezzel szemben, ha a sérült nukleotiddal szemben épül be adenin, a BER akkor is a 8-oxoG-t ismeri fel, mint DNS hibát, javítja azt, aminek következtében egy transzverzió játszódik le, a GC bázispárból TA lesz. Ez a folyamat egy mutáció rögzüléséhez vezet. A 8-oxoG folyamatosan és nagy mennyiségben keletkezik mind a szabad nukleotid készletben mind a genomban. Éppen ezért ennek a hibának a replikáció során történő hatékony javítása (pontosabban a helyes nukleotid beépülésének biztosítása) a sejt genetikai stabilitásának megőrzése szempontjából szükséges. Éppen ezért valószínű, hogy elsősorban a TLS polimerázok végzik a 8-oxoG-nal szembeni DNS szintézist *in vivo* (a polimeráz- ϵ hibamentesen írja át ezt a sérülést is) (96), ugyanakkor valószínű, hogy a polimeráz- α *in vivo* szintén épít be nukleotidot a 8-oxoG-nal szemben. Az így keletkező mutagén bázispárok azonnali javítása elengedhetetlen a sejt számára.

Munkánk során egyértelműen bizonyítottuk, hogy az Ape2 3'-5' exonukleáz aktivitása preferenciálisan (mintegy nyolcszor jobban) hasítja a 8-oxoG-nal szemben beépült adenint, a

kontrollként használt citozinnal szemben. Ez a működés nagy jelentőséggel bírhat, mivel a replikatív polimeráz 8-oxoG-nal szembeni mutagén működésének gátlására, és így egy komoly mutáció forrás nagymértékű csökkentésére lehet ezáltal képes.

VI.4 Az Ape2 fehérje lehetséges szerepe a DNS reparációban

Az általunk felállított modellben az Ape2 fehérje szabályozza a DNS polimeráz- δ 8-oxoG-nal szembeni működésének hatékonyságát. A DNS polimeráz- δ működésének eredménye, hogy az esetek 90%-ában hibás nukleotidot (adenint) épít be a 8-oxoG-nal szemben. Ekkor kap szerepet az Ape2 fehérje (16. ábra A), amelyik a PCNA-n keresztül kapcsolódik a replikációs komplexhez, aktivizálódik, majd visszahasítja a sérüléssel szemben beépített adenint. Ezután a polimeráz- δ -nak lehetősége nyílik új nukleotidot beépíteni. Ha egy bizonyos időn belül a replikációs villa nem képes a sérülésen túljutni, akkor a sejtben működésbe lép egy mechanizmus, amely a replikatív polimerázt TLS polimerázra cseréli, így a transzléziós szintézis vagy a posztreplikációs reparáció mechanizmusán keresztül történik meg a hiba átírása.



16 Ábra: **Az Ape2 *in vivo* működésének modelljei.** (A) A DNS polimeráz- δ a PCNA-hez kötve végzi a replikációt. Ha a sérült nukleotiddal szemben (8-OG) hibás bázist épít be (adenint), az Ape2 3'-5' exonukleáz aktivitása révén eltávolítja a hibásan beépült nukleotidot. (B) A DNS polimeráz sérült nukleotidot épít be a frissen szintetizálódó lánc 3' végére. Az Ape2 3'-5' exonukleáz aktivitása eltávolítja a sérült nukleotidot, majd a DNS szintézis tovább folytatódik. (C) Az Ape2 a PCNA fehérjén keresztül egy komplexben található a TLS DNS polimerázokkal, és azok proofreader alegysége működik.

A genomikus DNS mellett a szabad nukleotid készlet is folyamatosan károsodik. Ezen károsodott nukleotidok közül számos képes a frissen szintetizálódó DNS lánc 3' végére beépülni. Az Ape2 szerepe lehet az, hogy ezeket a 3' végre beépülő sérült nukleotidokat eltávolítja (15. ábra B), így csökkentve a kettősszálú DNS-ben található sérült nukleotidok számát. Ennek a funkciónak a bizonyítására áll a legtöbb adat rendelkezésünkre, hiszen *in vivo* bemutatták, hogy ha a 3' végre sérült nukleotid épül be, megnő az Ape2 mennyisége a replikációs komplexben, valamint eredményeink is azt mutatják, hogy erre a sérülésre az Ape2 3'-5' exonukleáz aktivitása specifikus.

Feltételezésünk szerint az Ape2 TLS polimerázok proofreader alegységeként is működhet (15. ábra C). Az Ape2 fehérje mindenképpen jó jelölt erre a funkcióra, hiszen az egyetlen ismert 3'-5' exonukleáz, amely a PCNA-hez kapcsolva működik, valamint a TLS polimerázoknak nincs endogén 3'-5' exonukleáz aktivitásuk, ennek megfelelően *in vitro* a pontosságuk nagyon alacsony. Ennek a modellnek az alátámasztására csak néhány előzetes eredmény áll eddig rendelkezésünkre, de ezek alapján valószínű, hogy az Ape2-nek a TLS-ben is szerepe lehet. Ha az Ape2 valóban a TLS DNS polimerázok proofreader alegységeként működhet, akkor feladata valószínűleg kettős. Egyrészt, mint proofreader kompenzálja a TLS polimerázok alacsony pontosságát, másrészt, bár a sérüléssel szemben a mutagén működés hasznos, mert meggátolja a replikációs villa hosszan tartó blokkját, de a sérülés körüli ép nukleotidok átírásában már hátrányos lehet a sejt számára, így szükség lehet egy olyan mechanizmusra, ami meggátolja, hogy a TLS DNS polimerázok az ép nukleotidokkal szemben mutagén DNS szintézist folytassanak.

VII. Összefoglalás

Munkánk során klónoztuk, túltermeltettük és homogenitásig tisztítottuk az Ape2 fehérjét. Bizonyítottuk, hogy 3'-foszfodiészteráz aktivitása mellett gyenge AP endonukleáz aktivitással és nagyon erős 3'-5' exonukleáz aktivitással rendelkezik. Mivel az Ape2 3'-5' exonukleáz aktivitásának *in vivo* szerepe nem ismert ezért annak a kérdésnek a megválaszolását tűztük ki célul, hogy *in vivo* milyen reparációs utakban játszaht szerepet az Ape2 3'-5' exonukleázként, amellet hogy a BER-ben mint gyenge AP endonukleáz és mint 3'-foszfodiészteráz működik. Az Ape2 kölcsönhat a PCNA-val, és ez a kölcsönhatás stimulálja a 3'-5' exonukleáz aktivitást. Ezért joggal feltételezhető, hogy az Ape2 az új DNS szintézisével kapcsolatos folyamatokban játszhat szerepet. Az Ape2 3'-5' exonukleáz aktivitása specifikus a 3' végen található mismatch-ekre. Azonban nem csak a 3' végi mismatch-et, hanem a 3' végre beépült sérült bázisok eltávolítására is specificitást mutat, ami *in vivo* egyik fő funkciója lehet. A DNS polimeráz- α 8-oxoG-nal szemben erősen mutagénen működik. Az Ape2 specificitást mutat a 8-oxoG-nal szembeni adenin eltávolítására, ami feltételezi, hogy *in vivo* is szerepet játszhat a polimeráz- α 8-oxoG-nal szembeni mutagén működésének megakadályozásában.

VIII. A PhD értekezés összefoglalója

Bevezetés

A sejteket folyamatosan érik külső és belső hatások, amelyek károsítják a DNS-t, illetve a sejtmagban található szabad nukleotidokat. DNS sérülést okoz például a nap által kibocsátott UV sugárzás, radioaktív sugárzás, különböző kémiai anyagok vagy a sejt normális metabolikus működése során keletkező reaktív oxigén gyökök. A keletkező DNS hibákat folyamatosan javítani kell, ennek hiányában a felhalmozódó mutációk karcinogenezist indukálhatnak, vagy a sejt halálát okozhatják. Ezért a DNS reparációs rendszerek hibája számos súlyos genetikai betegség forrása lehet, amelyek egy-egy reparációs fehérje hibájának következményei. Ilyen betegségek például a Xeroderma pigmentosum, Cockayne szindróma, Trichotiodistrófia, Bloom szindróma, Werner szindróma, Ataxia telangiectasia, Fanconi anémia, örökletes nempolipózis vastagbél karcinóma. A daganatos megbetegedések hatékony gyógyításához meg kell ismernünk a DNS reparációs folyamatok mechanizmusát, amelyek megfelelő működése képes megakadályozni a karcinogenezist.

A DNS reparációnak számos útját ismerjük. Bár a reparációs utak nagymértékben átfednek, mégsem képesek teljes mértékben kompenzálni egyetlen út kiesését sem. Összefoglalóban két reparációs útról írok részletesen. A bázis excíziós reparáció (BER) elsősorban a kettősszájú DNS-en található hibás bázisok (oxidált, alkilált, dezaminált bázisok), abázikus helyek és az egyesszájú lánctörések javítását végzi. Ennek az útnak a pontos mechanizmusát a későbbiekben részletezni fogom. A felsorolt károsodások közül külső károsító hatás nélkül a legnagyobb számban az oxidált bázisok keletkeznek. A leggyakoribb oxidált bázisok az 5-hidroxi-citozin, a timin-glikol, a 8-oxo-adenin és a 8-oxo-guanin. Kialakulásukat *in vivo* elsősorban az OH gyökök indukálják. Ha a BER során a G1 fázisban nem javított, valamint a replikáció ideje alatt keletkező oxidált bázisok megjelennek a replikációs villában, akkor komoly mutációs forrássá válhatnak, aminek oka a replikatív polimeráz 8-oxoG-nal szembeni mutagén működése, amelyet a későbbiek során részletesen kifejtek.

A replikációs villában a DNS hibajavításért a posztreplikációs reparáció (PRR) és a transzléziós szintézis (TLS) felelős. A PRR mechanizmusa kevésbé ismert. Az eddigi ismereteink alapján olyan modell vált elfogadottá, amelyben a replikációs villában tempát szál váltás történik, amely során a villa visszafordul, amíg a sérült részt átírja, az ép szálról már megszintetizált DNS láncot használva templátnak. Ez a mechanizmus hibamentes átírást tesz lehetővé úgy, hogy a normális replikációs komplex végzi a DNS szintézist. A TLS mechanizmusa lényegesen jobban feltárt. Ebben

a folyamatban transzléziós (TLS) DNS polimerázok vesznek részt. Ezek a DNS polimerázok (az Y család és B család egyes tagjai) nem rendelkeznek a „klasszikus” DNS polimerázokra jellemző szekvenciamotívummal, ugyanakkor a térszerkezetük nagy hasonlóságot mutat. A lényegi különbség a szerkezetben az, hogy a TLS polimerázok aktív centruma nagyobb és flexibilisebb, így a sérült nukleotidok kötésére is alkalmas. A TLS polimerázok biokémiai jellemzőiben nagymértékű eltérést mutatnak a replikatív DNS polimerázoktól. Ezeknek kis processzivitású és kis pontosságú DNS polimerázok, ami azt jelenti, hogy bár sok hibát vétenek, de működésük csak egy rövid DNS szakaszra korlátozódik. A TLS és a replikatív polimerázok közös tulajdonsága, hogy *in vivo* a PCNA-hez (a replikációs komplex központi fehérjéje) kapcsolva működnek. Ugyanakkor a TLS polimerázok által átírt DNS szakasz hosszát (a TLS polimeráz processzivitását) nem növeli meg a PCNA-val való interakció, ellentétben a replikatív polimerázokkal. Éppen ezért valószínűleg a PCNA lehet az a felület, amelyen keresztül szabályozódik a replikatív és TLS DNS polimerázok cseréje a replikációs komplexben. A TLS polimerázok lehetnek hibamentes (error-free) és mutagén (error-prone) működésűek, amely tulajdonság elsősorban az éppen átírt DNS hiba és az átírást végző TLS polimeráz minőségétől függ. Az *in vitro* kísérletek azt mutatták, hogy a TLS polimerázok működése nem korlátozódik csak a DNS hibára, hanem ép templát szállal szemben is nukleotidokat építenek be. A működésük során fellépő nagy hibaszázalék miatt a sejt számára káros, ha a TLS polimerázok a DNS hibán áthaladva az ép templátzállal szemben további nukleotidokat építenének be. Ennek egyik gátja a TLS polimerázok alacsony processzivitása. Ugyanakkor a TLS polimerázok nem rendelkeznek saját 3'-5' exonukleáz (proofreader) aktivitással, ami az alacsony pontosságuk egyik oka a tág és flexibilis aktív centrum mellett, ezért feltételezhető, hogy *in vivo* létezik egy eddig azonosítatlan proofreader alegység, amely funkciója kettős lehet. Ennek egyrészt, mint egy proofreader, a helytelenül beépített nukleotidok eltávolításában és így a TLS polimerázok pontosságának *in vivo* növelésében lehet szerepe, másrészt elképzelhető, hogy 3'-5' exonukleáz aktivitása az a mechanizmus, amely csak a hiba átírására korlátozza a TLS polimerázot, meggátolva, hogy az ép templáttal szemben is működjön.

A PCNA (proliferating cell nuclear antigen) fehérje egy gyűrű alakú homotrimer molekula, amelyet a replikatív DNS polimeráz, a DNS polimeráz- α és DNS polimeráz- β processzivitási faktoraként írtak le. A PCNA homotrimer körbeöleli a DNS-t, és mint egy csúszó kapocs halad rajta. Az RFC (replikációs faktor C) fehérje képes a PCNA-t a DNS-re juttatni (kinyitni, majd újra összezárni) az RPA (replikációs protein A) jelenlétében. Az utóbbi évek eredményei azt mutatják, hogy a PCNA számos, a sejtciklusban (ciklin D, p21) és a DNS reparációban (XPG, UNG, transzléziós polimerázok) szerepet játszó fehérjével is kölcsönhatásba lép. Ezek alapján egyértelműnek tűnik,

hogy a PCNA központi szerepet játszik a DNS szintetizálás és javítás folyamataiban, valamint a sejtciklus szabályozásának is az egyik célpontja lehet.

A PCNA-vel kölcsönható fehérjék egy ún. PIP motívumon (PCNA interaction protein box) keresztül képesek kötni a PCNA-t. A PIP motívum konszenzus szekvenciája: Q-x-x-(h)-x-x-(a)-(a), ahol a (h) valamilyen hidrofób aminosav (L, I vagy M), míg az (a) aromás aminosavat jelöl (F, Y). Az x helyén bármilyen aminosav lehet. Azonban ismerünk számos PCNA-vel kölcsönható fehérjét (DNS polimeráz- α , ciklin D) amelyek nem tartalmazzak PIP motívumot. Ezek a fehérjék egy ún. KA motívumot tartalmazzak, ami kevésbé konzervált, és ezért szekvencia analízissel nehezen azonosítható.

A II. típusú AP endonukleázoknak két családja ismert. Az egyik család az Endonukleáz IV család, amelybe az *Escherichia coli* Endonukleáz IV és az élesztő Apn1 fehérje tartozik. A másik család az Exonukleáz III család, ahova az *E. coli* Exonukleáz III, az élesztő Apn2, és a humán Ape1 és Ape2 fehérjék tartoznak. Ezek közül a fehérjék közül az élesztőben az Apn1, emberben az Ape1 a fő AP endonukleáz. Ezekre a fehérjékre jellemző, hogy AP endonukleáz aktivitásuk a domináns. Ezzel ellentétben az élesztő Apn2 AP endonukleáz aktivitása gyenge, viszont erős 3'-5' exonukleáz aktivitása figyelhető meg, amelynek az *in vivo* szerepe ismeretlen.

A humán Ape2 egy újonnan felfedezett és kevésbé ismert tagja a II. típusú AP endonukleázoknak. Az Ape2 az élesztő Apn2 fehérjével külön alcsaládot képez a II. típusú AP endonukleázokon belül. Erre a csoportra jellemző, hogy az N-terminális katalitikus domén mellett tartalmazzak egy hosszú, C-terminális extenziót. Ez az extenzió az Apn1 és Ape1 fehérjékből hiányzik. Ez a C-terminális rész tartalmazza az Apn2 fehérje PCNA kötő motívumát, amely a PCNA IDCL (interdomain connector loop) régiójával lép kölcsönhatásba. Ez a kölcsönhatás stimulálja az élesztő Apn2 3'-5' exonukleáz aktivitását, amiből feltételezhető, hogy a két fehérje *in vivo* együtt működik. Az Apn2 PIP motívumának mutációja a kölcsönhatást megszünteti.

A humán Ape2 fehérje a legújabban felfedezett és még nagyon kevésbé ismert tagja a II. típusú AP endonukleázoknak. Bakteriális expressziós rendszerben próbálták tisztítani, ezidáig sikertelenül. Egy részlegesen tisztított Ape2 preparátumról leírták, hogy gyenge AP endonukleáz aktivitással rendelkezik. Ugyanakkor nem bizonyították, hogy ez az aktivitás az Ape2 sajátja, valamint nem jellemezték egyéb aktivitásait sem. Az Ape2 N-terminálisán egy mitokondriális lokalizációs szignál található, valamint kimutatták, hogy a sejtmag mellett nagy mennyiségben található a mitokondriumokban is. Mivel a mitokondrium saját genommal (mtDNA) rendelkezik, feltételezhető, hogy az Ape2-nek a mitokondriális genom integritásának megőrzésében is szerepe lehet. A mitokondriumokban a DNS oxidatív károsodása a leggyakoribb, a normális metabolikus működés

során folyamatosan keletkező, nagy mennyiségű reaktív oxigéngyökök miatt, amik folyamatosan károsítják a mtDNS-t a bázisok oxidálásával (pl. 8-oxo-guanin) és egyesszálú lánctörések generálásával. Ezért joggal feltételezhető, hogy az Ape2 fehérjének az oxidatív DNS károsodások javításában kiemelt szerepe lehet. A mitokondriális lokalizáció jelenlétének ellenére az Ape2 főleg nukleáris lokalizációt mutat, amelyet a fehérje C-terminálisa határoz meg. Az Ape2 tartalmaz PCNA kötő motívumot, valamint kimutatták, hogy *in vivo* bizonyos esetekben egy komplexben találhatók. Kimutatták, hogy az Ape2 hiányos egerek érésben levő T limfocitáinak sejtciklusában G2/M blokk figyelhető meg, valamint az Ape2 mRNS-ének expressziós maximuma az S fázisban található. Ezekből az adatokból egyértelműen az következtethető, hogy az Ape2 jelentős sejtmagi szerepet lát el a sejtciklus S fázisában, aminek az egyik lehetséges módja az új DNS szintézissel járó folyamatokban való részvétel. Az Ape2 *in vivo* jelentőségét tovább erősíti az Ape2 knock-out egéren megfigyelhető tulajdonságok: a növekedési rendellenességek, az érésben lévő limfociták sejtciklusában bekövetkező G2/M blokk, a vérképzés hibái. Annak a kérdésnek a megválaszolásához, hogy vajon ezeknek a hibáknak a hátterében milyen folyamatok húzódnak meg, szükség van az Ape2 fehérje enzimatis aktivitásainak jellemzésére.

Célkitűzések

Célul tűztük ki, hogy biokémiailag jellemezzük a humán Ape2 fehérjét, és ezen keresztül vizsgáljuk a DNS reparációban betöltött szerepét.

Ennek során megvizsgáltuk, hogy az Ape2 rendelkezik-e a II. típusú AP endonukleázokra jellemző enzimaktivitásokkal, úgymint az AP endonukleáz, a 3'-foszfodiásteráz és 3'-5' exonukleáz aktivitás.

Célunk volt az *in vitro* vizsgálatok során meghatározott fő enzimatis aktivitás, a 3'-5' exonukleáz aktivitás további jellemzése és vizsgálata, amely megadhatja a választ arra a kérdésre, hogy mi az Ape2 *in vivo* funkciója.

Vizsgáltuk:

- a 3'-5' exonukleáz aktivitás szubsztrátspecifitását
- az Ape2 és a PCNA fehérje kölcsönhatása hogyan befolyásolja az Ape2 3'-5' exonukleáz aktivitását
- az Ape2 fehérje 3'-5' exonukleáz aktivitásának működését mismatch-et és helyes bázispárt tartalmazó 3' végen
- az Ape2 3'-5' exonukleáz aktivitása hogyan viselkedik azokban az esetekben, ha a szubsztrát DNS-en *in vivo* gyakran előforduló DNS sérülések találhatók.

- Vizsgáltuk az Ape2 3'-5' exonukleáz aktivitását olyan DNS szubsztráton, amelynek 3' visszahúzódó végén egy dezoxi-uracilt helyeztünk el. Ebben a kísérleti elrendezésben a frissen szintetizálódó DNS lánc 3' végére beépült sérült nukleotid eltávolításának hatékonyságát vizsgáltuk.
- Vizsgáltuk az Ape2 3'-5' exonukleáz aktivitását olyan DNS szubsztráton, amely a replikatív DNS polimeráz hibával szembeni mutagén működését modellezi. Ebben a kísérleti elrendezésben olyan szubsztrát DNS-t terveztünk használni, amely a 3' végén a templát szálon egy 8-oxo-guanint tartalmazott, vele szemben pedig egy adenint

Eredmények és összefoglalás

Klónoztuk, expresszáltuk és homogenitásig tisztítottuk a humán Ape2 fehérjét. Ezáltal lehetőségünk nyílt vizsgálni a fehérje enzimatiszus aktivitásait, és annak *in vivo* funkcióit. Megállapítottuk, hogy az Ape2 mind a három, a II. típusú AP endonukleázok családjára jellemző enzimaktivitással: az AP endonukleáz, a 3' foszfodiészteráz és 3'-5' exonukleáz aktivitással rendelkezik. Hogy bizonyítsuk, hogy ez az aktivitás az Ape2 fehérjétől származik készítettünk egy Ape2 pontmutánst (D277A), amely szekvenciahomológiák alapján feltételezhetően katalitikusan inaktív. Mivel ez a pontmutáns Ape2 fehérje nem mutatta a vad típusú Ape2-nél megfigyelt enzimaktivitásokat, ezért a vad típussal kapott aktivitások az Ape2 fehérjétől származtak. Ezek közül az aktivitások közül a 3'-5' exonukleáz aktivitást találtuk dominánsnak. Azért ezt az aktivitást vizsgáltuk tovább, mivel ennek lehet a legnagyobb jelentősége a sejtek számára. Megvizsgáltuk hogy hogyan változik az Ape2 3'-5' exonukleáz aktivitása különböző DNS szubsztrátokon. Megállapítottuk, hogy egyesszálú és 3' túlnyúló végű DNS szubsztráton nem működik az Ape2 3'-5' exonukleáz aktivitása, csak tompa véget és 3' visszahúzódó véget tartalmazó DNS szubsztráton. Az Ape2 a II. típusú AP endonukleázok családjába tartozik, amely fehérjék a BER folyamataiban vesznek részt. Ezért megvizsgáltuk, hogy az Ape2-nek lehet-e szerepe a BER-ben mint 3'-5' exonukleáz. A BER-ben olyan 3' visszahúzódó végű DNS szubsztrát található, amely mellett 3' irányban egy bemetszés (nick) helyezkedik el. Megvizsgáltuk, hogy az Ape2 3'-5' exonukleáz aktivitását befolyásolja-e a 3' irányban található bemetszés vagy rés (gap) és a rés mérete. Eredményeink szerint az Ape2 aktivitása a bemetszést tartalmazó DNS szubsztráton felére csökken a szabad 3' visszahúzódó véget tartalmazóhoz képest. Ugyanakkor a rés, és a rés hossza nincs hatással az Ape2 3'-5' exonukleáz aktivitására. Ennek a kísérletnek az alapján negállapíthatjuk, hogy az Ape2 3'-5' exonukleáz aktivitása, nem mutat preferenciát a BER-ra, ezért elképzelhető,

hogy az Ape2 3'-5' exonukleáz aktivitása nem a BER-hoz kapcsolt, hanem más DNS reparációs úthoz.

3' visszahúzódnak véget találunk minden olyan helyen, ahol új DNS szintézise folyik. Ezeknek a szintézisének a központi szabályozó fehérjéje a PCNA. Ez a homotrimer gyűrű alakú molekula, mint egy kapocs csúszik a DNS-en, és biztosítja a DNS szintézisben és javításban részt vevő fehérjéknek a felületet, hogy a DNS közelébe kerülhessenek. Ismert, hogy az Ape2 és a PCNA kölcsönhatásba lép egymással, ezért megvizsgáltuk, hogy ez a kölcsönhatás megváltoztatja-e az Ape2 enzimikus aktivitását. Kísérleteink eredménye szerint az PCNA drámai módon megnöveli az Ape2 3'-5' exonukleáz aktivitását. Tsuchimoto és munkatársainak közleménye tartalmazta az Ape2 szekvenciájában található potenciális PCNA kötő helyet. Ezért pontmutánst készítettünk erre a PCNA kötő helyre (Y396A F397A) azért, hogy bizonyítsuk, hogy az aktivitásnövekedést a PCNA-val való kölcsönhatás okozta, valamint, hogy ez a PCNA kötő hely funkcionális, vagyis ténylegesen ez a szekvenciamotívum felelős az Ape2 és a PCNA kölcsönhatásáért. Kísérletünk azt a meglepő eredményt adta, hogy ezzel a pontmutációval nem voltunk képesek megszüntetni az Ape2 és a PCNA közötti kölcsönhatást. Az Ape2-t részletes szekvenciaanalízisnek vetettük alá, amely során sikerült két további lehetséges PCNA kötő motívumot izolálni. Elkészítettük a lehetséges PCNA kötő motívumokban a helyekben pontmutáns Ape2 fehérjéket (F492A Y493A és F511A F512A). Ezek a pontmutánsok mindegyike képes volt a PCNA aktivitást stimuláló hatását megszüntetni, ellentétben a korábban publikált motívummal. A fenti kísérleteknek az alapján bizonyítást nyert, hogy az Ape2 és a PCNA fehérje közötti kölcsönhatás felelős az Ape2 3'-5' exonukleáz aktivitásának megnövekedéséért, valamint feltételezhető, hogy az Ape2 C-terminálisán azonosított két PCNA kötő motívum felelős a PCNA megkötéséért, valamint ezek a motívumok feltehetően egymással kooperatív módon működnek.

Megvizsgáltuk, hogy a szabad 3' végen található mismatch-ek milyen hatást gyakorolnak az Ape2 3'-5' exonukleáz aktivitására. Elkészítettük mind a 16 lehetséges DNS szubsztrátot, amelyek a 3' végen mind a 16 lehetséges bázispárosodást tartalmazzák. Ezeknek a szubsztrátoknak a vizsgálatával sikerült kimutatni, hogy az Ape2 fehérjének egy proofreader szerű 3'-5' exonukleáz aktivitása van, amely tulajdonság alapján feltételezhető, hogy az Ape2 *in vivo* valamilyen DNS szintézis során, egy DNS polimeráz proofreader alegysége lehet. Számos DNS polimeráz ismert, amelynek nincs saját 3'-5' exonukleáz aktivitása.

Ezek közül az egyik legkézenfekvőbb lehetne a DNS polimeráz- α , a BER DNS polimeráza. Korábbi vizsgálataink azonban arra engednek következtetni, hogy az Ape2 nem a BER-ban működik mint 3'-5' exonukleáz, ezért valószínűleg nem a DNS polimeráz- α proofreadere. A TLS DNS

polimerázok sem rendelkeznek önálló 3'-5' exonukleáz aktivitással, viszont alacsony pontosságuk miatt könnyen elképzelhető, hogy *in vivo* olyan fehérjekomplexek részei, amelyben proofreader is található. Hogy az Ape2 fehérje ez a feltételezett proofreader vagy nem, arra a közeljövőben további kísérleteket tervezünk végezni.

A DNS szintézis során azonban nem csak mismatchek jelenhetnek meg a szabad 3' végén, hanem olyan 3' végi bázispárok is, amelyeken ugyan a bázispárosodás tökéletes, de az egyik bázis károsodott. Ezért megvizsgáltunk néhány modell DNS szubsztrátot, amelyeken a 3' végen valamilyen DNS sérülés helyezkedett el.

Az egyik esetben a 3' végen a templát adeninnel szemben nem egy timint, hanem egy dezoxi-uracilt építettünk be. Ez a hiba *in vivo* is előfordul, valamint számos kemoterápiás szer hatásmechanizmusa alapul azon, hogy a gyorsan osztódó sejtek DNS-ébe minél nagyobb mennyiségű dezoxi-uracilt építsenek be. Az Ape2 specificitást mutatott a dezoxi-uracilt tartalmazó DNS szubsztrátra, mivel nyolcszor hatékonyabban hasította le a 3' végről a dezoxi-uracilt, mint a kontrollként használt timint. Ezért elképzelhető, hogy az uracil beépülésen alapuló kemoterápiás szerek esetében az Ape2, a mutagén hatás szupresszáálásában és így a kemoterápia hatékonyságának csökkentésében vehet részt.

A másik modell szubsztrátunk egy *in vivo* nagy gyakorisággal előforduló, erősen mutagén DNS károsodással foglalkozik. A 8-oxoG az egyik leggyakoribb spontán előforduló DNS hiba. A replikációs villában is gyakran megtalálható, ahol a replikatív DNS polimeráz csak kis hatékonysággal képes átírni. Azonban amikor ez az átírás megtörténik, a replikatív DNS polimeráz a 8-oxoG-nal szemben az esetek 90%-ában adenint épít, nem a helyes citozint. A kettősszalú DNS-ben ezután a 8-oxoG kerül kijavításra, így a GC bázispárból egy TA bázispár keletkezik (traszverzió). Ennek a működésnek a megakadályozása nagymértékben csökkentheti a replikáció során keletkező transzverziókat, így segít a genom stabilitásának megőrzésében. A modell DNS szubsztrátunk esetében az Ape2 3'-5' exonukleáz aktivitása révén a 8-oxoG-nal szembeni adenint tízszer hatékonyabban távolítja el, mint a kontrollként használt citozint. Ezek alapján feltételezhető, hogy az Ape2 *in vivo* erősen antimutagén hatású.

Munkánk során klónoztuk expresszáltattuk és homogenitásig tisztítottuk az Ape2 fehérjét. Kimutattuk, hogy AP endonukleáz, 3' foszfodiészteráz és 3'-5' exonukleáz aktivitással rendelkezik. Ezek közül a 3'-5' exonukleáz aktivitás a domináns. Kísérleteink alapján azt feltételezzük, hogy az Ape2 fehérje *in vivo* egy proofreader 3'-5' exonukleáz, amely a PCNA-hez kapcsolódva antimutagén működése révén őrzi a genomban található információ épségét.

IX. Summary of the Ph.D thesis (angol nyelvű összefoglaló)

Introduction

Cellular DNA is subject to attack by a variety of agents of exogenous and endogenous origins. Oxidative attack on DNA by free radical species happens continuously during normal cellular metabolism, generating abasic sites and DNA strand breaks with modified 3'-termini, such as 3'-phosphate or 3'-phosphoglycolate (3'-PG). Abasic (AP) site, which is one of the most common lesions that arise in cellular DNA, can also be formed due to the action of DNA glycosylases on modified bases or by spontaneous base hydrolysis. It has been estimated that as many as 10000 bases are lost spontaneously in a mammalian cell per day. DNA strand breaks with blocking 3'-termini can also arise due to the -lyase activity of some DNA glycosylases. The non-coding AP-sites as well as modified 3'-DNA ends are inhibitory to synthesis by DNA polymerases (Pols), or if bypassed, are highly mutagenic; consequently, their repair is essential for retaining the stability of the genome.

AP sites and single strand DNA breaks with 3' modified termini are repaired mainly by the base excision repair (BER) system. In BER, class II AP endonucleases play a central role by incising the DNA 5' to AP sites to generate accessible 3'-OH termini prior to repair synthesis. In addition, several class II AP endonucleases are able to function in the removal of 3'-blocking termini thereby generating accessible 3' DNA ends for repair synthesis by DNA polymerases.

Class II AP endonucleases have been classified into two families, the exonuclease III (ExoIII) and endonuclease IV (EndoIV) families, based on their homology to the two *Escherichia coli* enzymes. In *E. coli* the main AP endonuclease is ExoIII representing 90% of the cellular AP endonuclease activity, while Endo IV accounts for 10% of the total activity (97). In *Saccharomyces cerevisiae*, the Apn1 and Apn2 proteins represent the EndoIV and the ExoIII family, respectively. Apn1 exhibits a strong AP-endonuclease activity and accounts for more than 90% of the total AP endonuclease activity in yeast cells. In contrast, the Apn2 protein has only a weak AP endonuclease activity but exhibits a strong 3'-exonuclease and 3'-phosphodiesterase activities. The functional consequences of the enzymatic activities of Apn1 and Apn2 is indicated by that the *apn1Δ* strain displays a much higher level of sensitivity to the alkylating agent methyl-methanesulfonate (MMS) than the *apn2Δ* strain; in contrast, neither of the single mutant strains, only the *apn1Δapn2Δ* double mutant showed sensitivity to the oxidative agent H₂O₂ (98). These observations indicate that in *S. cerevisiae* Apn1 has a more prominent role in the repair of AP sites than the Apn2, whereas for the

processing of 3' oxidatively damaged DNA termini Apn1 and Apn2 contribute equally. Contrary to these findings, in *Schizosaccharomyces pombe*, which is generally believed to be phylogenetically closer to mammalian cells than *S. cerevisiae*, Apn2 provides the major AP-endonuclease activity while the Apn1 serves only as a back-up activity.

In humans, EndoIV homologues are not known, but two ExoIII family proteins, Ape1 and Ape2, have been identified. Ape1 exhibits robust AP endonuclease activity, which accounts for more than 95% of the total cellular activity, and Ape1 is considered to be the major AP endonuclease in human cells. It also possesses 3'-phosphodiesterase and 3' exonuclease activities that are about two orders of magnitude less efficient than its AP endonuclease activity.

The role and the biochemical properties of Ape2 have not been ascertained yet. This is largely due to the difficulty in the purification of human Ape2 as its overexpression causes extreme cytotoxicity in *E. coli*. A partially purified sample of human Ape2 has been shown to exhibit a weak AP endonuclease activity. Its limited AP-endonuclease activity taken together with the fact that in human cells Ape1 accounts for more than 95% of the total AP endonuclease activity indicates that human Ape2, similarly to its *S. cerevisiae* homologue may play only a limited role as an AP endonuclease. Also, a novel role of Ape2 is suggested by recent studies that showed that APE2-null mice have a growth retardation phenotype which is accompanied by a G2/M arrest of proliferating lymphocytes, indicating that Ape2 is required for proper cell cycle progression. In addition, Ape2 has been shown to localize not only to the nucleus but to some extent to the mitochondria, in which it may help to maintain the function and integrity of mitochondrial DNA, even if threatened by the attack of reactive oxygen species produced during oxidative phosphorylation. These observations strongly suggest that the function of Ape1 and Ape2 proteins differs considerably in human cells.

To shed more light on the role of human Ape2, we have purified recombinant Ape2 from yeast, and characterized it biochemically. Here, we report novel enzymatic activities for human Ape2. We find that recombinant Ape2 exhibits only a weak AP-endonuclease activity; however, it shows strong 3'-5' exonuclease and 3'-phosphodiesterase activities. Also, we show that human Ape2 is able to remove preferentially mismatched and mutagenic paired 3'-nucleotides from DNA. Additionally, we demonstrate that PCNA stimulate the Ape2 3'-5' exonuclease activity. Based on these findings, we discuss a possible role for Ape2 in processing 3'-damaged termini or 3'-mismatched nucleotides.

Aims

In our study, our goal was the purification and *in vitro* characterization of the human Ape2 protein. In particular, our aim was to determine the enzymatic activities of the Ape2, and through these activities to gain insight into the biological functions of the Ape2 in DNA repair.

Results

The Ape2 cDNA was PCR amplified from a human cDNA library followed by cloning it in frame downstream of the GST gene in a yeast expression vector. We also made a similar construct expressing the Ape2D277A protein containing a point mutation at the D277 residue, which corresponds to a conserved metal binding site in the active centre of class II AP endonucleases. We expected this mutation to render Ape2 catalytically inactive. The resulting GST-Ape2 fusion proteins were purified from a protease-deficient *S. cerevisiae* strain on Glutathione-Sepharose beads.

To examine whether the purified recombinant Ape2 has an intrinsic AP-endonuclease activity, we assayed Ape2 using a 75-nt duplex DNA substrate, in which the 5'-³²P-end labelled strand contained a single abasic site at position 31 from the 5'-end. Incubation of Ape2 with the 75-nt DNA substrate generated a 30-nt labeled oligomer indicating that Ape2 like other class II AP-endonucleases incised the DNA 5' to the AP site. Using the Ape2 D277A mutant protein in the same assay we could not detect any incision of the DNA substrate confirming that the D277A mutation indeed rendered Ape2 catalytically inactive and, that the observed AP endonuclease activity is intrinsic to Ape2. However, Ape2 is a weak AP-endonuclease indicated by that even at optimal NaCl concentration Ape2 incised only seven percent of the DNA substrate despite its two and half fold molar excess over DNA substrate.

When we examined the AP endonuclease activity of Ape2 in a buffer containing no NaCl, we noticed the gradual shortening of the 75-mer template that indicated an exonucleolytic digestion of the DNA from the 3' end. To determine whether the observed 3'-5' exonuclease activity was intrinsic to Ape2, or due to an exonuclease contamination of our protein sample, we assayed the wild type and active centre mutant Ape2 D277A proteins on a double-stranded DNA substrate containing a 5'-³²P-labeled strand with recessed 3' terminus. Incubation of increasing amount of Ape2 with this DNA substrate generated a series of smaller products, indicating that Ape2 exonucleotically digested the DNA from the 3' terminus. In contrast, the D277A active centre mutant Ape2 did not show any 3'-5' exonuclease activity demonstrating that the observed robust 3'-5' exonuclease activity was intrinsic to the Ape2 protein. Importantly, when the DNA substrate was in two-fold molar excess over Ape2, under optimal reaction conditions Ape2 hydrolyzed nearly hundred

per cent of the exonuclease substrate and only seven per cent of the AP endonuclease substrate. Therefore Ape2 is dominantly a 3'-5' exonuclease.

Next we tested whether Ape2 is also able to remove 3'-blocking termini. For this we constructed a DNA substrate by annealing a 70-nt long oligonucleotide to a 35-nt oligomer containing a 3'-PG terminus. Enzymatic removal of the 3'-PG results in a 3'-hydroxyl terminus (3'-OH), and 3'-PG is released in the form of phosphoglycolic acid. The 3'-OH group confers lower electrophoretic mobility to the 35-nt oligomer on a denaturing polyacrylamide gel. Incubation of Ape2 with the PG-containing DNA substrate resulted in the appearance of a lower mobility band on the gel, which indicated that Ape2 had a 3'-phosphodiesterase activity. Unlike the wild type protein, the Ape2 D277A mutant did not exhibit such an activity. These results indicate that the Ape2 protein has a 3'-phosphodiesterase activity.

To characterize further Ape2 exonuclease, first we examined for its optimal reaction conditions. The exonuclease activity of Ape2 was strongly dependent upon metal ion. Ape2 was about five fold more active in the presence of manganese than of magnesium ion. Addition of salt inhibited the exonuclease activity, and at 100 mM NaCl concentration Ape2 exhibited only twenty percent of its exonuclease activity measured in buffer containing no salt, and in the presence of 200 mM salt almost no exonuclease activity could be detected. The Ape2 showed optimal activity in the pH range of 6.0 to 8.0.

To determine the DNA substrate requirement for the exonuclease activity, we compared the exonuclease activity of Ape2 for its ability to hydrolyze single-stranded DNA, blunt-ended duplex DNA, partial DNA duplexes with either a protruding or a recessed 3'-terminus, or a single nucleotide gap containing heteroduplex DNA. Ape2 exhibited the strongest exonuclease activity on a recessed 3'-end containing partial DNA duplex and fairly strong activity on a single nucleotide gap containing heteroduplex DNA. In addition, Ape2 also exhibited exonuclease activity on blunt-ended substrate. However, Ape2 showed only residual activity on single stranded DNA and protruding 3'-terminus.

Short-patch base excision repair proceeds via a nick and a single nucleotide gap containing heteroduplex DNA. To examine whether Ape2 has any preferences for these DNA substrates, we compared the exonuclease activity of Ape2 on a nick and 1, 2, 3, or 4-nt long gap containing DNA duplexes. Our results revealed that Ape2 exonuclease had two-fold stronger activity on a single nucleotide gap containing substrate than on a nicked DNA, and increasing the gap size from 1-4 nucleotides did not make significant difference.

To examine the effect of base-base hydrogen bounding at the primer-template junction on the exonuclease activity of Ape2, we assayed Ape2 on various combinations of recessed DNA with

3'-mispairs as substrates. Quantitation revealed that Ape2 removed 3' mismatched nucleotides two to forty-fold more efficiently than those matched correctly. For example, Ape2 had a very limited activity on a 3' recessed DNA duplex containing a matched 3'A opposite from a template T, however it exhibited a strong nuclease activity on a DNA containing unmatched 3' A opposite from G, A, or C. From these experiments we conclude that Ape2 exonuclease has a significant preference for mispaired nucleotides at the recessed 3'-end of DNA.

Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) is a highly conserved eukaryotic homotrimeric protein that assembles around the DNA to form a sliding clamp and acts as a processivity factor for the replicative DNA polymerase. PCNA interacts with a large variety of proteins involved in DNA replication, DNA repair, and cell cycle control. More recently, it has been shown that PCNA interacts with the TLS polymerases and yeast Apn2, and that Ape2 and PCNA are in the same protein complex in human cells. Based on these observation, we hypothesized, that Ape2 and PCNA directly interact, and PCNA modifies the enzymatic activities of Ape2. We focused mainly how the PCNA modifies the 3'-5' exonuclease activity of the Ape2. Addition of the PCNA in our standard Ape2 exonuclease assay increased dramatically the 3'-5' exonuclease activity of the Ape2. To verify this result, we decided to determine the PCNA binding site of the Ape2. We found three putative PCNA binding motifs in the Ape2 sequence, which can be responsible for the Ape2 PCNA interaction. We have made point mutations in these PCNA binding motifs (Y396A F397A, F492A Y493, F511A F512A). In the standard exonuclease assay all mutant proteins showed the same activity as the wild type Ape2. After the addition of the PCNA to the exonuclease reaction only one mutant (Y396A F397A mutant) showed the same increased 3'-5' exonuclease activity as the wild type Ape2. The other two mutants (F492A Y493, F511A F512A) were defective in this stimulation. This result supports that the PCNA binding increases the 3'-5' exonuclease activity of the Ape2, and it suggests that the Ape2 has two PCNA binding motifs which work cooperatively.

Tutshimoto at all described that the amount of Ape2 increased in the replication fork after desoxy-uridine treatment. Therefore, we examined the 3'-5' degradation of recessed end heteroduplex DNA containing either thymine or desoxy-uracil on the 3' end. Ape2 had a very weak activity on the thymine containing substrate DNA, but it had a robust activity on the desoxy-uracil containing substrate DNA. To characterize this difference we determined the kinetic parameters of the 3'-5' exonuclease activity on the thymine and desoxy-uracil containing DNA substrate. The comparison of the V_{max}/K_m values showed that the desoxy-uracil substrate is preferred to thymine substrate.

Endogenous oxidative DNA lesions are most abundant and inevitable as cells generate reactive oxygen species through aerobic respiration. The occurrence of oxidized bases in DNA can result

from either direct oxidation or misincorporation of oxidized deoxyribonucleosid monophosphate by DNA polymerases from the nucleotide pool. These oxidized bases are mutagenic and therefore must be removed by an efficient DNA repair processes. During the replication pol α bypasses the 8-oxoG lesion inefficiently and an adenine is preferentially incorporated opposite 8-oxoG. To achieve a lower mutation rate, the mispaired adenine must be eliminated. One possible way is that the Ape2 exonuclease removes this mutagen adenine. Therefore we tested how the Ape2 acts on the DNA substrates which contain on the 3' end an A:8-oxoG and C:8-oxoG base pair. To see the difference between them we determined the kinetic parameters and the V_{max}/K_m values. In our experiment the Ape2 cleaved the adenine 8.5 times better than it cleaved the cytosine opposite the 8-oxoG. This result indicates that the 3'-5' exonuclease activity of Ape2 can provide an efficient way to decrease the mutation rate during the replication of 8-oxoG lesion containing DNA.

Conclusions

In this study, we have clarified the enzymatic activities of human Ape2 and give some suggestion for its functional importance. Ape2 is a multifunctional enzyme, which has only a weak AP endonuclease, a fairly strong 3'-phosphodiesterase, but a robust 3'-5' exonuclease activity. Importantly, we reveal that the Ape2 exonuclease is most active on 3'-recessed heteroduplex DNA and is able to remove mismatched nucleotides preferentially.

Previously, Ape2 has been purified only partially due to its insolubility and its cytotoxicity on the *E. coli* and it has been shown to possess a very weak AP-endonuclease activity. In agreement with that study, our attempt to purify active recombinant Ape2 from *E.coli* was not successful. However, we managed to overcome the problem by overexpressing Ape2 in fusion with GST in the yeast *S. cerevisiae*. To confirm that the observed 3'-5' exonuclease, 3'-phosphodiesterase, and the extremely weak AP-endonuclease activities are intrinsic to Ape2, we also purified a mutant Ape2 protein, in which we altered the conserved Asp277 residue to Ala. This amino acid in Ape2 is equivalent to residues Asp328 in *S. cerevisiae* Apn2, and Asp283 in human Ape1, which have been shown to be involved in metal binding. As expected, the Ape2 D277A protein did not show activity in any of the enzymatic assays thereby confirming that the detected AP-endonuclease, 3'-phosphodiesterase, and 3'-exonuclease activities are intrinsic to Ape2.

Interaction with PCNA increases the 3'-5' exonuclease activity, but not the AP endonuclease activity of Ape2. We determined the PCNA binding motifs of Ape2 by examining the effect of PCNA on the exonucleotic activity of pont mutant Ape2. We showed that Ape2 has two PCNA binding motifs, which work cooperatively. The strong dependence of the Ape2 3'-5' exonuclease

activity on the PCNA suggests, that the main function of the Ape2 in the cell is attached tightly to the PCNA.

It has recently been published that APE2-null mice show abnormalities in proliferating haemopoietic organs, such as dyshaematopoiesis, defect in lymphopoiesis, and delayed S-phase and G2/M-phase arrest. It has been suggested that the increased accumulation of AP sites in the absence of the AP endonuclease activity of Ape2 is the underlying cause of these phenotypes. However, our biochemical data show a very inefficient AP endonuclease activity of Ape2 arguing that this activity can not play a major role *in vivo*. In contrast, due to its significant 3'-phosphodiesterase activity, Ape2 might have a major function in the removal of 3'-PG termini formed in DNA by oxidative agents. This theory is also supported by our previous study, in which we provided genetic evidence for the involvement of *S cerevisiae* Apn2 in the repair of 3'-PG residues.

Another clue for the main function of Ape2 can be found in its strong 3'-5' exonuclease activity, in the functional dependence on the PCNA, and in its preference for removing mismatched nucleotides from the 3' primer end. These results indicate that Ape2 might have a role as a proofreader in processes where new DNA synthesis occurs such as DNA repair synthesis.

It has been recently described, that the amount of Ape2 protein in the replication foci increased after desoxy-uridin treatment. We analyzed the 3'-5' exonuclease activity of the Ape2 on uracil containing DNA substrate. The 3'-5' exonuclease activity of the Ape2 was 10 times more active on desoxy-uracil, than on the thymine containing DNA substrate. The desoxy-uracil incorporation is a base of an anticancer drug (5-fluorouracil). Because of the fact that Ape2 has a strong desoxy-uracil removing 3'-5' exonuclease activity, it can act as a suppressor of this anticancer drug. Based on our observation, we predict that the inhibition of Ape2 might increase the efficiency of this type of anticancer drugs.

Recently it has been demonstrated, that several class II AP endonucleases such as yeast Apn1 and human Ape1 are able to remove 3' end incorporated 8-oxoG. Above this, the DNA polymerase- β (pol β) has a highly mutagenic activity on 8-oxoG containing DNA substrate, because pol β incorporates adenine opposite the 8-oxoG more than 90% frequency. Considering these studies, we examined how Ape2 removes the adenine or cytosine opposite the 8-oxoG from the 3' end. We showed that the 3'-5' exonuclease activity of the Ape2 was 8.5 times better on the A:8-oxoG DNA substrate than on the C:8-oxoG. In summary, our result is the first demonstration, that Ape2 has an antimutagenic 3'-5' exonuclease activity, which can provide a higher fidelity for the replication of damaged DNA.

X. Referenciák

1. Auerbach,A.D. and Verlander,P.C. (1997) Disorders of DNA replication and repair. *Curr.Opin.Pediatr.*, 9, 600-616.
2. Moses,R.E. (2001) DNA damage processing defects and disease. *Annu.Rev.Genomics Hum.Genet.*, 2, 41-68.
3. Imlay,J.A. and Linn,S. (1988) DNA damage and oxygen radical toxicity. *Science*, 240, 1302-1309.
4. Wood,R.D., Araujo,S.J., Ariza,R.R., Batty,D.P., Biggerstaff,M., Evans,E., Gaillard,P.H., Gunz,D., Koberle,B., Kuraoka,I. *et al.* (2000) DNA damage recognition and nucleotide excision repair in mammalian cells. *Cold Spring Harb.Symp.Quant.Biol.*, 65, 173-182.
5. de Laat,W.L., Jaspers,N.G. and Hoeijmakers,J.H. (1999) Molecular mechanism of nucleotide excision repair. *Genes Dev.*, 13, 768-785.
6. Wood,R.D. (1997) Nucleotide excision repair in mammalian cells. *J.Biol.Chem.*, 272, 23465-23468.
7. Wood,R.D. and Coverley,D. (1991) DNA excision repair in mammalian cell extracts. *Bioessays*, 13, 447-453.
8. Wood,R.D., Aboussekhra,A., Biggerstaff,M., Jones,C.J., O'Donovan,A., Shivji,M.K. and Szymkowski,D.E. (1993) Nucleotide excision repair of DNA by mammalian cell extracts and purified proteins. *Cold Spring Harb.Symp.Quant.Biol.*, 58, 625-632.
9. Aylon,Y. and Kupiec,M. (2004) DSB repair: the yeast paradigm. *DNA Repair (Amst)*, 3, 797-815.
10. Helleday,T. (2003) Pathways for mitotic homologous recombination in mammalian cells. *Mutat.Res.*, 532, 103-115.
11. Daley,J.M., Palmboos,P.L., Wu,D. and Wilson,T.E. (2005) Nonhomologous end joining in yeast. *Annu.Rev.Genet.*, 39, 431-451.
12. Kunkel,T.A. and Erie,D.A. (2005) DNA mismatch repair. *Annu.Rev.Biochem.*, 74, 681-710.
13. Stojic,L., Brun,R. and Jiricny,J. (2004) Mismatch repair and DNA damage signalling. *DNA Repair (Amst)*, 3, 1091-1101.
14. Nasheuer,H.P. and Grosse,F. (1988) DNA polymerase alpha-primase from calf thymus. Determination of the polypeptide responsible for primase activity. *J.Biol.Chem.*, 263, 8981-8988.
15. Santocanale,C., Foiani,M., Lucchini,G. and Plevani,P. (1993) The isolated 48,000-dalton subunit of yeast DNA primase is sufficient for RNA primer synthesis. *J.Biol.Chem.*, 268, 1343-1348.
16. Chang,L.M. (1977) DNA polymerases from bakers' yeast. *J.Biol.Chem.*, 252, 1873-1880.
17. Hindges,R. and Hubscher,U. (1997) DNA polymerase delta, an essential enzyme for DNA transactions. *Biol.Chem.*, 378, 345-362.

18. Johnson,A. and O'Donnell,M. (2005) Cellular DNA replicases: components and dynamics at the replication fork. *Annu.Rev.Biochem.*, 74, 283-315.
19. Lee,M.Y., Tan,C.K., So,A.G. and Downey,K.M. (1980) Purification of deoxyribonucleic acid polymerase delta from calf thymus: partial characterization of physical properties. *Biochemistry*, 19, 2096-2101.
20. Sugino,A. (1995) Yeast DNA polymerases and their role at the replication fork. *Trends Biochem.Sci.*, 20, 319-323.
21. Wintersberger,U. and Wintersberger,E. (1970) Studies on deoxyribonucleic acid polymerases from yeast. 1. Partial purification and properties of two DNA polymerases from mitochondria-free cell extracts. *Eur.J.Biochem.*, 13, 11-19.
22. Prakash,S., Johnson,R.E. and Prakash,L. (2005) Eukaryotic translesion synthesis DNA polymerases: specificity of structure and function. *Annu.Rev.Biochem.*, 74, 317-353.
23. Smirnova,M. and Klein,H.L. (2003) Role of the error-free damage bypass postreplication repair pathway in the maintenance of genomic stability. *Mutat.Res.*, 532, 117-135.
24. Kunkel,T.A. and Bebenek,K. (1988) Recent studies of the fidelity of DNA synthesis. *Biochim.Biophys.Acta*, 951, 1-15.
25. Kunkel,T.A., Bebenek,K., Roberts,J.D., Fitzgerald,M.P. and Thomas,D.C. (1989) Analysis of fidelity mechanisms with eukaryotic DNA replication and repair proteins. *Genome*, 31, 100-103.
26. Kunkel,T.A., Pavlov,Y.I. and Bebenek,K. (2003) Functions of human DNA polymerases eta, kappa and iota suggested by their properties, including fidelity with undamaged DNA templates. *DNA Repair (Amst)*, 2, 135-149.
27. Haracska,L., Johnson,R.E., Unk,I., Phillips,B.B., Hurwitz,J., Prakash,L. and Prakash,S. (2001) Targeting of human DNA polymerase iota to the replication machinery via interaction with PCNA. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, 98, 14256-14261.
28. Haracska,L., Johnson,R.E., Unk,I., Phillips,B., Hurwitz,J., Prakash,L. and Prakash,S. (2001) Physical and functional interactions of human DNA polymerase eta with PCNA. *Mol.Cell Biol.*, 21, 7199-7206.
29. Haracska,L., Kondratyck,C.M., Unk,I., Prakash,S. and Prakash,L. (2001) Interaction with PCNA is essential for yeast DNA polymerase eta function. *Mol.Cell*, 8, 407-415.
30. Haracska,L., Unk,I., Johnson,R.E., Phillips,B.B., Hurwitz,J., Prakash,L. and Prakash,S. (2002) Stimulation of DNA synthesis activity of human DNA polymerase kappa by PCNA. *Mol.Cell Biol.*, 22, 784-791.
31. Haracska,L., Acharya,N., Unk,I., Johnson,R.E., Hurwitz,J., Prakash,L. and Prakash,S. (2005) A single domain in human DNA polymerase iota mediates interaction with PCNA: implications for translesion DNA synthesis. *Mol.Cell Biol.*, 25, 1183-1190.
32. Haracska,L., Torres-Ramos,C.A., Johnson,R.E., Prakash,S. and Prakash,L. (2004) Opposing effects of ubiquitin conjugation and SUMO modification of PCNA on replicational bypass of DNA lesions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol.Cell Biol.*, 24, 4267-4274.
33. Haracska,L., Unk,I., Prakash,L. and Prakash,S. (2006) Ubiquitylation of yeast proliferating cell nuclear antigen and its implications for translesion DNA synthesis. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*.

34. Prakash,S., Johnson,R.E., Washington,M.T., Haracska,L., Kondratick,C.M. and Prakash,L. (2000) Role of yeast and human DNA polymerase eta in error-free replication of damaged DNA. *Cold Spring Harb.Symp.Quant.Biol.*, 65, 51-59.
35. Lu,X., Tan,C.K., Zhou,J.Q., You,M., Carastro,L.M., Downey,K.M. and So,A.G. (2002) Direct interaction of proliferating cell nuclear antigen with the small subunit of DNA polymerase delta. *J.Biol.Chem.*, 277, 24340-24345.
36. Kelman,Z. (1997) PCNA: structure, functions and interactions. *Oncogene*, 14, 629-640.
37. Warbrick,E. (1998) PCNA binding through a conserved motif. *Bioessays*, 20, 195-199.
38. Xu,H., Zhang,P., Liu,L. and Lee,M.Y. (2001) A novel PCNA-binding motif identified by the panning of a random peptide display library. *Biochemistry*, 40, 4512-4520.
39. Boiteux,S. and Guillet,M. (2004) Abasic sites in DNA: repair and biological consequences in *Saccharomyces cerevisiae*. *DNA Repair (Amst)*, 3, 1-12.
40. Demple,B., Herman,T. and Chen,D.S. (1991) Cloning and expression of APE, the cDNA encoding the major human apurinic endonuclease: definition of a family of DNA repair enzymes. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, 88, 11450-11454.
41. Lindahl,T. and Nyberg,B. (1972) Rate of depurination of native deoxyribonucleic acid. *Biochemistry*, 11, 3610-3618.
42. Dodson,M.L. and Lloyd,R.S. (2002) Mechanistic comparisons among base excision repair glycosylases. *Free Radic.Biol.Med.*, 32, 678-682.
43. Krokan,H.E., Standal,R. and Slupphaug,G. (1997) DNA glycosylases in the base excision repair of DNA. *Biochem.J.*, 325 (Pt 1), 1-16.
44. Krokan,H.E., Drablos,F. and Slupphaug,G. (2002) Uracil in DNA—occurrence, consequences and repair. *Oncogene*, 21, 8935-8948.
45. Barzilay,G., Walker,L.J., Robson,C.N. and Hickson,I.D. (1995) Site-directed mutagenesis of the human DNA repair enzyme HAP1: identification of residues important for AP endonuclease and RNase H activity. *Nucleic Acids Res.*, 23, 1544-1550.
46. Matsumoto,Y. and Kim,K. (1995) Excision of deoxyribose phosphate residues by DNA polymerase beta during DNA repair. *Science*, 269, 699-702.
47. Harrington,J.J. and Lieber,M.R. (1994) Functional domains within FEN-1 and RAD2 define a family of structure-specific endonucleases: implications for nucleotide excision repair. *Genes Dev.*, 8, 1344-1355.
48. Murante,R.S., Huang,L., Turchi,J.J. and Bambara,R.A. (1994) The calf 5'- to 3'-exonuclease is also an endonuclease with both activities dependent on primers annealed upstream of the point of cleavage. *J.Biol.Chem.*, 269, 1191-1196.
49. Warbrick,E., Lane,D.P., Glover,D.M. and Cox,L.S. (1997) Homologous regions of Fen1 and p21Cip1 compete for binding to the same site on PCNA: a potential mechanism to co-ordinate DNA replication and repair. *Oncogene*, 14, 2313-2321.
50. Chen,D.S., Herman,T. and Demple,B. (1991) Two distinct human DNA diesterases that hydrolyze 3'-blocking deoxyribose fragments from oxidized DNA. *Nucleic Acids Res.*, 19, 5907-5914.

51. Wallace, S.S. (1998) Enzymatic processing of radiation-induced free radical damage in DNA. *Radiat. Res.*, 150, S60-S79.
52. Dianov, G., Price, A. and Lindahl, T. (1992) Generation of single-nucleotide repair patches following excision of uracil residues from DNA. *Mol. Cell Biol.*, 12, 1605-1612.
53. Sobol, R.W., Horton, J.K., Kuhn, R., Gu, H., Singhal, R.K., Prasad, R., Rajewsky, K. and Wilson, S.H. (1996) Requirement of mammalian DNA polymerase-beta in base-excision repair. *Nature*, 379, 183-186.
54. Tanabe, K., Bohn, E.W. and Wilson, S.H. (1979) Steady-state kinetics of mouse DNA polymerase beta. *Biochemistry*, 18, 3401-3406.
55. Wilson, S.H. (1998) Mammalian base excision repair and DNA polymerase beta. *Mutat. Res.*, 407, 203-215.
56. Fortini, P., Pascucci, B., Parlanti, E., Sobol, R.W., Wilson, S.H. and Dogliotti, E. (1998) Different DNA polymerases are involved in the short- and long-patch base excision repair in mammalian cells. *Biochemistry*, 37, 3575-3580.
57. Klungland, A. and Lindahl, T. (1997) Second pathway for completion of human DNA base excision-repair: reconstitution with purified proteins and requirement for DNase IV (FEN1). *EMBO J.*, 16, 3341-3348.
58. Matsumoto, Y., Kim, K., Hurwitz, J., Gary, R., Levin, D.S., Tomkinson, A.E. and Park, M.S. (1999) Reconstitution of proliferating cell nuclear antigen-dependent repair of apurinic/apyrimidinic sites with purified human proteins. *J. Biol. Chem.*, 274, 33703-33708.
59. Pascucci, B., Stucki, M., Jonsson, Z.O., Dogliotti, E. and Hubscher, U. (1999) Long patch base excision repair with purified human proteins. DNA ligase I as patch size mediator for DNA polymerases delta and epsilon. *J. Biol. Chem.*, 274, 33696-33702.
60. Dimitriadis, E.K., Prasad, R., Vaske, M.K., Chen, L., Tomkinson, A.E., Lewis, M.S. and Wilson, S.H. (1998) Thermodynamics of human DNA ligase I trimerization and association with DNA polymerase beta. *J. Biol. Chem.*, 273, 20540-20550.
61. Levin, D.S., Bai, W., Yao, N., O'Donnell, M. and Tomkinson, A.E. (1997) An interaction between DNA ligase I and proliferating cell nuclear antigen: implications for Okazaki fragment synthesis and joining. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 94, 12863-12868.
62. Prasad, R., Singhal, R.K., Srivastava, D.K., Molina, J.T., Tomkinson, A.E. and Wilson, S.H. (1996) Specific interaction of DNA polymerase beta and DNA ligase I in a multiprotein base excision repair complex from bovine testis. *J. Biol. Chem.*, 271, 16000-16007.
63. Waga, S., Bauer, G. and Stillman, B. (1994) Reconstitution of complete SV40 DNA replication with purified replication factors. *J. Biol. Chem.*, 269, 10923-10934.
64. Chou, K.M. and Cheng, Y.C. (2002) An exonucleolytic activity of human apurinic/apyrimidinic endonuclease on 3' mispaired DNA. *Nature*, 415, 655-659.
65. Osheroff, W.P., Jung, H.K., Beard, W.A., Wilson, S.H. and Kunkel, T.A. (1999) The fidelity of DNA polymerase beta during distributive and processive DNA synthesis. *J. Biol. Chem.*, 274, 3642-3650.

66. Johnson,R.E., Torres-Ramos,C.A., Izumi,T., Mitra,S., Prakash,S. and Prakash,L. (1998) Identification of APN2, the *Saccharomyces cerevisiae* homolog of the major human AP endonuclease HAP1, and its role in the repair of abasic sites. *Genes Dev.*, 12, 3137-3143.
67. Unk,I., Haracska,L., Johnson,R.E., Prakash,S. and Prakash,L. (2000) Apurinic endonuclease activity of yeast Apn2 protein. *J.Biol.Chem.*, 275, 22427-22434.
68. Unk,I., Haracska,L., Prakash,S. and Prakash,L. (2001) 3'-phosphodiesterase and 3'→5' exonuclease activities of yeast Apn2 protein and requirement of these activities for repair of oxidative DNA damage. *Mol.Cell Biol.*, 21, 1656-1661.
69. Unk,I., Haracska,L., Gomes,X.V., Burgers,P.M., Prakash,L. and Prakash,S. (2002) Stimulation of 3'→5' exonuclease and 3'-phosphodiesterase activities of yeast apn2 by proliferating cell nuclear antigen. *Mol.Cell Biol.*, 22, 6480-6486.
70. Guillet,M. and Boiteux,S. (2002) Endogenous DNA abasic sites cause cell death in the absence of Apn1, Apn2 and Rad1/Rad10 in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J.*, 21, 2833-2841.
71. Guzder,S.N., Torres-Ramos,C., Johnson,R.E., Haracska,L., Prakash,L. and Prakash,S. (2004) Requirement of yeast Rad1-Rad10 nuclease for the removal of 3'-blocked termini from DNA strand breaks induced by reactive oxygen species. *Genes Dev.*, 18, 2283-2291.
72. Hanna,M., Chow,B.L., Morey,N.J., Jinks-Robertson,S., Doetsch,P.W. and Xiao,W. (2004) Involvement of two endonuclease III homologs in the base excision repair pathway for the processing of DNA alkylation damage in *Saccharomyces cerevisiae*. *DNA Repair (Amst)*, 3, 51-59.
73. Xiao,W., Chow,B.L., Hanna,M. and Doetsch,P.W. (2001) Deletion of the MAG1 DNA glycosylase gene suppresses alkylation-induced killing and mutagenesis in yeast cells lacking AP endonucleases. *Mutat.Res.*, 487, 137-147.
74. Vance,J.R. and Wilson,T.E. (2001) Repair of DNA strand breaks by the overlapping functions of lesion-specific and non-lesion-specific DNA 3' phosphatases. *Mol.Cell Biol.*, 21, 7191-7198.
75. Robson,C.N. and Hickson,I.D. (1991) Isolation of cDNA clones encoding a human apurinic/aprimidinic endonuclease that corrects DNA repair and mutagenesis defects in *E. coli* xth (exonuclease III) mutants. *Nucleic Acids Res.*, 19, 5519-5523.
76. Wong,D., DeMott,M.S. and Demple,B. (2003) Modulation of the 3'→5'-exonuclease activity of human apurinic endonuclease (Ape1) by its 5'-incised Abasic DNA product. *J.Biol.Chem.*, 278, 36242-36249.
77. Xanthoudakis,S., Miao,G., Wang,F., Pan,Y.C. and Curran,T. (1992) Redox activation of Fos-Jun DNA binding activity is mediated by a DNA repair enzyme. *EMBO J.*, 11, 3323-3335.
78. Beernink,P.T., Segelke,B.W., Hadi,M.Z., Erzberger,J.P., Wilson,D.M., III and Rupp,B. (2001) Two divalent metal ions in the active site of a new crystal form of human apurinic/aprimidinic endonuclease, Ape1: implications for the catalytic mechanism. *J.Mol.Biol.*, 307, 1023-1034.
79. Bennett,R.A., Wilson,D.M., III, Wong,D. and Demple,B. (1997) Interaction of human apurinic endonuclease and DNA polymerase beta in the base excision repair pathway. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, 94, 7166-7169.
80. Kubota,Y., Nash,R.A., Klungland,A., Schar,P., Barnes,D.E. and Lindahl,T. (1996) Reconstitution of DNA base excision-repair with purified human proteins: interaction between DNA polymerase beta and the XRCC1 protein. *EMBO J.*, 15, 6662-6670.

81. Ranalli,T.A., Tom,S. and Bambara,R.A. (2002) AP endonuclease 1 coordinates flap endonuclease 1 and DNA ligase I activity in long patch base excision repair. *J.Biol.Chem.*, 277, 41715-41724.
82. Ludwig,D.L., MacInnes,M.A., Takiguchi,Y., Purtymun,P.E., Henrie,M., Flannery,M., Meneses,J., Pedersen,R.A. and Chen,D.J. (1998) A murine AP-endonuclease gene-targeted deficiency with post-implantation embryonic progression and ionizing radiation sensitivity. *Mutat.Res.*, 409, 17-29.
83. Xanthoudakis,S., Smeyne,R.J., Wallace,J.D. and Curran,T. (1996) The redox/DNA repair protein, Ref-1, is essential for early embryonic development in mice. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, 93, 8919-8923.
84. Kakolyris,S., Kaklamanis,L., Giatromanolaki,A., Koukourakis,M., Hickson,I.D., Barzilay,G., Turley,H., Leek,R.D., Kanavaros,P., Georgoulas,V. *et al.* (1998) Expression and subcellular localization of human AP endonuclease 1 (HAP1/Ref-1) protein: a basis for its role in human disease. *Histopathology*, 33, 561-569.
85. Kakolyris,S., Giatromanolaki,A., Koukourakis,M., Kaklamanis,L., Kanavaros,P., Hickson,I.D., Barzilay,G., Georgoulas,V., Gatter,K.C. and Harris,A.L. (1999) Nuclear localization of human AP endonuclease 1 (HAP1/Ref-1) associates with prognosis in early operable non-small cell lung cancer (NSCLC). *J.Pathol.*, 189, 351-357.
86. Koukourakis,M.I., Giatromanolaki,A., Kakolyris,S., Sivridis,E., Georgoulas,V., Funtzilas,G., Hickson,I.D., Gatter,K.C. and Harris,A.L. (2001) Nuclear expression of human apurinic/apyrimidinic endonuclease (HAP1/Ref-1) in head-and-neck cancer is associated with resistance to chemoradiotherapy and poor outcome. *Int.J.Radiat.Oncol.Biol.Phys.*, 50, 27-36.
87. Hadi,M.Z. and Wilson,D.M., III (2000) Second human protein with homology to the Escherichia coli abasic endonuclease exonuclease III. *Environ.Mol.Mutagen.*, 36, 312-324.
88. Hadi,M.Z., Ginalski,K., Nguyen,L.H. and Wilson,D.M., III (2002) Determinants in nuclease specificity of Ape1 and Ape2, human homologues of Escherichia coli exonuclease III. *J.Mol.Biol.*, 316, 853-866.
89. Tsuchimoto,D., Sakai,Y., Sakumi,K., Nishioka,K., Sasaki,M., Fujiwara,T. and Nakabeppu,Y. (2001) Human APE2 protein is mostly localized in the nuclei and to some extent in the mitochondria, while nuclear APE2 is partly associated with proliferating cell nuclear antigen. *Nucleic Acids Res.*, 29, 2349-2360.
90. Ide,Y., Tsuchimoto,D., Tominaga,Y., Iwamoto,Y. and Nakabeppu,Y. (2003) Characterization of the genomic structure and expression of the mouse Apex2 gene. *Genomics*, 81, 47-57.
91. Ide,Y., Tsuchimoto,D., Tominaga,Y., Nakashima,M., Watanabe,T., Sakumi,K., Ohno,M. and Nakabeppu,Y. (2004) Growth retardation and dyslymphopoiesis accompanied by G2/M arrest in APEX2-null mice. *Blood*, 104, 4097-4103.
92. Haracska,L., Prakash,S. and Prakash,L. (2003) Yeast DNA polymerase zeta is an efficient extender of primer ends opposite from 7,8-dihydro-8-Oxoguanine and O6-methylguanine. *Mol.Cell Biol.*, 23, 1453-1459.
93. Unk,I., Haracska,L., Johnson,R.E., Prakash,S. and Prakash,L. (2000) Apurinic endonuclease activity of yeast Apn2 protein. *J.Biol.Chem.*, 275, 22427-22434.
94. Hubscher,U., Maga,G. and Spadari,S. (2002) Eukaryotic DNA polymerases. *Annu.Rev.Biochem.*, 71, 133-163.

95. Ishchenko,A.A., Yang,X., Ramotar,D. and Saporbaev,M. (2005) The 3'->5' exonuclease of Apn1 provides an alternative pathway to repair 7,8-dihydro-8-oxodeoxyguanosine in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol.Cell Biol.*, 25, 6380-6390.
96. Haracska,L., Yu,S.L., Johnson,R.E., Prakash,L. and Prakash,S. (2000) Efficient and accurate replication in the presence of 7,8-dihydro-8-oxoguanine by DNA polymerase ϵ . *Nat.Genet.*, 25, 458-461.
97. Seeberg,E., Eide,L. and Bjoras,M. (1995) The Base Excision-Repair Pathway. *Trends in Biochemical Sciences*, 20, 391-397.
98. Unk,I., Haracska,L., Prakash,S. and Prakash,L. (2001) 3'-phosphodiesterase and 3'->5' exonuclease activities of yeast Apn2 protein and requirement of these activities for repair of oxidative DNA damage. *Molecular and Cellular Biology*, 21, 1656-1661.
99. Mol,C.D., Izumi,T., Mitra,S. and Tainer,J.A. (2000) DNA-bound structures and mutants reveal abasic DNA binding by APE1 DNA repair and coordination. *Nature*, 403, 451-456.
100. Ide,Y., Tsuchimoto,D., Tominaga,Y., Iwamoto,Y. and Nakabeppu,Y. (2003) Characterization of the genomic structure and expression of the mouse Apex2 gene. *Genomics*, 81, 47-57.
101. Ide,Y., Tsuchimoto,D., Tominaga,Y., Nakashima,M., Watanabe,T., Sakumi,K., Ohno,M. and Nakabeppu,Y. (2004) Growth retardation and dyslymphopoiesis accompanied by G2/M arrest in APEX2-null mice. *Blood*, 104, 4097-4103.
102. Unk,I., Haracska,L., Prakash,S. and Prakash,L. (2001) 3'-phosphodiesterase and 3'->5' exonuclease activities of yeast Apn2 protein and requirement of these activities for repair of oxidative DNA damage. *Molecular and Cellular Biology*, 21, 1656-1661.

XI. Köszönetnyilvánítás

Ezúton köszönöm az eddigi munkámhoz és a dolgozat megírásához nyújtott segítséget:

Dr. Haracska Lajosnak, munkacsoportunk vezetőjének, aki az itt összefoglalt munkához a szellemi és anyagi támogatást nyújtotta

Szukacsov Valériának, feleségemnek, aki a munkával járó megpróbáltatásokat elviselte, munkámban mellettem állt és támogatott,

Dr. Unk Ildikónak, aki az itt összefoglalt munka alapjait az élesztő Apn2 vizsgálatával megteremtette, valamint hasznos tanácsaival segítette munkámat,

A Mutáció és Karcinogenezis labor összes dolgozójának, a munkához nyújtott kisebb, nagyobb segítségért.

Külön köszönettel tartozok **Illésné Kovács Katalinnak**, asszisztensünknek és **Nótári Péterné „Icusnak”**, akiknek az áldozatos munkája nagymértékben hozzájárult a dolgozat elkészüléséhez.

XII. Közlemények jegyzéke

Az értekezés témakörébe tartozó közlemények

1. **Burkovics P**, Szukacsov V, Unk I, Haracska L
Human Ape2 protein has a 3'-5' exonuclease activity that acts preferentially on mismatched base pairs.
Nucleic Acids Res. 2006 May 10;34(9):2508-15
2. **Burkovics P**, Szukacsov V, Unk I, Haracska L
Human Ape2 acts with the PCNA as an antimutagenic 3'-5' repair exonuclease
Nucleic Acids Res. Manuscript

Egyéb közlemények

1. Kortvely E, **Burkovics P**, Varszegi Sz, Gulya K
Cloning and Characterization of the Rat Importin 9: Implication of its Neuronal Function
Molecular Brain Research, 139 (2005) 103-114

Előadások

1. **Burkovics P**, Unk I, Haracska L
Straub-Napok, Szeged, 2004 December 7-9
Novel activities of the base excision repair protein Ape2
2. **Burkovics P**, Unk I, Haracska L
VI. Magyar genetikai Kongresszus, XIII: Sejt- és Fejlődésbiológiai Napok, Eger, 2005.04.10-12
Az élesztő és humán II. típusú AP endonukleázok új funkciója a DNS reparációban

Poszterek

1. **Burkovics P**, Kortvely E, Gulya K
X. Sejt- és fejlődésbiológiai napok, Siófok, 2002.03.27-29
A patkány importin 9 génjének izolálása és részleges jellemzése
2. Szukacsov V, **Burkovics P**, Subramanian B, Unk I, Haracska L
VI. Magyar genetikai Kongresszus, XIII: Sejt- és Fejlődésbiológiai Napok, Eger, 2005.04.10-12
Az élesztő és humán PCNA ubiquitin és SUMO módosításainak szerepe a DNS reparációban
3. Szukacsov V, **Burkovics P**, Pintér L, Unk I, Haracska L
A Magyar Biokémiai Egyesület 2006. évi Vándorgyűlése Pécs, 2006.08.30-09. 02
A sumoilált PCNA szerepe a DNS replikációban és reparációban