

BARBARA TUDEK

Instytut Biochemii i Biofizyki Polskiej Akademii Nauk,

Pawińskiego 5a, 02-106, Warszawa

e-mail: tudek@ibb.waw.pl

MECHANIZMY NAPRAWY UTLENIONYCH ZASAD DNA GLIKOZYLAZY 8-HYDROKSYGUANINY I GLIKOLU TYMINY

MODYFIKACJE ZASAD DNA PRZEZ AKTYWNE FORMY TLENU

DNA organizmów tlenowych jest stale narażone na uszkodzenia przez aktywne formy tlenu (ang. reactive oxygen species — ROS), a uszkodzenia oksydacyjne DNA odgrywają istotną rolę w mutagenезie, kancerogenезie i w procesie starzenia (AMES i współaut. 1995). Nadtlenek wodoru, tlen atomowy czy rodnik hydroksylowy są produktami ubocznymi wielu procesów metabolicznych, takich jak oddychanie tkankowe w mitochondriach, utlenianie w peroksyzomach czy metabolizm substancji egzogennej i endogennej w reticulum endoplazmatycznym przez cytochrom P-450. ROS są również bronią stosowaną przez makrofagi w obronie przed inwazją patogennych organizmów. W procesach zapalnych obok aktywnych form tlenu powstają również aktywne formy azotu. Tlenek azotu pełni w komórce funkcję przekaźnika sygnałów, ale jest także związkiem, który może bezpośrednio lub pośrednio, poprzez interakcję z lipidami, uszkadzać DNA (BURCHAM 1998). Podczas utleniania wielonienasyconych kwa-

sów tłuszczowych następuje pękanie wiązań podwójnych i fragmentacja cząsteczek z wytworzeniem stabilnych produktów (dialdehyd malonowy, akroleina, 2,3-epoksy-4-hydroksynonanal), które przyłączając się do egzocyklicznych atomów azotu zasad DNA indukują powstawanie egzocyklicznych adduktów (BURCHAM 1998). W Tabeli 1 podano najważniejsze oksydacyjne modyfikacje zasad, ich tworzenie oraz konsekwencje biologiczne.

Szkodliwe skutki utleniania DNA są niwelowane przez jego naprawę. Wszystkie żywe komórki są wyposażone w dwa równoległe działające systemy naprawy wycinania, które w sposób bezbłędny eliminują uszkodzone zasady DNA: (i) system naprawy przez wycinanie zasad (ang. base excision repair BER); (ii) system naprawy przez wycinanie nukleotydów (ang. nucleotide excision repair NER). W naprawie utlenionych zasad najistotniejszą rolę odgrywa BER.

DNA GLIKOZYLAZY

Enzymami inicjującymi szlak naprawy przez wycinanie zasad i decydującymi o jego specyficzności są DNA glikozylazy. Są to małe (m.c. 14 000–50 000), monomeryczne białka nie wymagające do aktywności kofaktorów (KROKAN i współaut. 1997). DNA glikozylazy rozbijają wiązanie N-glikozydowe pomiędzy uszkodzoną zasadą a cząsteczką deoksyrybozy

uwalniając zasadę i pozostawiając w DNA miejsce apurynowe/apirymidynowe (AP). Niektóre glikozylazy są dwufunkcyjne, posiadając również aktywność AP-liazową i dodatkowo przeciwnają wiązanie fosfoestrowe od strony 3' końca miejsca apurynowego utworzonego przez glikozylazę. Porównanie sekwencji różnych glikozylaz oraz ich konformacji ujawniło istnienie

wspólnych cech strukturalnych w centrach aktywnych filogenetycznie odległych od siebie białek i pozwoliło na stworzenie modelu ich katalitycznego działania (DODSON i współaut. 1994).

JEDNOLITY MECHANIZM DZIAŁANIA GLIKOZYLAZ DNA

Centra aktywne glikozylaz DNA mogą wiązać jedynie zasady ekstrahelikalne, które zostały wyciągnięte na zewnątrz podwójnej helisy DNA. Enzym rozpoznaje uszkodzoną zasadę i aktywnie uczestniczy w jej wyciągnięciu na zewnątrz helisy. Następnie wpasowuje ją do centrum aktywnego. W ponad 20 znanych mono- i dwufunkcyjnych glikozylazach w centrum aktywnym występuje taki sam motyw strukturalny: dwa fragmenty białka skrócone w spiralę przedzielone fragmentem o strukturze spinki do włosów (ang. helix-hairpin-helix HhH) oraz reszta kwasu asparaginowego (Asp). Asp odgrywa istotną rolę w mechanizmie katalizy. Aminokwas ten albo powoduje deprotonację cząsteczki wody, która dalej może działać jako atakująca cząsteczka nukleofilowa (glikozylazy monofunkcyjne), albo deprotonować inny aminokwas w centrum aktywnym enzymu, najczęściej cząsteczkę lizyny (glikozylazy dwufunkcyjne). Zaktywowana nukleofilowa cząsteczka atakuje węgiel anomeryczny deoksyrybozy powodując przegrupowanie elektronów i uwolnienie zasady

(Ryc. 1). Glikozylazy monofunkcyjne włączają cząsteczkę wody do produktów reakcji pozostawiając w DNA miejsca AP (Ryc. 1A). W glikozylazach dwufunkcyjnych atakująca nukleofilowa grupa aminowa przejściowo tworzy wiązanie kowalencyjne (zasadę Schiffa) z węglem anomerycznym deoksyrybozy uwalniając uszkodzoną zasadę DNA (Ryc. 1B-II). Przy wykorzystaniu innych, ujemnie naładowanych reszt aminokwasowych glikozylazy, inicjowana jest β-eliminacja i rozbiecie wiązania 3'-fosfoestrowego. Wtedy następuje przerwanie łańcucha DNA, ale enzym jest jeszcze kowalencyjnie związany z węglem anomerycznym deoksyrybozy poprzez zasadę Schiffa (Ryc. 1B-IV, V). Z kolei, hydroliza zasady Schiffa uwalnia aktywny enzym i DNA zawierające na końcu 3' trans α-β nienasycony aldehyd powstały z deoksyrybozy (Ryc. 2B-V, VI) (SUN i współaut. 1995). Kowalencyjny intermediat glikozylazy/AP-liazy z DNA (zasada Schiffa) może ulec redukcji (w praktyce laboratoryjnej wykorzystuje się najczęściej borowodorek sodu), co uniemożliwia dalszą β-eliminację i powoduje wytworzenie stabilnego, kowalencyjnego adduktu (Ryc. 2B-VII). Reakcja ta jest powszechnie wykorzystywana do identyfikacji AP-liazowych właściwości glikozylaz DNA (NASH i współaut. 1996).

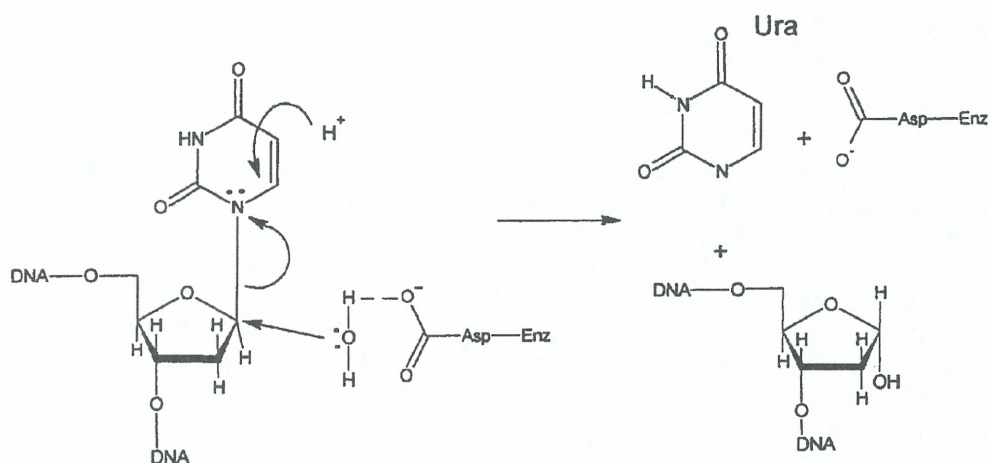
Powszechnie wyróżnia się dwie funkcjonalne grupy glikozylaz uczestniczące w naprawie utlenionych zasad DNA: (i) glikozylazy uczest-

Tabela 1. Podstawowe uszkodzenia oksydacyjne zasad DNA

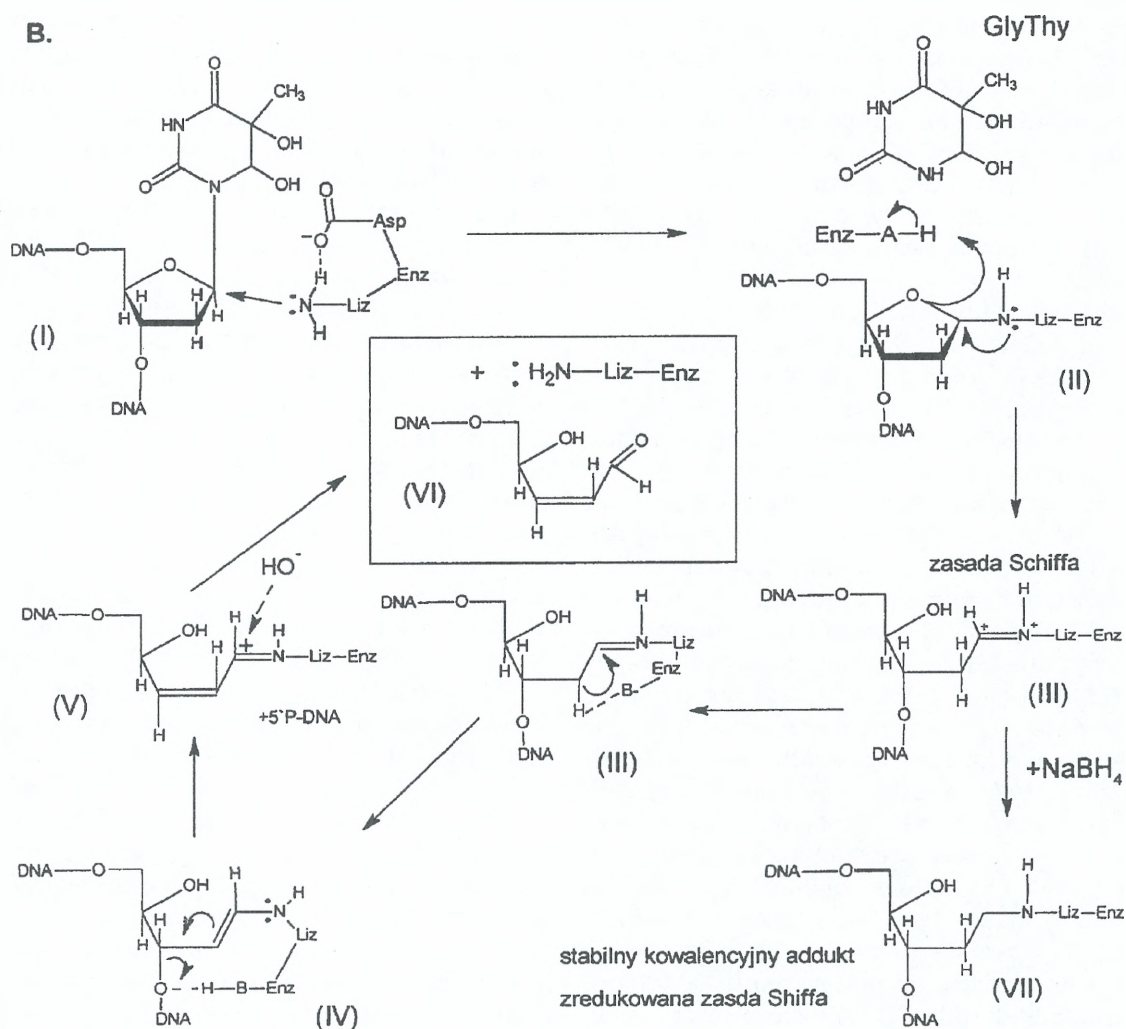
Zasada DNA	Modyfikacja oksydacyjna		Efekt biologiczny	Literatura
G	8OHG	(B)*	Mutacje G→T i G→C, hamuje postreplikacyjną metylację DNA	SHIBUTANI i współaut. (1991), MORIYA (1993), WEITZMAN i współaut. (1994),
	FapyG	(B)	Nieznane; postulowane blokowanie replikacji DNA	
	PropanoG	(L)	Mutacje G→T	MORIYA i współaut. (1994)
A	2OHA	(B)	Mutacje A→G i A→T, delecje	KAMIYA i KASAI (1997)
	8OHA	(B)	W komórkach eukariotycznych mutacje A→G i A→C	KAMIYA i współaut. (1995)
	FapyA	(B)	SOS-zależne mutacje A→G	GRAZIEWICZ i współaut. (1999)
	1,N6-etenoA	(L)	W komórkach eukariotycznych mutacje A→G >>A→T>A→C	PANDYA i MORIYA (1996)
T	TG	(B)	Blokuje replikację; nieliczne, sekwencjozależne mutacje T→C	EVANS i współaut. (1993), ROUET i ESSIGMAN (1983)
	5OHMeU	(B)	Niemutagenna, nie blokuje replikacji	Mi i współaut. (1997)
	5-formyloU	(B)	G:C→A:T, A:T→G:C, G:C→T:A	FUJIKAWA i współaut. (1998)
C	5OHC	(B)	C→T, C→G	PURMAL i współaut. (1994)
	5OHU	(B)	C→T, C→G	PURMAL i współaut. (1994)
	3,N4-etenoC	(L)	Mutacje C→T i C→A	BORYS i współaut. (1994); SHIBUTANI i współaut. (1996); ZHANG i współaut. (1995)

*B — zmodyfikowana zasada powstaje podczas bezpośredniej interakcji aktywnych form tlenu z DNA, L — zmodyfikowana zasada powstaje podczas interakcji produktów peroksydacji lipidów z DNA

A.



B.



Ryc. 1. Mechanizm działania glikozylaz: A. Monofunkcyjnych, na przykładzie glikozylazy uracylowej wycinającej z DNA uracyl, powstający na skutek spontanicznej dezaminacji cytozyny w roztworach wodnych; B. Dwufunkcyjnych glikozylaz/AP-liaz, na przykładzie endonukleazy III z *Escherichia coli*.

niczące w naprawie 8-hydroksyguaniny i innych utlenionych puryn, których przedstawicielem u *Escherichia coli* jest białko Fpg; (ii)

glikozylazy uczestniczące w naprawie glikolu tyminy — rodzina bakteryjnej endonukleazy III (białka Nth).

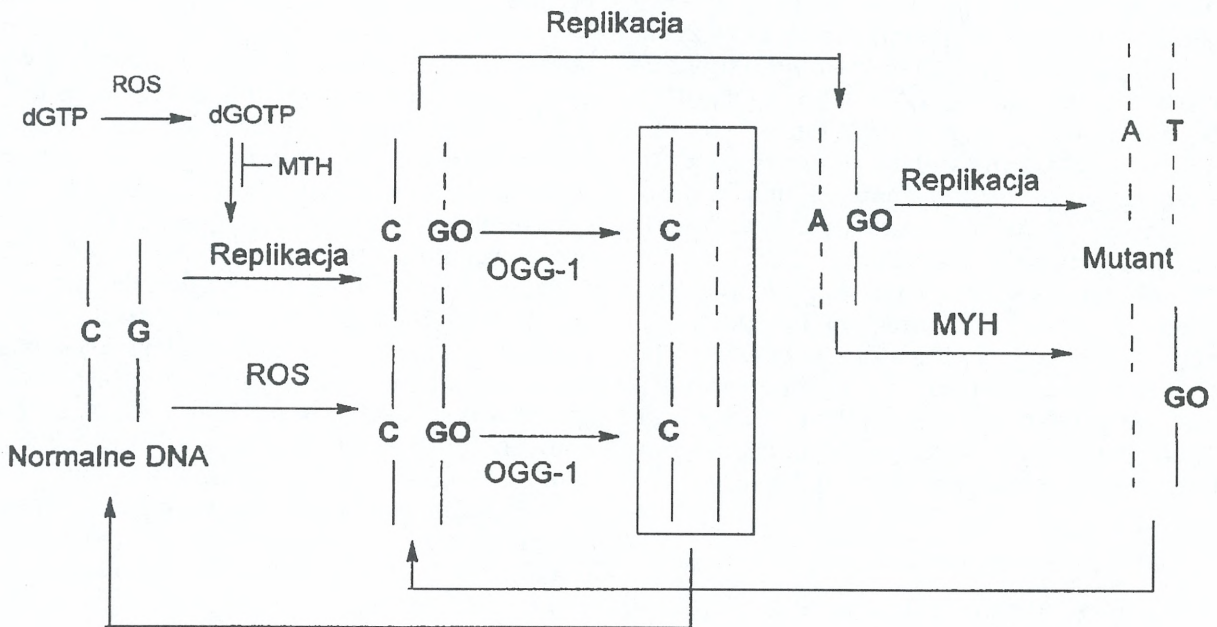
NAPRAWA 8-HYDROKSYGUANINY

Guanina bardzo łatwo ulega utlenieniu w pozycji 8 i to zarówno jako składnik kwasów nukleinowych — DNA i RNA, jak i w postaci nukleozydów i nukleotydów w puli nukleotydów komórkowych. Uważa się, że w DNA pojedynczej komórki gryzoni powstaje ok. 10^5 cząsteczek 8OHG w ciągu doby (FRAGA i współaut. 1990). Obecność 8OHG w DNA i puli nukleotydów prowadzi do powstawania błędów w czasie replikacji i mutacji. Polimerazy DNA zarówno pro —, jak i eukariotyczne wbudowują cytozynę lub adeninę naprzeciw 8OHG w matrycy, przy czym polimerazy replikacyjne chętniej włączają adeninę niż cytozynę, co prowadzi do substytucji zasad G:C→T:A (SHIBUTANI i współaut. 1991) (Rys 2A). 8OHG może być również włączana do DNA z puli nukleotydów komórkowych. 8-OH-dGTP jest substratem dla polimeraz DNA, które wbudowują nukleotyd do wydłużanej nici naprzeciw cytozyny albo adeniny w matrycy (MAKI i SEKIGUCHI 1992), co w ostatnim przypadku prowadzi do powstawania transwersji AT→CG (Ryc. 2B).

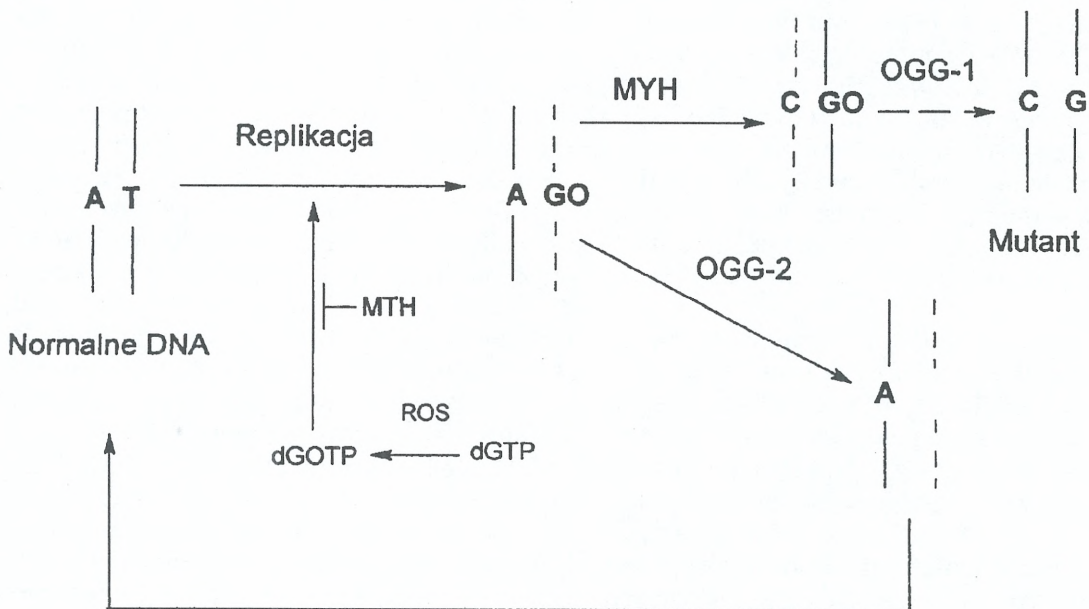
Trzy, wzajemnie uzupełniające się drogi eliminacji 8OHG z DNA (tzw. system GO; GO = 8OHG), zostały początkowo wykryte u *E. coli* (TUDEK 1993). Obecnie wydaje się, że system ten jest uniwersalny, albowiem znaleziono i sklonowano wiele eukariotycznych analogów białek bakteryjnych (KROKAN i współaut. 1997). Pierwsza droga polega na usuwaniu 8-OH-dGTP z puli nukleotydów przez specyficzną 8-OH-dGTPazę rozkładającą 8-OH-dGTP do 8-OH-dGMP i zapobiegającą włączaniu tego utlenionego nukleotydu do DNA przez polimerazy DNA (MAKI i SEKIGUCHI 1992). U *E. coli* białko to jest kodowane przez gen *mutT*, a uszkodzenie funkcji genu w komórce prowadzi do 100–1000-krotnego wzrostu częstości spontanicznych transwersji A:T→C:G (YANOFSKY i współaut. 1966). W komórkach ludzkich wykryto istnienie funkcjonalnego analogu białka MutT, 8-OH-dGTPazy o masie 18 kDa (SAKUMI i współaut. 1993). Rozkład 8-OH-dGTP do 8-OH-dGMP skutecznie zapobiega ponownemu włączeniu tego nukleotydu do puli trójfosforanów nukleotydów i DNA, gdyż kinaza guanylowa fosforylująca dGMP do dGDP i dGTP jest zupełnie nieaktywna wobec 8-OH-dGMP, za to nukleotyda za wydajnie defosforyluje 8-OH-dGMP do nukleozydu, który jest następnie wydalany poza

komórkę (HAYAKAWA i współaut. 1995). Druga droga polega na wycinaniu 8OHG z DNA przez glikozylazę 8OHG. U *E. coli* bierze w tym udział formamidopirymidyno-DNA glikozylaza (białko Fpg, inna nazwa — białko MutM). Mutanty *fpg* charakteryzują się 10-krotnie zwiększonym poziomem spontanicznych mutacji typu G:C→T:A (CABRERA i współaut. 1988). Białko Fpg efektywnie wycina 8OHG z dwuniciowego DNA, jeśli zasada ta jest sparowana z resztą cytozyny, tyminy lub guaniny, jeśli jednak po replikacji 8OHG zostanie sparowana z A, uszkodzona zasada ulega przesunięciu do mniejszego rowka DNA i nie jest przez enzym wycinana (CASTAIGN i współaut. 1993). Funkcjonalnym odpowiednikiem białka Fpg w komórkach eukariotycznych (drożdże, człowiek) jest białko OGG1 (AUFFRET van der KEMP i współaut. 1996, RADICELLA i współaut. 1997). Jeśli 8OHG wymknie się spod kontroli białek MutT i Fpg i zostanie sparowana w DNA z resztą adeniny, adenina ta jest rozpoznawana i wycinana przez inną glikozylazę — białko MutY (MICHAELS i współaut. 1992). Białko MutY wycina również adeninę sparowaną z niezmodyfikowaną guaniną lub cytozyną, ale z dużo mniejszą wydajnością. Brak tego enzymu w komórkach *E. coli* podnosi 100–1000 razy częstość spontanicznych transwersji G:C→T:A (NGHIEM i współaut. 1988). Został również znaleziony ludzki homolog białka MutY-hMYH (human MutY homologue) (SŁUPSKA i współaut. 1996). Po wycięciu adeniny z pary A:8OHG, polimerazy naprawcze uzupełniają luki w DNA, częściej wstawiając resztę cytozyny naprzeciw 8OHG niż resztę adeniny (SHIBUTANI i współaut. 1991). Wtedy białko Fpg może usunąć 8OHG z DNA i zapoczątkować proces rekonstrukcji pary G:C (Ryc. 2). Jednak łatwo sobie wyobrazić, że naprawa 8OHG przez białka MutY i Fpg przywraca pierwotną sekwencję DNA jedynie wtedy, gdy utlenieniu ulega guanina pary G:C znajdująca się w DNA, a po replikacji naprzeciw 8OHG zostanie wstawiona adenina. Jeśli jednak 8OHG pochodzi z puli nukleotydów i podczas replikacji 8-OH-dGTP zostanie wstawione naprzeciw A, to wtedy jednoczesna aktywność MutY i Fpg będzie raczej stymulowała powstanie mutacji niż ją zniweluje (Ryc. 2B). W komórkach eukariotycznych (drożdży i ludzkich) wykryto i oczyszczono drugą glikozylazę wycinającą z DNA 8OHG, różniącą się od OGG1 specyfi-

A.



B.



Ryc. 2. Konsekwencje utleniania guaniny do 8-hydroksyguaniny (GO) i wielostopniowy system jej naprawy w komórkach eukariotycznych.

cznością naprawy w zależności od parowania 8OHG z zasadą w nici komplementarnej. Glikozylaza ta, nazwana OGG2, wycina 8OHG z pary 8OHG:G oraz 8OHG:A, ale pozostaje nieaktywna wobec 8OHG sparowanej z pirymidynami,

choć wiąże się z DNA zawierającym 8OHG sparowaną ze wszystkimi czterema zasadami DNA (HAZRA i współaut. 1998, NASH i współaut. 1996). HAZRA i współaut. (1998) zaproponowali model, w którym każda z glikozylaz ma odrębne

funkcje antymutagenne, jednak wzajemnie się uzupełniające (Ryc. 2). OGG1 zapobiegałaby mutacjom G:C→T:A przez usuwanie 8OHG powstającej w DNA *in situ* i sparowanej z cytozyną, natomiast funkcją OGG2 byłoby usuwanie 8OHG włączanego do DNA jako 8-OH-dGTP podczas replikacji naprzeciw A. Model ten przewiduje, że OGG2 usuwałaby uszkodzoną zasadę jedynie z nowosyntetyzowanej nici, co zapobiegałoby powstawaniu mutacji A:T→C:G i nie konkurowałoby z systemem OGG1-MutY. Czynnikiem umożliwiającym rozróżnienie „starej” od „nowej” nici DNA mogłaby być postreplikacyjna metylacja DNA, która odgrywa podobną rolę w systemie naprawy niedopasowanych zasad (ang. mismatch repair). Dotychczas brak jednak danych eksperymentalnych, które mogłyby w pełni udokumentować tę hipotezę.

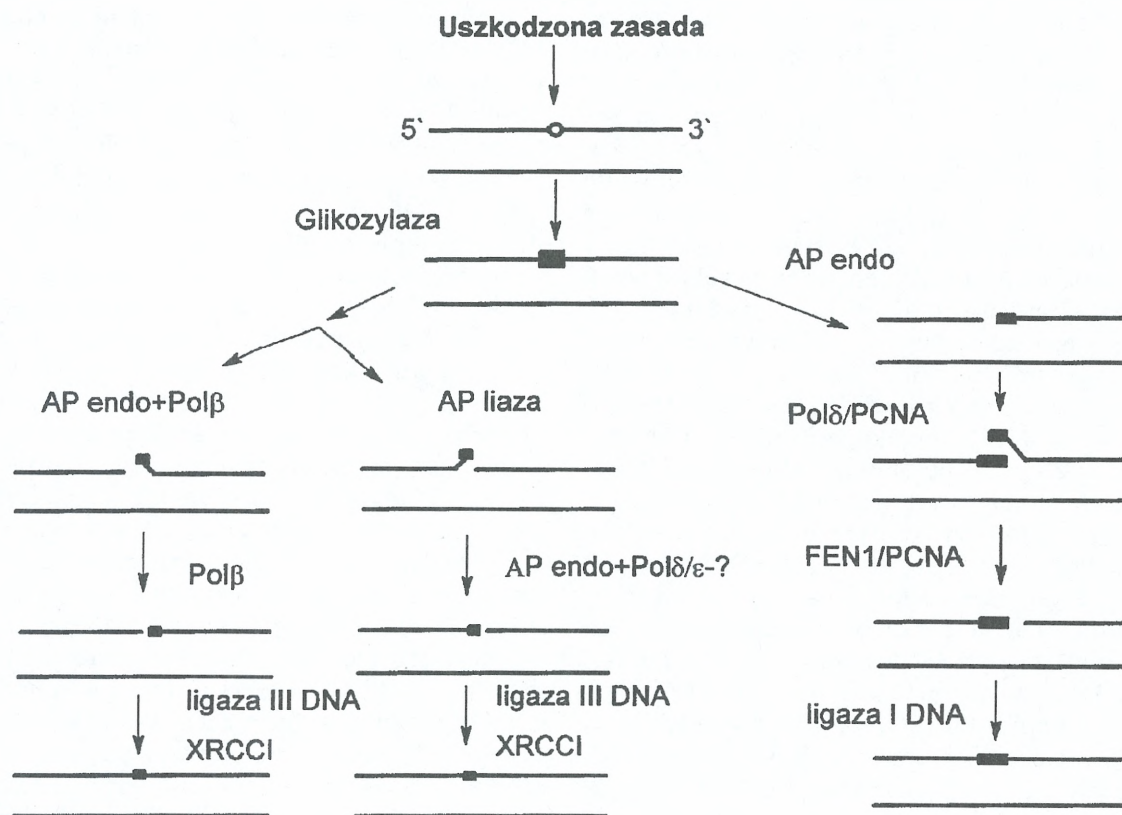
GLIKOZYLAZY 8-HYDROKSYGUANINY

Pierwszą opisaną glikozylazą 8-hydroksyguaniny jest formamidopirymidyno-DNA glikozylaza z *E. coli* (białko Fpg). Enzym ten znany jest od dawna, ale początkowo był wykryty jako białko naprawcze dla wtórnych uszkodzeń alkilacyjnych — 7-metyloguaniny z otwartym pierścieniem imidazolowym, to znaczy Fapy-7MeG (CHETSANGA i LINDAHL 1979). Pomimo sklonowania genu (BOITEUX i współaut. 1987) i otrzymania mutanta *E. coli*, *fpg* (BOITEUX i HUISMAN 1989) długo nie można było ustalić fenotypu mutanta i fizjologicznego substratu. Dopiero w 1991 r. okazało się, że sklonowany gen mutatorowy *E. coli* — *mutM*, którego niedobór powoduje wzrost specyficznych transwersji G:C→T:A, jest identyczny z genem *fpg* (MICHAELS i współaut. 1991).

Białko Fpg jest monomerycznym enzymem złożonym z 269 aminokwasów o masie cząsteczkowej 30,2 kD (BOITEUX i współaut. 1987). Enzym ma szerokie spektrum specyficzności substratowej wycinając z DNA oprócz 8OHG również puryny z otwartym pierścieniem imidazolowym (FapyA i FapyG), puryny z otwartym pierścieniem imidazolowym alkilowane w pozycji N7 lub C8 podstawnikami o różnej wielkości od małych grup metylowych i etylowych (TUDEK i współaut. 1998) do dużych adduktów, na przykład aflatoksyny B1 czy aminofluorenu (TUDEK 1993), a wreszcie niektóre utlenione pirymidyny, takie jak: 5OHU, 5OHC, dihydrotyminę (HATAHET i współaut. 1994) i produkt fragmentacji C5-hydratu tyminy (JURADO i współaut. 1998). Białko Fpg ma trzy aktywności enzymatyczne: glikozylazy, AP-liazy oraz deoksyrybofosfodiesterazy (dRpazy), a więc nie tylko usuwa zasadę, przecinając nić DNA w miejscu

uszkodzenia, ale może brać udział w naprawie miejsc apurynowych oraz być białkiem komplementarnym dla innych glikozylaz i AP-endonukleaz, które pozostawiają w DNA 5-fosfodeoksyrybozę pozbawioną zasady. Białko Fpg wycina 5-fosfodeoksyrybozę pozostawiając w DNA lukę, która może być następnie uzupełniana przez polimerazy DNA. Białko Fpg na C-końcu posiada 4 reszty cysteiny tworzące motyw palca cynkowego Cys-X2-Cys-X16-Cys-X2-Cys odpowiedzialnego za wiązanie enzymu do DNA (TCHOU i współaut. 1993). Wiąże się on z sześcioma zasadami nici zawierającej uszkodzenie i tylko jedną zasadą leżącą naprzeciw uszkodzenia w niezmięnionej nici komplementarnej (CA-STANG i współaut. 1999). Elementami rozpoznawanymi przez białko Fpg w DNA jest tlen w pozycji 8 guaniny lub grupa karbonylowa formamidopirymidyn (TCHOU i współaut. 1994). Ważna jest także sekwencja nukleotydów otaczająca uszkodzoną zasadę. Fapy-7MeG jest wydajniej naprawiana w długich ciągach reszt guanynowych niż w innych sekwencjach (GRAVES i współaut. 1992). Centrum aktywne enzymu zbudowane jest z 72 N-końcowych aminokwasów (TCHOU i GROLLMAN 1995), z których niezbędna do katalizy jest końcowa ośmioaminokwasowa sekwencja „PELPEVET” występująca we wszystkich znanych bakteryjnych glikozylazach 8-hydroksyguaniny (DUWAT i współaut. 1995). N-końcowa prolina-2, a nie reszta lizyny uczestniczy w katalizowanej reakcji i tworzy zasadę Schiffa z deoksyrybozą uszkodzonego nukleotydu uwalniając zasadę. Białko Fpg charakteryzuje się również nieco innym mechanizmem działania niż inne glikozylazy/AP-liazy, gdyż przecina miejsce apurynowe na drodze β-δ-eliminacji, co prowadzi do powstania jednokleotydowych luk w DNA zakończonych na 3'- i 5'-końcu resztą fosforanową, która musi być usunięta na końcu 3' przez specyficzne fosfatazy (ZHARKOV i współaut. 1997).

Udział Pro-2 w mechanizmie katalizy i tworzeniu kowalencyjnego intermediatu enzymu z deoksyrybozą DNA został jednoznacznie udokumentowany metodami chemicznymi, jednak zmutowane białko Fpg posiadające pojedyncze podstawienie Pro-2→Gly zachowywało słabą aktywność glikozylazową, chociaż jego zdolność do katalizowania reakcji β-eliminacji zanikała całkowicie. Inny mutant, Lys-57→Gly, przy pełnej zdolności katalizowania β-eliminacji, charakteryzował się obniżoną aktywnością glikozylazową. Otrzymano również trzeciego mutanta Pro-2→Glu, u którego zdolność do wycinania zasady i przecinania wiązań fosfoestrowych zanikała całkowicie, ale również struktura białka ulegała usztywnieniu (KUZNETSOV i współaut.



Ryc. 3. Końcowe etapy naprawy DNA przez wycinanie zasad w komórkach eukariotycznych. Usuwanie miejsc apurynowych i jednoniciowych przerw.

1998). Pomimo wielu lat intensywnych badań nad białkiem Fpg, do tej pory nie udało się otrzymać go w postaci krystalicznej i ustalić konformacji centrum aktywnego.

Glikozylazę o strukturze zbliżonej do białka Fpg, wycinającą z DNA 8OHG sklonowano u rzodkiewnika pospolitego (*Arabidopsis thaliana*) (OHTSUBO i współaut. 1998).

Funkcjonalne homologi białka Fpg u drożdży, człowieka i innych ssaków — rodzina białek OGG1 (ang. 8-oxoguanine glycosylase) nie wykazuje podobieństwa strukturalnego do odpowiednika bakteryjnego. Drożdżowy gen *ogg1* został sklonowany poprzez komplementację mutacji *fpg*, *mutY* u *E.coli* (AUFFRET van der KEMP i współaut. 1996). Gen jest zlokalizowany na chromosomie XIII *Sacharomyces cerevisiae*. Enzym o masie 43 kDa jest glikozylazą/AP-liazą wycinającą z dwuniciowego DNA 8OHG z następujących par nukleotydów 8OHG:C 8OHG:T>>8OHG:G, ale nie z pary 8OHG:A i przecinającą wiązanie fosfoestrowe na drodze β-eliminacji (AUFFRET van der KEMP i współaut. 1996). Okazało się, że powinowactwo białka OGG1 do miejsc apurynowych jest również zależne od zasady obecnej w nici komplen-

tarnej. Enzym najbardziej wydajnie tnie DNA w miejscach apurynowych znajdujących się na przeciw cytozyny (GIRARD i współaut. 1997). Drożdżowa glikozylaza OGG1 wycina z DNA jedynie pochodne guaniny — FapyG powstającą w procesach oksydacyjnych i to wydajniej niż 8OHG, ale nie FapyA (KARAHALIL i współaut. 1998). Obecność grupy metylowej w pozycji N7 Fapy-guaniny 10-krotnie zmniejsza efektywność wycinania (AUFFRET van der KEMP i współaut. 1996). W przeciwieństwie do bakteryjnego białka Fpg, drożdżowa glikozylaza OGG1 eliminuje również z DNA 8OHA, ale tylko wtedy, gdy jest ono sparowane z C i może dać początek mutacjom A→G (GIRARD i współaut. 1998). 8OHA jest błędnie parowana z C i daje początek tranzycjom A→G jedynie w komórkach eukariotycznych, aktywność OGG1 mogłaby stymulować powstawanie takich mutacji.

W drożdżowym białku OGG1, podobnie do wielu innych glikozylaz występuje konserwowany motyw HhH (postulowane aminokwasy 228–246). Lizyna-241 i Asp-260 są zaangażowane w mechanizmie katalizy. Zmutowane białko Liz-241→Gln było całkowicie niezdolne do wycinania 8OHG i tworzenia kowalencyjnych interme-

diatów z DNA, chociaż enzym nie tracił zdolności do tworzenia kompleksu z uszkodzonym DNA. Zastąpienie Liz-241 resztą argininy spowalniało katalizę enzymatyczną, ale jej nie znosiło (GIRARD i współaut. 1997). Porównując sekwencje bakteryjnych i eukariotycznych glikozylaz DNA wywnioskowano, że genetycznym przodkiem białka OGG1 jest prawdopodobnie endonukleaza III z *E. coli*, enzym zaangażowany w naprawę utlenionych zasad pirymidynowych (patrz: Naprawa utlenionych pirymidyn).

W kilku pracowniach sklonowano i scharakteryzowano ludzkie glikozylazy, odpowiedniki drożdżowego białka OGG1. Gen ludzkiej glikozylazy 8OHG jest zlokalizowany na chromosomie 3p25 i koduje białko o aktywności glikozylazy/AP-liazy z motywem HhH oraz resztami Liz i Asp identycznymi, jak w białku drożdżowym. Specyficzność substratowa względem 8OHG, Fapy-7MeG i miejsc apurynowych oraz mechanizm działania enzymu ludzkiego jest taki sam jak drożdżowego (RADICELLA i współaut. 1997, ROLDAN-ARJONA i współaut. 1997, ABURATAMI i współaut. 1997, BJORAS i współaut. 1997). W różnych pracowniach uzyskiwano jednak białka o różnej wielkości. Okazało się, że ludzka glikozylaza OGG1 jest kodowana przez 8 egzonów, a w komórkach występują 4 warianty „splicingowe” o następującej liczbie aminokwasów 345 (typ 1a), 324 (typ 1b), 410 (typ 1c), 424 (typ 2). Istnienie wariantów wynika ze zmiennego składowania egzonów 6–8 (ABURATAMI i współaut. 1997). Glikozylaza o długości 424 aminokwasów charakteryzowała się niepełną aktywnością AP-liazową, to znaczy ilość uwolnionej 8OHG była 10-krotnie wyższa niż ilość przerw w nici DNA (ROLDAN-ARJONA i współaut. 1997). Jedynie typ 1a posiada sekwencję odpowiedzialną za transport do jądra, pozostałe warianty mogą mieć inną lokalizację komórkową. Zaobserwowano, że w wielu tkankach ludzkich przeważającą ilościowo formą jest typ 1a i jest to prawdopodobnie podstawowa glikozylaza 8OHG u człowieka (MONDEN i współaut. 1999).

Nie jest pewne czy sklonowane enzymy o znanej sekwencji wyczerpują listę glikozylaz uczestniczących w naprawie 8OHG. Wcześniejsze doniesienia wskazywały na obecność w komórkach ludzkich dwóch innych białek — mo-

nofunkcyjnej glikozylazy 8OHG, która nie posiadała aktywności AP-liazowej oraz endonukleazy, która wycinała cały nukleotyd pozostawiając końce 3'- i 5'-OH (BESSHO i współaut. 1993). Nie jest również znana sekwencja ludzkiego białka OGG2 (HAZRA i współaut. 1998), a pochodzenie drożdżowego odpowiednika także nie jest jednoznacznie wyjaśnione (patrz: Naprawa utlenionych pirymidyn).

Wszystkie opisane enzymy są białkami jądrowymi, o czym świadczy zarówno obecność sygnału transportu do jądra wewnątrz sekwencji genu, jak i komórkowa lokalizacja fluoryzujących przeciwciał dla OGG1. W komórce mitochondria są miejscem szczególnie intensywnie przebiegających procesów oksydacyjnych, a oksydacyjne uszkodzenia zasad nagromadzają się z wiekiem raczej w DNA mitochondrialnym niż jądrowym. Uważa się również, że kumulacja uszkodzeń, a w konsekwencji mutacji w DNA mitochondrialnym jest odpowiedzialna za starzenie się i śmierć komórki. Do niedawna panowało powszechne przekonanie, że w mitochondriach nie ma naprawy DNA, co wynikało z obserwacji, że indukowane promieniowaniem UV dimery pirymidynowe nie były usuwane z DNA mitochondrialnego. Badania aktywności enzymatycznych w mitochondriach ujawniło, że potrafią one usuwać szereg oksydacyjnych uszkodzeń zasad purynowych i pirymidynowych (BOHR i DIANOV 1999). Ponieważ większość z tych enzymów nie została jeszcze sklonowana, nie jest zupełnie jasne czy są to białka wyłącznie mitochondrialne, czy też pełnią funkcje naprawcze jednocześnie w jądrach i mitochondriach. Z mitochondriów szczura oczyszczono glikozylazę/AP-liazę 8OHG, która wycina 8OHG i przecina nić DNA na drodze β -eliminacji. Białko to, nazwane MtODE, ma masę cząsteczkową 25 000–30 000 i wycina z dwuniciowego DNA 8OHG, ale nie Fapy-7MeG. Wydajność naprawy 8OHG jest różna w zależności od zasady, z którą uszkodzenie to zostało sparowane: C>>T, zaś pary 8OHG:G lub 8OHG:A są metabolizowane w ilościach śladowych (CROTEAU i współaut. 1997). Drożdżowy enzym NTG1, usuwający z DNA utlenione pirymidyny, jest innym przykładem potencjalnego enzymu mitochondrialnego (patrz: Naprawa utlenionych pirymidyn).

NAPRAWA UTLENIONYCH PIRYMIDYN

Pierwszą glikozylazą opisaną jako enzym naprawiający w DNA utlenione pirymidyny była endonukleaza III z *E. coli*, kodowana przez gen *nth* (WEISS i CUNNINGHAM 1985). Jest to mono-

meryczne białko o masie cząsteczkowej 23 kDa, zbudowane z 211 aminokwasów o znanej strukturze III-rzędowej i mechanizmie działania. Białko Nth jest wydłużoną cząsteczką posiada-

jącą głęboką szczelinę rozdzielającą dwie domeny o zbliżonej wielkości, z których jedna zawiera 6 odcinków spirali oraz centrum aktywne (aminokwasy 22–132), druga zawiera 4 spiralne odcinki należące zarówno do N-końca (aminokwasy 1–21), jak i do C-końca (aminokwasy 133–211) oraz żelazowo-siarkową grupę (4Fe-4S). Grupa (4Fe-4S) połączona jest z białkiem poprzez reszty cystein w sekwencji Cys-X6-Cys-X2-Cys-X5-Cys. Domena białka Nth zawierająca grupę (4Fe-4S) jest naładowana dodatnio i wiąże DNA wzdłuż długiej osi enzymu. Obszar kontaktu białka z DNA wynosi 46 Å. Grupa (4Fe-4S) wydaje się być zaangażowana w nakierowywaniu zasadowych aminokwasów biorących udział w katalizie do oddziaływania z DNA. Na dnie szczeliny znajduje się centrum aktywne w postaci konserwowanego motywu HhH (helix (aa. 107–113)-hairpin (aa. 114–118)-helix (aa. 119–120)). Utlenione pirymidyny aktywnie wyciągnięte przez enzym na zewnątrz podwójnej helisy DNA wiązane są przez oddziaływania wodorowe z hydrofilowymi aminokwasami fragmentu motywu HhH o strukturze spinki do włosów. Lys-120 i Asp-138 biorą udział w usuwaniu zasady i przecinaniu wiązania 3-fosfoestrowego w procesie β -eliminacji (KUO i współaut. 1992) (Ryc. 1).

Nth jest glikozylazą wycinającą z DNA wiele utlenionych pochodnych zasad pirymidynowych, takich jak: glikol tyminy, 5,6-dihydroksytyminę, glikol uracylu, 5,6-dihydroksyuracyl, 5-hydroksy-6-hydrouracyl (KATCHER i WALLACE 1983), a także 5-hydroksycytozynę, 5-hydroksyuracyl (HATAHET i współaut. 1994), 5,6-dihydrotyminę, 5-hydroksy-5-metylohydantoinę, 5-hydroksy-6-hydrotyminę, 5,6-dihydrouracyl, alloksan (DIZDAROGLU i współaut. 1993). Determinantą aktywności enzymatycznej Nth jest prawdopodobnie podstawnik w pozycji 5 zasady o odpowiednio dużych rozmiarach oraz zanik planarności pierścienia, co ma miejsce w wyniku nasycenia wiązania 5–6 w pirymidynach (DIZDAROGLU i współaut. 1993, HATAHET i współaut. 1994). W komórkach *E. coli* występuje również endonukleaza VIII, kodowana przez gen *nei* o podobnej do białka Nth aktywności enzymatycznej (MELAMEDE i współaut. 1994), która najprawdopodobniej jest enzymem „awaryjnym” dla komórki i może przejmować jego funkcje. Mutanty *nth* nie wykazują bowiem zwiększonej wrażliwości na promieniowanie jonizujące (CUNNINGHAM i WEISS 1985).

Strukturalne analogi białka Nth — rodzinę białek NTG (ang. endonuclease of thymine glycol), znaleziono w komórkach eukariotycznych *S. cerevisiae* (EIDE i współaut. 1996), *Schizosac-*

charomyces pombe (ROLDAN-ARJONA i współaut. 1996) i w komórkach ludzkich (ASPIMWALL i współaut. 1997, HILBERT i współaut. 1997). Wszystkie te białka zawierają dwie silnie konserwowane domeny — motyw HhH zaangażowany w proponowanym mechanizmie działania oraz żelazowo-siarkową grupę (4Fe-4S), przypuszczalnie zaangażowaną w wiązaniu DNA (KUO i współaut. 1992). Motyw (4Fe-4S) znaleziono we wszystkich białkach rodziny NTG, z wyjątkiem NTG1 z *S. cerevisiae* (EIDE i współaut. 1996). U *S. cerevisiae* istnieją dwa białka NTG o podobnej sekwencji i podobnie do bakteryjnego enzymu Nth w centrum aktywnym posiadające dwie zaangażowane w katalizie reszty aminokwasowe Liz i Asp (dla NTG1 — Liz 243, Asp 262; dla NTG2 — Liz 248, Asp 267). Enzymy te jednak różnią się między sobą: (i) lokalizacją genów w chromosomach — gen *ntg1* położony jest w chromosomie I, *ntg2* w chromosomie XV; (ii) obecnością motywu (4Fe-4S) — białko NTG2 posiada tę grupę, NTG1 nie; (iii) lokalizacją wewnątrzkomórkową — białko NTG2 jest enzymem odnajdowanym wyłącznie w jądrze komórkowym, podczas gdy NTG1 znaleziono i w jądrze i w mitochondriach; (iv) poziomem enzymu w odpowiedzi na stres oksydacyjny — białko NTG2 jest enzymem konstytutywnym, poziom NTG1 wzrasta pod wpływem działania na komórki drożdży czynników utleniających, a wreszcie; (v) specyficznością substratową (ALSETH i współaut. 1999). Obydwa enzymy naprawiają glikol tyminy, 5-hydroksyuracyl, 5-hydroksy-5-metylohydantoinę, 5-hydroksy-6-hydrouracyl, 5-hydroksy-6-hydrotyminę (SENTÜRKER i współaut. 1998), ale także puryny z otwartym pierścieniem imidazolowym, co różni je od odpowiednika bakteryjnego, który wydaje się być specyficzny jedynie wobec utlenionych pirymidyn. Ponieważ puryny z otwartym pierścieniem imidazolowym przypominają pirymidyny z dużymi grupami bocznymi, nie jest wykluczone, że białko NTG2 (strukturalny homolog Nth) posiada większą lub bardziej plastyczną szczelinę, w której mieści się centrum aktywne, niż białko Nth. NTG1 mniej wydajnie naprawia 5OHC, które jest dobrym substratem dla NTG2 i białka Nth (HATAHET i współaut. 1994). Z kolei NTG1 lepiej naprawia fotoprodukty cytozyny powstałe pod wpływem naświetlania UV niż NTG2 (ALSETH i współaut. 1999). Istnieją jednak kontrowersyjne dane na temat naprawy 8OHG przez białko NTG1. BRUNER i współaut. (1998) zaobserwowali, że produkt genu *ntg1* wycina 8OHG z pary 8OHG:A, podobnie jak białko OGG2, zaś unieczynnienie genu *ntg1* przez jego dysrupcję powoduje całkowity zanik

aktywności OGG2 w komórce i wzrost spontanicznych mutacji A:T→C:G. Autorzy proponowali, że białka NTG1 i OGG2 są kodowane przez ten sam gen w komórkach *S. cerevisiae*. SENTÜRKER i współaut. (1998) zaobserwowali z kolei, że NTG1 wycina 8OHG sparowaną jedynie z guaniną. Jednak kolejne badania przeprowadzone na oczyszczonych do homogenności preparatach białka NTG1, przez ALSETH i współaut. (1999) nie potwierdziły tego. Mutanty *ntg1*⁺ oraz *ntg2*⁺ wykazują charakter mutatorowy, przy czym podwójny mutant jest dużo silniej mutagenizowany czynnikami utleniającymi niż mutanty pojedyncze, co sugeruje, że funkcje obydwu białek uzupełniają się nawzajem i być może spełniają różne role w komórce. Lokalizacja wewnątrzkomórkowa obydwu enzymów mogłaby sugerować, że rolą NTG2 jest naprawa DNA jądrowego, zaś NTG1 uzupełniałby tę aktywność w stresie oksydacyjnym, w którym w mitochondriach wytwarzane są zwiększone ilości

ROS przekraczające pojemność naprawczą NTG2, jednak główną rolą NTG1 byłaby naprawa DNA mitochondrialnego (ALSETH i współaut. 1999). Analizując sekwencję aminokwasową enzymów i ich siłę wiązania DNA, ALSETH i współaut. (1999) zaproponowali również inny model, w którym NTG2 silniej wiążący DNA niż NTG1 byłby zdolny do wypierania histonów z kwasów nukleinowych i brałby udział w globalnej naprawie genomu. Słabsze wiązanie NTG1 z DNA i obecność domeny o charakterze kwasowym na C-końcu białka, sugeruje że może być ono zaangażowane w oddziaływanie białko-białko, na przykład z elementami systemu NER i brać udział w naprawie nici transkrybowanej. Wprawdzie jest to na razie jedynie model, obecnie wiele laboratoriów podjęło badania nad wzajemną interakcją pomiędzy szlakami naprawy przez wycinanie zasad (BER) oraz nukleotydów (NER).

KOŃCOWE ETAPY NAPRAWY PRZEZ WYCINANIE ZASAD

Po wycięciu uszkodzonej zasady w DNA pozostają miejsca pozbawione zasad lub nic zostaje przzerwana, gdy enzymem usuwającym uszkodzenie jest glikozylaza/AP-liaza. W komórkach eukariotycznych istnieje prawdopodobnie kilka szlaków kończących naprawę. Jeśli enzym biorący udział w naprawie był glikozylazą monofunkcyjną (np. glikozylaza uracylowa), endonukleaza HAP1 (Ape, Apex) (WISEMAN i współaut. 1995) przecina wiązanie fosfoestrowe od strony 5' miejsca AP pozostawiając 5'-fosfodeoksyrybozę i wolny koniec 3'OH (DEMPLE i HARRISON 1994). 5'-fosfodeoksyryboza jest następnie usuwana przez deoksyrybofosfodiesterazę (dRpazę), przez co wytwarzają się w naprawianej nici jednonukleotydowe luki. Jest to główny szlak przy naprawie 8OHG (DIANOV i współaut. 1998). Białko Fpg, jak jego eukariotyczne analogi — drożdżowe białko OGG1 i rybosomalne białko S3 z *Drosophila melanogaster* — mają dodatkowo aktywność dRpazy i z jednakową wydajnością działają na miejsca apurynowe nienaruszone, jak i przecięte przez AP-endonukleazę (SANDIGURSKY i współaut. 1997). W komórkach ssaków jednonukleotydowe luki są uzupełniane głównie przez polimerazę β , a końce łączone przez ligazę III (DIANOV i LINDAHL 1994, SINGHAL i współaut. 1995) (Ryc. 3a). Ostatnio wykazano, że polimeraza β ma również aktywność AP-liazy, a więc może wyciąć 5'-fosfodeoksyrybozę, a następnie uzupełnić lukę (PIERSEN i współaut. 1996), lub też

w odwrotnej kolejności — najpierw wstawić nukleotyd, a następnie wyciąć 5'-fosfodeoksyrybozę (SRIVASTAVA i współaut. 1998) (Ryc. 3). Jednonukleotydowe luki w DNA mogą być uzupełniane przez inne polimerazy (Ryc. 3B), gdyż w mysich komórkach pozbawionych aktywności polimerazy β , ponad połowa reszt 8OHG była naprawiana przez wstawienie jednego nukleotydu (DIANOV i współaut. 1998). Jednakże nie jest zupełnie jasne, które DNA polimerazy i ligazy są zaangażowane w tym procesie. Glikozylazy z grupy OGG i NTG, biorące udział w naprawie utlenionych zasad są jednocześnie AP-liazami przecinając wiązanie fosfoestrowe od strony 3' miejsca AP pozostawiając pozbawiony zasady zredukowany cukier (Ryc. 1), który musi być następnie wycięty przez AP-endonukleazę (Ryc. 3).

Istnieje alternatywny szlak naprawy przez wycinanie zasad, w którym wycinane i wstawiane jest kilka nukleotydów (Ryc. 3) (FROSINA i współaut. 1996). Po przecięciu miejsca AP przez AP-endonukleazę, polimeraza DNA najpierw wydłuża 3'-OH koniec w miejscu nacięcia o kilka nukleotydów (2–7) i „wypycha” fragment nici zakończony 5'-fosfodeoksyrybozą na zewnątrz podwójnej helisy. Taka „zwisająca” struktura jest wycinana przez specyficzną endonukleazę — FEN1, a fragmenty DNA są łączone przez ligazę (KLUNGLAND i LINDAHL 1997). W tym szlaku niezbędne są PCNA (proliferating cell nuclear antigen) oraz czynnik replikacyjny C

(RF-C) (Li i współaut. 1995). W rekonstruowanym układzie *in vitro* polimeraza β i δ były jednakowo wydajne w naprawie utlenionych zasad szlakiem kilkunukleotydowym. W komórkach

ssaków jedynie 25% reszt 8OHG w DNA jest naprawianych tą drogą, reszta przez jednokleotydowe luki (DIANOV i współaut. 1998).

CO SIĘ DZIEJE GDY W KOMÓRCIE BRAKUJE GLIKOZYLAZY?

W ważnych procesach metabolicznych, jakim jest również naprawa DNA, komórki często posiadają system „awaryjny” lub uzupełniający. Systemem uzupełniającym dla glikozylaz naprawiających uszkodzenia oksydacyjne zasad DNA jest NER. Wykazano, że bakteryjna UvrABC endonukleaza w rekonstruowanym systemie *in vitro* naprawia glikol tyminy (LIN i SANCAR 1989). Glikol tyminy jest również naprawiany przez NER w komórkach ludzkich, a białko XPG bierze udział w tworzeniu kompleksu niezbędnego do nacinania nici DNA zarówno w systemie NER, jak i BER. [Białko XPG jest jednym z białek systemu NER, zmutowane w chorobie żółtej pergaminowatej skóry (*Xeroderma pigmentosum*, grupa komplementacyjna G) charakteryzującej się zwiększoną wrażliwością na światło UV i wczesnym powstawaniem nowotworów skóry]. Wyróżnia się dwa możliwe szlaki: (i) szlak szybki, związany z preferencyjną naprawą nici transkrybowanej wymagający oddziaływania białek XPG, oraz specyficznych dla naprawy nici transkrybowanej białek CSB lub CSA (CSB, CSA — białka zmutowane w syndromie Cockneya, grupa komplementacyjna A lub B) oraz glikozylazy/AP-liazy; (ii) szlak związany z globalną naprawą genomu, który wymaga białka XPG oraz glikozylazy/AP-liazy (Le PAGE i współaut. 1999). Wydaje się, że 8OHG również podlega naprawie przez NER, chociaż nie udało się tego wykazać w rekonstruowanych syste-

mach *in vitro*. Istnieje jednak szereg danych pośrednich. U *E. coli* przeżycie bakterii z plazmidami zawierającymi 8OHG uwarunkowane było obecnością w komórce enzymów albo UvrABC endonukleazy (NER) albo Fpg (BER) (CZECZOT i współaut. 1991). U drożdży zaś przeżycie zależało głównie od NER (SCOTT i współaut. 1999). W komórkach CSB częstość mutacji pojedynczej reszty 8OHG znajdującej się na nici transkrybowanej była około 20-krotnie wyższa niż w normalnych komórkach, co sugeruje że być może glikozylaza OGG1 jest rekrutowana przez białko CSB do kompleksu transkrypcyjnego (Le PAGE i współaut. 1999).

Czy BER i NER potrafią się całkowicie komplementować pozostaje jednak sprawą otwartą. W niektórych nowotworach (płuc, nerki) znaleziono zmutowane białka OGG1 i postulowano, że ich brak może być przyczyną powstawania mutacji w onkogenach lub genach supresorowych i prowadzić do transformacji nowotworowej (CHEVILLARD i współaut. 1998). Z drugiej strony udało się uzyskać myszy z nieaktywnym białkiem OGG1, które dożyły już półtora roku (SEEBERG, informacja ustna), co świadczy że naprawa 8OHG przez OGG1 może być zastępowana przez inne systemy. Charakterystyka tych myszy dostarczy więcej informacji na temat konsekwencji obecności 8OHG w DNA ssaków.

MECHANISMS OF OXYDIZED DNA BASES REPAIR

Summary

Reactive oxygen species induce DNA damage that is implied in mutagenesis, carcinogenesis and aging, but deleterious effects of this damage can be abolished by DNA repair. Two main pathways of excision repair function in cells to restore DNA integrity: base excision repair (BER) and nucleotide excision repair (NER). The main pathway to repair oxidised bases is BER and this pathway is initiated by DNA glycosylases. Glycosylases that participate in repairing most abundant oxidative base damages 8-hydroxyguanine and thymine glycol are bifunctional enzymes, which excise the base and make DNA strand scission. The catalytic mechanism involves formation of intermediate Schiff base between an amino group of basic amino-acid in the enzyme active center and an anomeric carbon atom of deoxyribose of damaged nucleotide, followed by release of the base and strand scission by β -elimination. All bacterial 8OHG-DNA glycosylases are zinc finger proteins with char-

acteristic N-terminal PELPEVET sequence, in which Pro-2 is engaged in catalysis. Eukaryotic 8OHG-DNA glycosylases, the family of OGG proteins, represent different primary structure and internal lysine residue is involved in base elimination and strand scission, by β -elimination. The active centre and mechanism of catalysis of glycosylases repairing thymine glycol and other oxidised pyrimidines, the family of bacterial endonuclease III or Nth protein and eukaryotic NTG proteins, is similar to OGG proteins and internal Lys and Asp participate in the reaction. Nth and NTG2, but not NTG1 proteins, have (4Fe-4S) cluster responsible for DNA binding. NTG1 is probably a mitochondrial enzyme and mitochondrial 8OHG-glycosylase is also described. The backup system for repair of TG and 8OHG is NER. Interaction of NER proteins participating in repair of transcribed strand and repair of global genome with DNA glycosylases is discussed.

LITERATURA

- ABUTARANI H., HIPPO Y., ISHIDA T., TAKASHIMA R., MATSUBA C., KODAMA T., TAKAO M., YASUI A., YAMAMOTO K., ASANO M., FUKASAWA K., YOSHINARI T., INOUE H., OHTSUKA E., NISHIMURA S. 1997. Cloning and characterization of mammalian 8-hydroxyguanine-specific DNA glycosylase/apurinic, apyrimidinic lyase, a functional MutM homologue. *Cancer Res.* 57, 2151–2156.
- ALSETH I., EIDE L., PIROVANO M., ROGNES T., SEEBERG E., BJØRAS M. 1999. The *Saccharomyces cerevisiae* homologues of endonuclease III from *Escherichia coli*, *Ntg1* and *Ntg2*, are both required for efficient repair of spontaneous and induced oxidative DNA damage in yeast. *Mol. Cell. Biol.* 19, 3779–3787.
- AMES B. N., GOLD L. S., WILLETT W. C. 1995. The causes and prevention of cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92, 5258–5265.
- ASPINWALL R. D., ROTHWELL D. G., ROLDAN-ARJONA T., ANSELMINO C., WARD C. J., CHEADLE J. P., SAMPSON R. J., LINDAHL T., HARRIS P. C., HICKSON I. D. 1997. Cloning and characterisation of a functional human homolog of *Escherichia coli* endonuclease III. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94, 109–114.
- AUFFRET van der KEMP P., THOMAS D., BARBEY R., DE OLIVEIRA R., BOITEUX S. 1996. Cloning and expression in *Escherichia coli* of the OGG1 gene of *Saccharomyces cerevisiae*, which codes for a DNA glycosylase that excises 7,8-dihydro-8-oxoguanine and 2,6-diamino-4-hydroxy-5-N-methylformamidopyrimidine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93, 5197–5202.
- BESSHO T., TANO K., KASAI H., OHTSUKA E., NISHIMURA S. 1993. Evidence for two DNA repair enzymes for 8-hydroxyguanine (7,8-dihydro-8-oxoguanine) in human cells. *J. Biol. Chem.* 268, 19416–19421.
- BJØRAS M., LUNA L., JOHNSEN B., HOFF E., HAUG T., ROGNES T., SEEBERG E. 1997. Opposite base-dependent reactions of a human base excision repair enzyme on DNA containing 7,8-dihydro-8-oxoguanine and abasic sites. *EMBO J.* 16, 6314–6322.
- BOITEUX S., HUISMAN O. 1989. Isolation of a formamidopyrimidine-DNA glycosylase (*fpg*) mutant of *Escherichia coli* K12. *Mol. Gen. Genet.* 215, 300–305.
- BOITEUX S., O'CONNOR T. R., LAVAL J. 1987. Formamidopyrimidine DNA glycosylase of *E. coli*: cloning and sequencing of the *fpg* structural gene and overproduction of the protein. *EMBO J.* 6, 3177–3183.
- BOHR V. A., DIANOV G. L. 1999. Oxidative DNA damage processing in nuclear and mitochondrial DNA. *Biochimie* 81, 155–160.
- BORYS E., MROCZKOWSKA-SŁUPSKA M. M., KUŚMIEREK J. T. 1994. The induction of adaptive response to alkylating agents in *Escherichia coli* reduces the frequency of specific C→T mutations in chloroacetaldehyde-treated M13 glyU phage. *Mutagenesis* 9, 407–410.
- BRUNER S. D., NASH H. M., LANE W. S., VERDINE G. L. 1998. Repair of oxidatively damaged guanine in *Saccharomyces cerevisiae* by an alternative pathway. *Curr. Biol.* 8, 393–403.
- BURCHAM P. C. 1998. Genotoxic lipid peroxidation products: their DNA damaging properties and role in formation of endogenous DNA adducts. *Mutagenesis* 13, 287–305.
- CABRERA M., NGHIEM Y., MILLER J. H. 1988. *mutM*, a second mutator locus in *Escherichia coli* that generates G.C→T.A transversions. *J. Bacteriol.* 170, 5405–5407.
- CASTAING B., GEIGER A., SELIGER H., NEHLS P., LAVAL J., ZELWER C., BOITEUX S. 1993. Cleavage and binding of a DNA fragment containing a single 8-oxoguanine by wild type and mutant FPG proteins. *Nucleic Acids Res.* 21, 2899–2905.
- CASTAING B., FOURREY J. L., HERVOUET N., THOMAS M., BOITEUX S., ZELWER C. 1999. AP site structural determinants for Fpg specific recognition. *Nucleic Acids Res.* 27, 608–615.
- CHETSANGA C. J., LINDAHL T. 1979. Release of 7-methylguanine residues whose imidazole rings have been opened from damaged DNA by a DNA glycosylase from *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res.* 6, 3673–3683.
- CHEVILLARD S., RADICELLA J. P., LEVALOIS C., LEBEAU J., POUPON M. F., OUDARD S., DUTRILLAUX B., BOITEUX S. 1998. Mutations in OGG1, a gene involved in the repair of oxidative DNA damage, are found in human lung and kidney tumours. *Oncogene* 16, 3083–3086.
- CROTEAU D. L., RHYS C. M. J., HUDSON E. K., DIANOV G. L., HANSFORD R. G., BOHR V. A. 1997. An oxidative damage-specific endonuclease from rat liver mitochondria. *J. Biol. Chem.* 272, 27338–27344.
- CUNNINGHAM R. P., WEISS B. 1985. Endonuclease III (*nth*) mutants of *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82, 474–478.
- CZECZOT H., TUDEK B., LAMBERT B., LAVAL J., BOITEUX S. 1991. *Escherichia coli* Fpg protein and UvrABC endonuclease repair DNA damage induced by methylene blue plus visible light in vivo and in vitro. *J. Bacteriol.* 173, 3419–3424.
- DEMPLE B., HARRISON L. 1994. Repair of oxidative damage to DNA: Enzymology and biology. *Annu. Rev. Biochem.* 63, 915–948.
- DIANOV G., LINDAHL T. 1994. Reconstitution of the base excision repair pathway. *Curr. Biol.* 4, 1069–1074.
- DIANOV G., BISCHOFF C., PIOTROWSKI J., BOHR V. A. 1998. Repair pathways for processing of 8-oxoguanine in DNA by mammalian cell extracts. *J. Biol. Chem.* 273, 33811–33816.
- DIZDAROGLU M., LAVAL J., BOITEUX S. 1993. Substrate specificity of the *Escherichia coli* endonuclease III: excision of thymine- and cytosine-derived lesions in DNA produced by radiation-generated free radicals. *Biochemistry* 32, 12105–12111.
- DODSON M. L., MICHAELS M. L., LLOYD R. S. 1994. Unified catalytic mechanism for DNA glycosylases. *J. Biol. Chem.* 269, 32709–32712.
- DUWAT P., OLIVEIRA R., EHRLICH S. D., BOITEUX S. 1995. Repair of oxidative DNA damage in Gram-positive bacteria: the *Lactococcus lactis* Fpg protein. *Microbiology* 141, 411–417.
- EIDE L., BJØRAS M., PIROVANO M., ALSETH K., BERDAL G., SEEBERG E. 1996. Base excision of oxidative purine and pyrimidine DNA damage in *Saccharomyces cerevisiae* by a DNA glycosylase with sequence similarity to endonuclease III from *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 10735–10740.
- EVANS J., MACCABEE M., HATAHET Z., COURCELLE J., BOCKRATH R., IDE H., WALLACE S. S. 1993. Thymine ring saturation and fragmentation products: lesion bypass, misinsertion and implications for mutagenesis. *Mutation Res.* 299, 147–156.
- FRAGA C. G., SHIGENAGA M. K., PARK J. W., DEGAN P., AMES B. N. 1990. Oxidative damage to DNA during aging: 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in rat organ DNA and urine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87, 4533–4537.
- FROSINA G., FORTINI P., ROSSI O., CARROZZINO F., RASPAGLIO G., COX L. S., LANE D. P., ABBONDANDOLO A., DOGLIOTTI E. 1996. Two pathways for base excision repair in mammalian cells. *J. Biol. Chem.* 271, 9573–9578.
- FUJIKAWA K., KAMIYA H., KASAI H. 1998. The mutations induced by oxidatively damaged nucleosides, 5-formyl-

- dUTP and 5-hydroxy-dCTP in *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res.* 26, 4582–4587.
- GIRARD P.-M., GUIBOUT N., BOITEUX S. 1997. The *Ogg1* protein of *Saccharomyces cerevisiae*: a 7,7-dihydro-8-oxoguanine DNA glycosylase/AP lyase whose lysine 241 is a critical residue for catalytic activity. *Nucleic Acids Res.* 25, 3204–3211.
- GIRARD P.-M., DHAM C., CADET J., BOITEUX S. 1998. Opposite base-dependent excision of 7,8-dihydro-8-oxoadenine by the *Ogg1* protein of *Saccharomyces cerevisiae*. *Carcinogenesis* 19, 1299–1305.
- GRAVES R., LAVAL J., PEGG A. E. 1992. Sequence specificity of DNA repair by *Escherichia coli* Fpg protein. *Carcinogenesis* 13, 1455–1459.
- GRAZIEWICZ M.-A., ZASTAWNY T. H., OLIŃSKI R., TUDEK B. 1999. SOS-dependent AG transitions induced by hydroxyl radical generating system hypoxanthine/xanthine oxidase/Fe+3/EDTA are accompanied by the increase of Fapy-adenine content in M13mp18 phage DNA. *Mutation Res.* 434, 41–52.
- HATAHET Z., KOW Y. W., PURMAL A. A., CUNNINGHAM R. P., WALLACE S. S. 1994. New substrates for old enzymes. 5-Hydroxy-2-deoxycytidine and 5-hydroxy-2-deoxyuridine are substrates for *Escherichia coli* endonuclease III and formamidopyrimidine DNA glycosylase, while 5-hydroxy-2-deoxyuridine is a substrate for uracil DNA glycosylase. *J. Biol. Chem.* 269, 18814–18820.
- HAYAKAWA H., TAKETOMI A., SAKUMI K., KUWANO M., SEKIGUCHI M. 1995. Generation and elimination of 8-oxo-7,8-dihydro-2-deoxyguanosine 5-triphosphate, a mutagenic substrate for DNA synthesis, in human cells. *Biochemistry* 34, 89–95.
- HAZRA T. K., IZUMI T., MAIDT L., FLOYD R. A., MITAR S. 1998. The presence of two distinct 8-oxoguanine repair enzymes in human cells: their potential complementary roles in preventing mutations. *Nucleic Acids Res.* 26, 5116–5122.
- HILBERT T. P., CHAUNG W., BOORSTEIN R. J., CUNNINGHAM R. P., TEEBOR G. W. 1997. Cloning and expression of the cDNA encoding the human homologue of the DNA repair enzyme, *Escherichia coli* endonuclease III. *J. Biol. Chem.* 272, 6733–6740.
- JURADO J., SAFARBAEV M., MATRAY T. J., GREENBERG M. M., LAVAL J. 1998. The ring fragmentation product of thymine C5-hydrate when present in DNA is repaired by the *Escherichia coli* Fpg and Nth proteins. *Biochemistry* 26, 7757–7763.
- KKMIYA H., KASAI H. 1997. Mutations induced by 2-hydroxyadenine on a shuttle vector during leading and lagging strand synthesis in mammalian cells. *Biochemistry* 36, 11125–11130.
- KKMIYA H., MIURA H., MURATA-KKMIYA N., ISCHIKAWA H., SAKAGUCHI T., INOUE H., SASAKI T., MASUTANI C., HANAOKA F., NISHIMURA S., OHTSUKA E. 1995. 8-hydroxyadenine (7,8-dihydro-8-oxoadenine) induces misincorporation in *in vitro* DNA synthesis and mutations in NIH 3T3 cells. *Nucleic Acids Res.* 23, 2893–2899.
- KARAHALIL B., GIRARD P.-M., BOITEUX S., DIZDAROGLU M. 1998. Substrate specificity of the *Ogg1* protein of *Saccharomyces cerevisiae*: excision of guanine lesions produced in DNA by ionizing radiation- or hydrogen peroxide/ metal ion-generated free radicals. *Nucleic Acids Res.* 26, 1228–1232.
- KATCHER H. L., WALLACE S. S. 1983. Characterisation of the *Escherichia coli* X-ray endonuclease, endonuclease III. *Biochemistry* 22, 4071–4081.
- KLUNGLAND A., 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.
- KROKAN H. E., STANDAL R., SLUPPHAUG G. 1997. DNA glycosylases in the base excision repair. *Biochem. J.* 325, 1–16.
- KUO C. F., MCREE D. E., FISHER C. L., OHANDLEY S. F., CUNNINGHAM R. P., TAINER J. A. 1992. Atomic structure of the DNA repair (4Fe-4S) enzyme endonuclease III. *Science*, 258, 434–440.
- KUZNETSOV S. V., SIDORKINA O. M., JURADO J., BAZIN M., TAUC P., BROCHON J.-C., LAVAL J. 1998. Effect of single mutations on the structural dynamics of a DNA repair enzyme, the *Escherichia coli* formamidopyrimidine-DNA glycosylase. A fluorescence study using tryptophan residues as reporter groups. *Eur. J. Biochem.* 253, 413–420.
- Le PAGE F., GENTIL A., SARASIN A. 1999. Repair and mutagenesis survey of 8-hydroxyguanine in bacteria and human cells. *Biochimie*, 81, 147–153.
- LI X., LI J., HARRINGTON J., LIEBER M. R., BURGERS P. M. 1995. Lagging strand DNA synthesis at the eucaryotic replication fork involves binding and stimulation of FEN-1 by proliferating cell nuclear antigen. *J. Biol. Chem.* 270, 22109–22112.
- LIN J.-J., SANCAR A. 1989. A new mechanism for repairing oxidative damage to DNA: (A)BC excinuclease removes AP sites and thymine glycols from DNA. *Biochemistry*, 28, 7979–7984.
- MAKI H., SEKIGUCHI M. 1992. MutT protein specifically hydrolyses a potent mutagenic substrate for DNA synthesis. *Nature (London)* 355, 273–275.
- MELAMEDE R. J., HATAHET Z., KOW Y. W., IDE H., WALLACE S. S. 1994. Isolation and characterisation of endonuclease VIII from *Escherichia coli*. *Biochemistry* 33, 1255–1264.
- MI J. L., MAHL E., CHAUNG W., BOORSTEIN R. J. 1997. Lack of phenotypic alteration of hmUra DNA glycosylase-deficient hamster cells exposed to DNA damaging lesions. *Mutation Res.* 374, 287–295.
- MICHAELS M. L., PHAM L., CRUZ C., MILLER J. H. 1991. MutM, a protein that prevents G.C→T.A transversions, is formamidopyrimidine-DNA glycosylase. *Nucleic Acids Res.* 19, 3629–3632.
- MICHAELS M. L., CRUZ C., GROLLMAN A. P., MILLER J. H. 1992. Evidence that MutY and MutM combine to prevent mutations by an oxidatively damaged form of guanine in DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 7022–7025.
- MONDEN Y., ARAI T., ASANO M., OHTSUKA E., ABUTARANI H., NISHIMURA S. 1999. Human MMH (OGG1) type 1a protein is a major enzyme for repair of 8-hydroxyguanine lesions in human cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 258, 605–610.
- MORIYA M. 1993. Single stranded shuttle phagemid for mutagenesis studies in mammalian cells: 8-oxoguanine in DNA induces targeted GCTA transversions in simian kidney cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 1122–1126.
- MORIYA M., ZHANG W., JOHNSON F., GROLLMAN A. P. 1994. Mutagenic potency of exocyclic DNA adducts: marked differences between *Escherichia coli* and simian kidney cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 11899–11903.
- NASH H. H., BRUNER S. D., SCHREY O. D., KAWATE T., ADDONA T. A., SPOONER E., LANE W. S., VERDINE G. L. 1996. Cloning of a yeast 8-oxoguanine DNA glycosylase reveals the existence of a base-excision DNA-repair protein superfamily. *Curr. Biol.* 6, 968–980.
- NGHIEM Y., CABRERA M., CUPPLES C. G., MILLER J. H. 1988. The mutY gene: a mutator locus in *Escherichia coli* that generates GCTA transversions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85, 2709–2713.
- OHTSUBO T., MATSUDA O., IBA K., TERASHIMA I., SEKIGUCHI M., NAKABEPPU Y. 1998. Molecular cloning of AtMMH, an *Arabidopsis thaliana* ortholog of the *Escherichia coli* mutM gene, and analysis of functional domains of its product. *Mol. Gen. Genet.* 259, 577–590.
- PANDYA G. A., MORIYA M. 1996. 1,N⁶-ethenodeoxyadenosine, a DNA adduct highly mutagenic in mammalian cells. *Biochemistry* 35, 11487–11492.
- PIERSEN C. E., PRASAD R., WILSON S. H., LLOYD R. S. 1996. Evidence for an imino intermediate in the DNA polymer-

- ase beta deoxyribose phosphate excision reaction. *J. Biol. Chem.* 271, 17811-17815.
- PURMAL A. A., KOW Y. W., WALLACE S. S. 1994. Major oxidative products of cytosine, 5-hydroxycytosine and 5-hydroxyuracil exhibit sequence context-dependent mispairing in vitro. *Nucleic Acids Res.* 22, 72-78.
- RADICELLA J. P., DHERIN C., DESMAZE C., FOX M. S., BOITEUX S. 1997. Cloning and characterization of hOGG1, a human homolog of the OGG1 gene of *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94, 8010-8015.
- ROLDAN-ARJONA T., ANSELMINO C., LINDAHL T. 1966. Molecular cloning and functional analysis of a *Schizosaccharomyces pombe* homologue of *Escherichia coli* endonuclease III. *Nucleic Acids Res.* 24, 3307-3312.
- ROLDAN-ARJONA T., WEI Y. F., CARTER K. C., KLUNGLAND A., ANSELMINO C., WANG R. -P., AUGUSTUS M., LINDAHL T. 1997. Molecular cloning and functional expression of a human cDNA encoding the antimutator enzyme 8-hydroxyguanine-DNA glycosylase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 8016-8020.
- ROUET P., ESSIGMAN J. M. 1985. Possible role of thymine glycol in the selective inhibition of DNA synthesis on oxidised DNA templates. *Cancer Res.* 45, 6113-6118.
- SAKUMI K., FURUICHI M., TSUZUKI T., KAKUMA T., KAWABATA S.-i., MAKI H., SEKIGUCHI M. 1993. Cloning and expression of cDNA for a human enzyme that hydrolyzes 8-oxo-dGTP, a mutagenic substrate for DNA synthesis. *J. Biol. Chem.* 268, 23524-23530.
- SANDIGURSKY M., YACOB A., KELLEY M. R., XU Y., FRANKLIN W. A., DEUTSCH W. A. 1997. The yeast 8-oxoguanine DNA glycosylase (Ogg1) contains a DNA deoxyribosephosphodiesterase (dRpase) activity. *Nucleic Acids Res.* 25, 4557-4561.
- SCOTT A. D., NEISHABURY M., JONES D. H., REED S. H., BOITEUX S., WATERS R. 1999. Spontaneous mutation, oxidative DNA damage, and the roles of base and nucleotide excision repair in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 15, 205-218.
- Sentürker S., AUFFRET van der KEMP P., YOU H. J., DOETSCH P. W., DIZDAROGLU M., BOITEUX S. 1998. Substrate specificities of the Ntg1 and Ntg2 proteins of *Saccharomyces cerevisiae* for oxidized DNA bases are not identical. *Nucleic Acids Res.* 26, 5270-5276.
- SHIBUTANI S., SUZUKI N., MATSUMOTO Y., GROLLMAN A. P. 1996. Miscoding properties of 3,N4-etheno-2'-deoxycytidine in reactions catalyzed by mammalian DNA polymerases. *Biochemistry* 35, 14992-14998.
- SHIBUTANI S., TAKESHITA M., GROLLMAN A. P. 1991. Insertion of specific bases during DNA synthesis past the oxidation-damaged base 8-oxodG. *Nature (London)* 349, 431-434.
- SINGHAL R. K., PRASAD R., WILSON S. H. 1995. DNA polymerase beta conducts the gap-filling step in uracil-initiated base excision repair in a bovine testis nuclear extract. *J. Biol. Chem.* 270, 949-957.
- SLUPSKA M. M., BAIKALOV C., LUTHER W. M., CHIANG J. H., WEI Y. F., MILLER J. H. 1996. Cloning and sequencing a human homolog (hMYH) of the *Escherichia coli* mutY gene whose function is required for the repair of oxidative DNA damage. *J. Bacteriol.* 178, 3885-3892.
- SRIVASTAVA D. K., BERG B. J., PRASAD R., MOLINA J. T., BEARD W. A., TOMKINSON A. E., WILSON S. H. 1998. Mammalian abasic site excision repair. Identification of the reaction sequence and rate determining steps. *J. Biol. Chem.* 273, 21203-21209.
- SUN B., LATHAM K. A., DODSON M. L., LLOYD R. S. 1995. Studies on the catalytic mechanism of five DNA glycosylases. *J. Biol. Chem.* 270, 19501-19508.
- TCHOU J., MICHAELS M. L., MILLER J. H., GROLLMAN A. P. 1993. Function of the zinc finger in *Escherichia coli* Fpg protein. *J. Biol. Chem.* 268, 26738-26744.
- TCHOU J., GROLLMAN A. P. 1995. The catalytic mechanism of Fpg protein. *J. Biol. Chem.* 270, 11671-11677.
- TCHOU J., BODEPUDI V., SHIBUTANI S., ANTOSHECHKIN I., MILLER J., GROLLMAN A. P., JOHNSON F. 1994. Substrate specificity of Fpg protein. *J. Biol. Chem.* 269, 15318-15324.
- TUDEK B. 1993. Utleńianie puryn - źródło mutacji spontanicznych. *Post. Bioch.* 39, 91-99.
- TUDEK B., VANZEELAND A. A., KUŚMIEREK J. T., LAVAL J. 1998. Activity of *Escherichia coli* DNA-glycosylases on DNA damaged by methylating and ethylating agents and influence of 3-substituted adenine derivatives. *Mutation Res.* 407-169-186.
- WEISS B., CUNNINGHAM R. P. 1985. Genetic mapping of nth, a gene affecting endonuclease III (thymine glycol-DNA glycosylase) in *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.* 162, 607-610.
- WEITZMAN S. A., TURK U. W., MILKOWSKI D. H., KOZŁOWSKI K. 1994. Free radical adducts induce alterations in DNA cytosine methylation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 1261-1264.
- WISEMAN H., KAUR H., HALLIWELL B. 1995. DNA damage and cancer: measurement and mechanism. *Cancer Lett.* 93, 113-120.
- YANOFSKY C., COX E. C., HORN V. 1966. The unusual mutagenic specificity of an *E. coli* mutator gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 55, 274-281.
- ZHANG W., JOHNSON F., GROLLMAN A. P., SHIBUTANI S. 1995. Miscoding by the exocyclic and related DNA adducts 3,N4-etheno-2'-deoxycytidine, 3,N4-ethano-2'-deoxycytidine, and 3-(2-hydroxyethyl)-2'-deoxyuridine. *Chem. Res. Toxicol.* 8, 157-163.
- ZHARKOV D. O., RIEGER R. A., IDEN C. R., GROLLMAN A. P. 1997. NH2-terminal proline acts as a nucleophile in the glycosylase/AP-lyase reaction catalyzed by *Escherichia coli* formamidopyrimidine-DNA glycosylase (Fpg) protein. *J. Biol. Chem.* 272, 5335-5341.