

dc_68_10

**A károsított DNS replikációjában szerepet játszó enzimek és
mechanizmusok jellemzése eukarióta sejtekben**

MTA doktori értekezés tézisei

Haracska Lajos, Ph.D.

MTA Szegedi Biológiai Központ

Genetikai Intézet

Szeged

2010

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönet illeti mindazokat, akik hozzájárultak ahhoz, hogy kutató lettem. Nagyon sokan vannak és elnézést kérek, de nem sorolhatok fel mindenkit.

Tatai gimnazista koromból kiemelem kémiatanáromat, **Maknics Gyulát**, és fizikatanáromat, **Mészáros Andrást**, akiknek elhittem, hogy van keresnivalóm a természettudományos pályán.

Már első éves szegedi biológus hallgatóként megérintett az MTA Szegedi Biológiai Központjának tudományos légköre, ahol érződött a levegőben, hogy a tekintély alapja a tudás és nem a beosztás vagy a kor – ebből a szempontból az SZBK akkoriban unikum volt Magyarországon. Szerencsésnek gondolom magam, hogy **Udvardy Andor** laboratóriumába jelentkeztem szakdolgozónak az SZBK Biokémiai Intézetébe. Fantasztikus élmény volt az egyetemi éveim elején rögtön nemzetközi színvonalú kutatásba csöppenni és érezni, hogy lehetőségem van felfedezni valamit. Köszönöm Udvardy Andornak, hogy személyesen tanított meg pipettázni, klónozni, fehérjét tisztítani, és hogy mindig szánt időt kísérleteim megvitatására. Itt tanultam meg igazán kitartóan kísérletezni, hinni abban, hogy ha mindent beleadunk akkor előbb utóbb működni fognak a kísérletek, hiszen mint mondta ”a természetben nincsenek csodák csak rosszul elvégzett kísérletek”.

A másik életre szóló hatás **Satya Prakash** laboratóriumában ért posztdoktorként Amerikában az University of Texas Medical Branch kutatóintézetben. Azon felül, hogy mindent biztosított a produktív kutatáshoz, különösen hálás vagyok Satya Prakash-nak, mert engedett betekinteni abba is, hogy nemzetközi szintéren hogyan lehet sikeres egy kutató.

Köszönöm **Raskó Istvánnak**, hogy most itt az SZBK Genetikai Intézetében dolgozom. Az intézet igazgatójaként hívott haza az USA-ból csoportvezetőnek és szavát állva, folyamatosan egyengette kutatócsoportom fejlődését. Határozott vezetői stílusából is sokat tanultam. A Genetikai Intézet számos munkatársának is megköszönöm, hogy segítettek a mai szintre fejleszteni csoportom kutatásait.

Köszönet illeti a Mutagenézis és Karcinogenezis kutatócsoportom jelenlegi és volt tagjait. Már harminc körül jár azoknak a száma, akik megfordultak a laborban ezért inkább kiemelés nélkül említem meg, hogy rengeteget tanultam tőlük és számos tudományos ötlet, hipotézis, és eredmény nem született volna meg nélkülük.

Végül, de nem utolsósorban, megkülönböztetett köszönet jár családomnak. Édesanyámnak, édesapámnak, és húgomnak, akik bármit is akartam, mindig tiszta szívből támogattak. Ez a háttérből sugárzó belém vetett hit soha nem engedte, hogy akár csak megforduljon a fejemben, hogy befejezetlenül hagyjak valamit. Feleségemnek, aki kutatói pályám indulásától kezdve mellettem állt és szakmabeliként rengeteg kritikával és tanáccsal látott el. Gyermekeimnek, akiktől sok boldogságot és erőt kaptam, és akiktől bocsánatot is kérek, hogy oly sok időt töltöttem a laborban; – remélem hasonló szenvedélyben egyszer nekik is lesz részük.

BEVEZETÉS**I. A károsított DNS replikációjában szerepet játszó DNS hibatoleráló mechanizmusok**

Genetikai örökítő anyagunkat folyamatosan érik károsító hatások, amelyek többek között a DNS bázisainak módosulását és lánctöréseket eredményezhetnek. A károsító hatások eredhetnek a külső környezetből, mint például a nap ultraibolya sugárzása, amely elsősorban a szomszédos citozin és timin bázisok kovalens keresztkötését eredményezheti, illetve belső metabolikus folyamatokból, melyek során keletkező reaktív molekulák leggyakrabban oxidatívan illetve hidrolízis útján károsítanak. A genetikai információ épségének megőrzése érdekében a sejtekben többféle, alternatív DNS hibajavító folyamat fejlődött ki. Ezen rendszerek meghibásodása, illetve nagymértékű DNS károsodáskor, telítődése esetén a sérült DNS javítása nem történik meg maradéktalanul. A ki nem javított DNS károsodások leginkább a DNS replikációja során okoznak problémát, mivel a replikációs DNS polimeráz gyakran nem képes a károsodott bázisokon keresztül történő átírásra és ezáltal a replikációs villa megakad. Nagymértékű DNS károsodás és az ennek következtében fellépő befejezetlen DNS szintézis a sejt halálához vezethet. Ennek elkerülésére fejlődtek ki az ún. DNS hibatoleráló mechanizmusok, amelyek nem vesznek részt a DNS hibák közvetlen javításában (tehát nem DNS hibajavító folyamatok), viszont valamilyen módon biztosítani képesek a replikációs villa áthaladását a sérült DNS szakaszon (azaz a sejt tolerálja a DNS hibát).

A károsított DNS replikációja lehet hibamentes, azaz a mintaszál eredeti (károsodás előtti) bázisának komplementer bázisa épül be (pl. oxidatívan károsított G-vel szemben C épül be), illetve történhet mutációt generálva, azaz a mintaszál eredeti bázisának nem a komplementer bázisa épül be (pl. oxidatívan károsított G-vel szemben A épül be). Hibamentes átírás a genom stabilitásához járul hozzá, míg fokozott mutációt generáló átírás a genom instabilitásához vezet és magasabb rendű eukariótákban a karcinogenezis mozgatórugójává válhat.

Kutatásaim kezdetén a károsított DNS replikációjának mechanizmusai és az ebben részt vevő fehérjék nagy része még ismeretlen volt.

II. Az élesztő RAD6-RAD18-POL30 DNS hibatoleráló útvonal

A DNS hibatolerálásban szerepet játszó eukarióta gének jelentős része genetikai módszerekkel a sütőélesztőben „*Saccharomyces cerevisiae*”-ban (továbbiakban: élesztő) került azonosításra. Különböző DNS károsító ágensekre érzékeny élesztő mutánsok episztázis analízise jól elkülönítette a gének egy csoportját, az ún. *RAD6-RAD18-POL30* episztázis csoportot, azoktól a génektől, amelyek közvetlen szerepet játszanak a DNS hibák javításában, mint pl. a nukleotid kivágó hibajavítást végző *RAD1-RAD10* episztázis csoport. Világossá vált, hogy a *rad6* és *rad18* élesztő mutánsokban jelentős zavar támad a károsított DNS replikációjában, és a sejtciklus S-fázisának végén az újonnan szintetizálódott DNS szálon a DNS hibákkal szemben rések maradnak.

Későbbi, a *RAD6-RAD18-POL30* csoporton belül végzett episztázis analízis, három egymástól nagymértékben független csoportot azonosított, a *REV1-REV3-REV7*, a *RAD30*, és a *RAD5-MMS2-UBC13* géneket (Fig.1). Kutatásaink során fel kívántuk tární mindhárom csoport fehérjéinek szerepét a károsodott DNS replikációjában. Megemlítem, hogy ez a lista már nem tekinthető teljesnek, ui. többek között kutatócsoportom is sikerrel azonosított illetve azonosít a *RAD6-RAD18-POL30* csoporthoz rendelhető új géneket.

A gének fehérjetermékeinek részletes biokémiai vizsgálata kimutatta, hogy a Rad6 fehérje egy ubikvitin-konjugáló enzim, amely komplexben található a Rad18 ubikvitin ligázzal. A Rad6-Rad18 komplex ubikvitinálja a *POL30* gén által kódolt PCNA molekulát, amely a replikációs villa tagjaként gyűrűt alkot a DNS körül és a replikációs DNS polimerázzal kapcsolatot tartva azt a primer közelében tartja. A *REV3-REV7* gének egy két alegységes DNS polimerázt a Pol ζ -t, kódolják; a Rev1 is rendelkezik egy speciális DNS polimeráz aktivitással; és a *RAD30* gén is kódol egy sajátos DNS polimerázt, a Pol η -t. Továbbá, az Mms2-Ubc13 komplex egy speciális ubikvitin konjugáló enzim, amely K63-kapcsolt poliubikvitin láncot képes felépíteni. A Rad5-ről ismert volt ATPáz aktivitása, de funkcióját sejtető biokémiai adat sokáig nem állt rendelkezésre.

Komoly kihívást jelentett a fenti ismeretek bővítése és az, hogy betekintést nyerjünk a károsított DNS replikációjának a mechanizmusába.

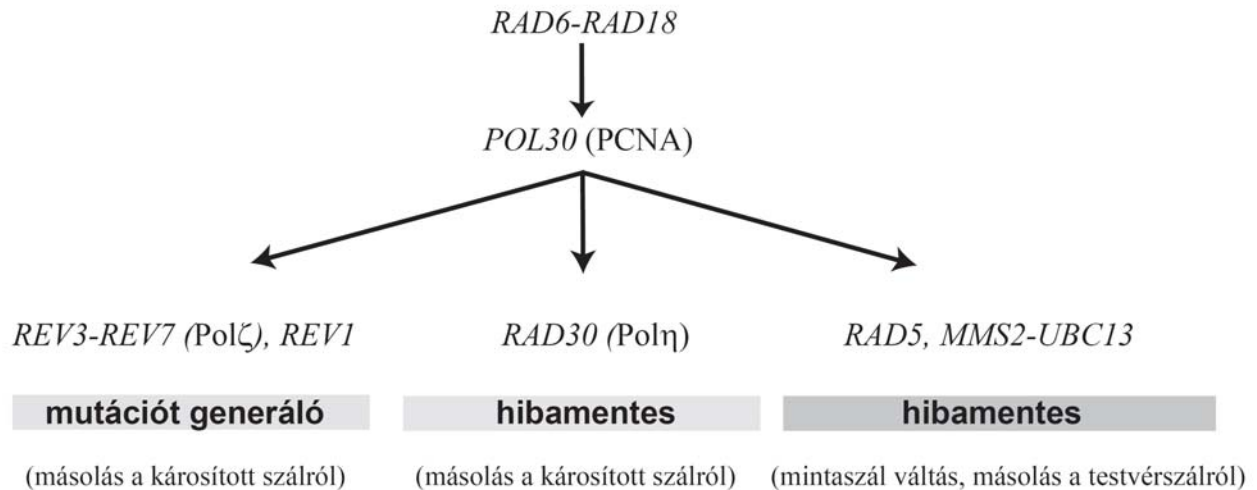


Fig. 1 A károsított DNS replikációjában szerepet játszó élesztő gének episztázis csoportjai

III. Kutatási stratégia: konzerváltság az élesztő és human DNS hibatolerálásban

Korábbi megfigyelések azt mutatták, hogy a DNS hibajavításban szerepet játszó gének és mechanizmusok nagymértékben konzerválódtak az eukarióta sejtek evolúciója során; így az élesztő és az emberi sejtek DNS hibajavítása között is nagyfokú hasonlóság található. Ennek fényében nem meglepő, hogy az emberi sejtek DNS hibajavítási útvonalainak feltárásához az élesztőben megismert folyamatok már korábban is rendkívül jó modellt szolgáltatottak. A DNS hibajavításhoz képest azonban a DNS hibatoleráló mechanizmusok feltárása nagyban késett és erről kutatásaink kezdetén még az élesztő esetében is csak korlátozott ismeretek álltak rendelkezésünkre.

Az emberi sejtek esetében még az alapvető DNS hibatoleráló mechanizmusok sem voltak ismertek.

Már kutatásaink elején felállítottuk azt a munkahipotézist, hogy a károsított DNS replikációjának alapvető mechanizmusai és a folyamatban részvevő enzimek nagyfokú hasonlóságot mutathatnak élesztő és emberi sejtekben. Erre a DNS hibajavítás ismert konzerváltságán felül az is alapot adott, hogy a DNS hibatolerálás feltételezhetően egy ősi folyamat, amely a szintén nagy fokban konzerválódott DNS replikációval egy időben jelent meg és szoros összefüggésben fejlődött. Ezek alapján feltételeztük, hogy az élesztő *RAD6-RAD18-POL30* hibatolerálási útvonal számos eleme szintén konzerválódhatott emberi sejtekben, melyre kezdetben csak néhány már azonosított homológ gén, mint a humán RAD6, RAD18, és REV1 jelenléte utalt. Az emberi hibatoleráló útvonal alapvető elemeinek és mechanizmusainak azonosítására később, többek között kutatásainknak is köszönhetően, került csak sor. Hipotézisünket szem előtt tartva egy adott kérdés megválaszolásához gyakran váltottunk az élesztő és human kísérleti rendszerek között. Így lehetőségünk volt kihasználni az élesztő szofisztikált genetika háttérét, a human sejtekre kidolgozott és kifinomult sejtbiológiai módszereket, és biokémiai módszerekkel össze is hasonlítani az élesztő és human homológ fehérjéket. Ez a stratégia, mint látni fogjuk, nem csak a károsított DNS replikációjának jobb megértéséhez vezetett, hanem számos új, ebben a folyamatban szerepet játszó human gén azonosításához is segítséget nyújtott. Nem ért meglepetésként, hogy a leírt gének többségéről az is kiderült, hogy szerepet játszanak a mutagenézisben és karcinogenezisben illetve tumor szuppresszorok, mivel ez várható a károsított DNS hibamentes és/vagy mutációt eredményező replikációjának résztvevőitől.

CÉLKITŰZÉSEK

Munkám fő célja az eukarióta sejtek DNS hibatolerancia mechanizmusainak felderítése volt. Elsősorban az élesztő ún. *RAD6-RAD18-POL30* episztázis csoporthoz tartozó géneknek illetve ezek human ortológjainak szerepét kívántam tisztázni a károsított DNS replikációjában. Ennek érdekében a következő konkrét kérdésekre kerestem a választ:

I, Hibaátíró DNS polimerázok jellemzése

Egy-egy speciális hibaátíró DNS polimeráz, mint a Pol η , Pol κ , Pol ι , Rev1 és Pol ζ , milyen DNS hibák átírásában játszik szerepet és ennek milyen következménye lehet a mutagenézisre és karcinogenezisre?

II, DNS hibaátírás szabályozása

Hogyan történik a károsított DNS replikációjának szabályozása; mi dönti el, hogy hibamentes vagy mutációt generáló hibaátírás történik; hogyan kerülnek kapcsolatba az egyes hibaátíró fehérjék a károsodásnál megakadt replikációs villával; mi ebben a szerepe a PCNA poszttranszlációs módosításának (PCNA ubikvitinálása és sumoilálása)?

III, Az élesztő DNS hibaátíró gének human ortológjainak azonosítása

Az élesztő *RAD6-RAD18-POL30* gének szabályozása alatt álló három DNS hibaátírási útvonal megtalálható-e human sejtekben is; van-e human ortológja az élesztő *RAD5* génnek; konzerváltak-e a PCNA poszttranszlációs módosítása révén megvalósuló DNS hibaátírás szabályozási folyamatai?

IV, DNS mintaszál váltás útján megvalósuló DNS hibaátírás

Milyen mechanizmus révén biztosítja az élesztő Rad5 és a human HLTF fehérje, a károsított DNS speciális hibaátíró DNS polimeráz segítségével megvalósuló replikációját?

FELHASZNÁLT MÓDSZEREK

I. Biokémiai és enzimológiai módszerek

- Élesztő és humán fehérjék túltermelése *E. coli*, humán, illetve élesztő sejtekben, majd affinitás és hagyományos kromatográfias módszerekkel homogenitásig történő tisztításuk
- DNS hibák átírásában szerepet játszó DNS polimerázok, DNS helikázok, és ubikvitin ligázok biokémiai jellemzése; "steady-state" enzim-kinetikai jellemzések
- Fehérje-fehérje illetve fehérje-DNS interakciók tesztelése "pull down", gélfiltrációs kromatográfia, és gél retardációs technikákkal

II. Élesztő genetikai módszerek

- Homológ rekombináción alapuló géniütéssel ill. géncserével élesztő mutánsok generálása
- Élesztő mutánsok DNS károsító ágensekre mutatott érzékenységi és mutációs gyakoriság tesztje; mutáns génekkel végzett komplementációs kísérletek
- Mutánsok episztázis analízise
- Élesztő két-hibrid szűrések és direkt interakciós tesztek

III. Humán szövettenyészetek, sejtbiológiai módszerek

- siRNS és shRNS géncsillapítások, vad és mutáns fehérjéket expresszáló illetve géncsillapított stabil humán sejt vonalak előállítása
- Humán sejtek DNS károsító ágensekre mutatott érzékenysége, mutációs rátája, és az egyedi replikációs villák sebességének mérése konfokális mikroszkópián alapuló ún. DNS fiber technikával
- Konfokális pásztázó mikroszkópos technikán alapuló fehérje lokalizációs vizsgálatok
- Fehérje-fehérje interakciók tesztelése ún. GFP fluoresszencia helyreállással illetve „pull-down” módszerekkel

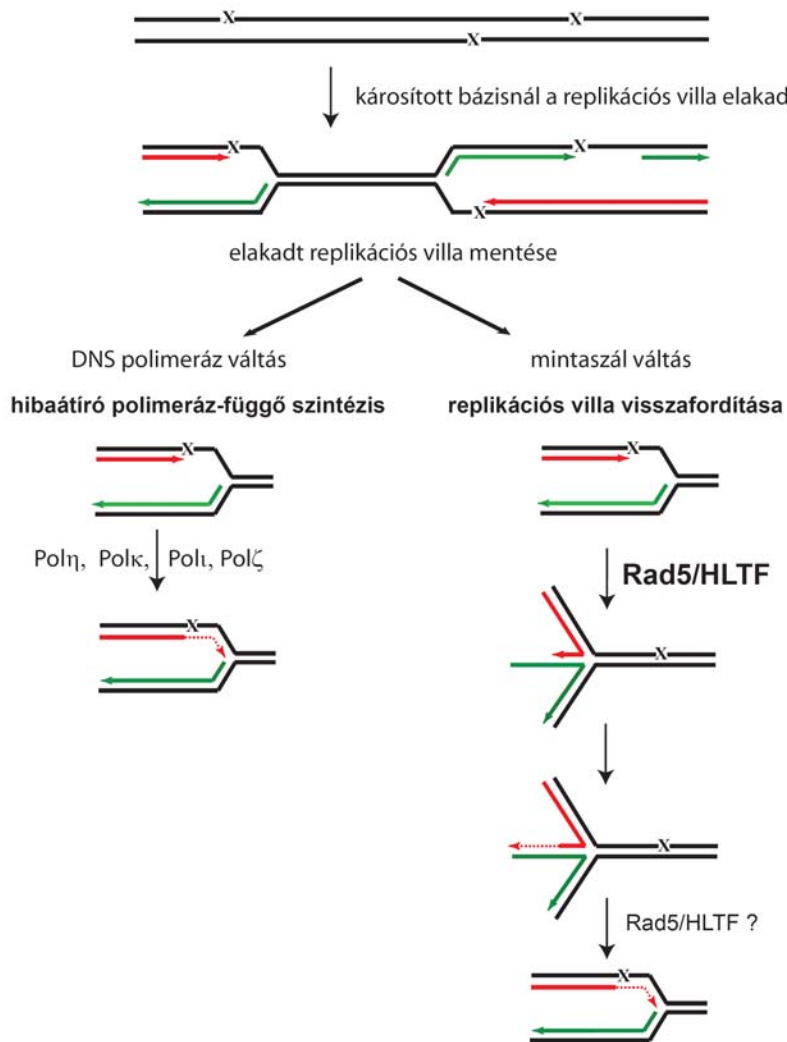


Fig. 2 A DNS hibánál elakadt replikációs villa mentésének lehetséges mechanizmusai

EREDMÉNYEK és ÉRTELMEZÉSÜK

1. Hibaátíró DNS polimerázok jellemzése

A károsodott bázisokon keresztül történő DNS szintézisre képes DNS hibaátíró polimerázok ($Pol\eta$, $Pol\kappa$, és $Pol\iota$) Satya Prakash laboratóriumában (University of Texas Medical Branch, Galveston, TX, USA) kerültek felfedezésre. A téma indulásától kezdve részt vettem ezekben a kutatásokban. Elsősorban arra kerestük a választ, hogy milyen DNS károsodásokat képesek ezek a speciális DNS polimerázok átírni, illetve,

milyen következménye van annak a sejtben, ha egy adott DNS polimeráz nem megfelelően működik. Munkánk eredményeként megduplázódott a leírt és jellemzett eukarióta DNS polimerázok száma.

1, Humán és élesztő DNS polimeráz éta (Pol η) szerepe

A Pol η -ról sikerült kimutatnunk, hogy egyedülállóan, számos károsított bázissal szemben képes a megfelelő, az eredeti bázissal komplementer bázis beépítésére, és így hibamentes átírást biztosít. Feltártuk, hogy a metabolikus folyamatok során spontán és nagy gyakorisággal keletkező 8-oxoguaninon keresztül is képes DNS szintézisre. Kinetikai vizsgálatokkal bizonyítottuk, hogy a Pol η elsősorban C-t épít be 8-oxoguaninnal szemben míg más polimerázok elsősorban A-t. Élesztő genetikai vizsgálatokkal megállapítottuk, hogy a Pol η ezen tulajdonságánál fogva nagymértékben hozzájárul a spontán mutációk elleni védelemhez (24). Hasonló vizsgálatokkal bizonyítottuk a Pol η szerepét az O(6)-metilguanin hibamentes átírásában (22) viszont kizártuk szerepét az abázikus helyek átírásában (21).

Ezek a kísérletek bizonyították elsőként, hogy a Pol η számos spontán kialakult DNS hiba esetén is hibamentes átírást biztosít, és így jelentősen hozzájárul a genom stabilitásához.

2, DNS polimeráz iota (Pol ι) és Rev1, a Watson-Crick bázispárosodást nem teljes mértékben követő DNS polimerázok jellemzése

A Rev1 enzimről steady-state kinetikai elemzéssel kimutattuk, hogy valójában egy specifikus DNS polimeráz, amely nagy hatékonysággal épít be C-t G-vel szemben, viszont más bázisok beépítésében több nagyságrenddel kisebb hatékonyságú. Számos károsított bázissal szemben ugyan képes C-t beépíteni, ennek ellenére szerepe elsősorban strukturális ui. kimutattuk, hogy a *rev1 Δ* élesztő törzs DNS károsító ágensre mutatott érzékenységét a polimeráz aktív centrum pontmutáns Rev1 képes komplementálni (15).

A Pol ι fehérjéről elsőként sikerült megállapítanunk, hogy DNS polimeráz aktivitással rendelkezik. Leírtuk, hogy a Pol ι ugyan G, A, C bázisokkal szembeni

beépítések során követi a Watson-Crick bázispárosodásokat, azonban T-vel szemben rendkívül sajátosan nem az A hanem a G bázis beépítését részesíti előnyben. Kiderítettük azt is, hogy a károsodott bázisokon, pl. (6-4) T-T fototermék vagy abázikus hely, történő replikációt mutációt generálva segíti (23). Magyarázattal szolgáltunk arra is, hogy az ún. bázis kivágó hibajavító folyamat DNS szintézis lépésénél a sejt milyen mechanizmussal gátolja a gyakran nem megfelelő bázist beépítő hibajavító DNS polimerázok működését (12).

Vizsgálataink a DNS polimerázok leírásán túl megmutatták, hogy vannak olyan DNS polimerázok, melyek ugyan elősegítik a károsított DNS replikációját, és így a sejt túlélését biztosítják, ezt azonban a mutációk növekedésének az árán teszik.

3, DNS polimeráz zéta (Pol ζ) és DNS polimeráz kapa (Pol κ): a DNS hibákkal szemben elhelyezkedő 3' DNS végek továbbírására kifejlődött DNS polimerázok

Míg a fent részletezett DNS polimerázok a károsított bázisokkal szemben történő beépítésre képesek, vizsgálataink közben arra lettünk figyelmesek, hogy a Pol ζ és Pol κ más mechanizmussal segíti a károsított DNS replikációját. Enzim-kinetikai vizsgálataink fényt derítettek arra, hogy ezek a polimerázok kis hatékonyságúak a károsított bázisokkal szemben történő beépítésben, de rendkívül eredményesek a károsított bázisokkal szemben elhelyezkedő 3' DNS végek továbbírásában. Így pl. a Pol ζ hatékonyan képes továbbírni az abázikus hellyel szemben illetve a (6-4) T-T fototermékkel szemben elhelyezkedő nem párosodó 3' DNS végeket (13, 20, 23). *In vitro* DNS szintézis rendszerünkben arra is fényt derítettünk, hogy a Pol κ is elsősorban továbbírásra kifejlődött polimeráz (14)

Ezek a vizsgálatok jelentették az első bizonyítékait annak, hogy léteznek kimondottan nem bázispárosodott 3' DNS végek továbbírására kifejlődött DNS polimerázok.

4, Egy beépítő és egy továbbíró DNS polimeráz összjátéka hatékony hibaátírást eredményezhet

Miután kimutattuk, hogy a károsított bázisokkal szemben a DNS hibaátíró polimerázok nagy része vagy beépít vagy továbbír, felállítottuk azt a hipotézist, hogy

két polimeráz, melyek közül az egyik beépítő a másik továbbíró, összjátéka hatékonyabb hibaátírást eredményezhet. Valóban, *in vitro* DNS szintézis rendszerben, kinetikai kísérletekkel is megtámogatva bebizonyítottuk hipotézisünk helyességét. Pol η és Pol ζ külön-külön nem, együttműködve azonban hatékonyan írja át az abázikus helyeket vagy a (6-4) T-T fototerméket (20, 23).

Ezek a kísérletek alapozták meg a ma már széles körben elfogadott két polimeráz-függő DNS hibaátírási modellt.

II, DNS hibaátírás szabályozása

A károsított DNS replikációjában szerepet játszó polimerázok felfedezése és biokémiai jellemzése után számos izgalmas kérdés vetődött fel. Mivel egyidejűleg mindegyik DNS hibaátíró polimeráz megtalálható a sejtben, mi dönti el, hogy végül melyikük fér hozzá a DNS hibánál megakadt replikációs villához? Hogyan kerülnek kapcsolatba az egyes hibaátíró fehérjék a replikációs villánál található fehérjékkel és milyen mechanizmusok döntenek arról, hogy történjen-e hibaátírás egyáltalán és az hibamentes vagy mutációt generáló legyen; vagy, különösen súlyos DNS károsodás esetén, a sejt inkább a szabályozott sejtthalt választja?

1, Pol η és a PCNA fehérjék interakciójának felfedezése

A replikációs villában az újonnan szintetizálódó DNS szálak 3' végei nem szabadon hozzáférhetőek, mivel ezeket köti aktív centrumában a replikációt végző DNS polimeráz. Számos replikációs fehérje közül központi szerepet tölt be a három azonos alegységből felépülő gyűrűszerű PCNA molekula, amely a DNS-t körülölelve azon csúszva szolgál kapocsként a vele fizikai kapcsolatban található replikációs DNS polimeráz számára. A Pol η 3' DNS véghez történő hozzáféréseinek vizsgálata során megfigyeltük, hogy a PCNA nagymértékben fokozza a Pol η DNS szintetizáló aktivitását, melyet kinetikai vizsgálataink is megerősítettek (18, 19). Tisztított fehérjékkel végzett lecsapási és gélfiltrációs kísérletekkel, és élesztő két hibrid módszerrel is bizonyítottuk a PCNA és a Pol η fehérjék fizikai interakcióját. A PCNA interakcióért felelős régiót deléciós és pontmutáns Pol η fehérjék felhasználásával sikerült térképeznünk. PCNA-kötő helyben mutáns Pol η -t hordozó élesztő törzsek

segítségével bizonyítottuk, hogy a Pol η -PCNA interakció elengedhetetlen ahhoz, hogy a Pol η részt vegyen a károsított DNS replikációjában (19).

Ezek az eredményeink jelentették az első betekintést abba az irányba, hogy milyen módon kerülhetnek a DNS hibaátíró polimerázok kapcsolatba a DNS hibánál elakadt replikációs apparátussal.

2, Hibaátíró DNS polimerázok-PCNA interakció általános jelentősége

Miután realizáltuk a Pol η és a PCNA kapcsolódásának jelentőségét, megvizsgáltuk azt a lehetőséget, hogy más hibaátíró polimerázok is a PCNA fehérjén keresztül kerülnek-e kapcsolatba az elakadt replikációs villával. Meglepetésünkre azt találtuk, hogy ez általános érvényű és mind a Pol κ (16) mind a Pol ι (17) képes fizikailag interakcióba lépni a PCNA-val, amely DNS szintetizáló aktivitásukat is fokozza. Ezen felül más DNS hibajavításban szerepet játszó fehérjék esetében is bizonyítottuk a PCNA interakció jelentőségét (4, 8). A PCNA kapcsolódásért felelős fehérje motívum térképezése után kimutattuk, hogy a PCNA interakció elengedhetetlen a polimerázok replikációs fókuszokba történő lokalizációjához.

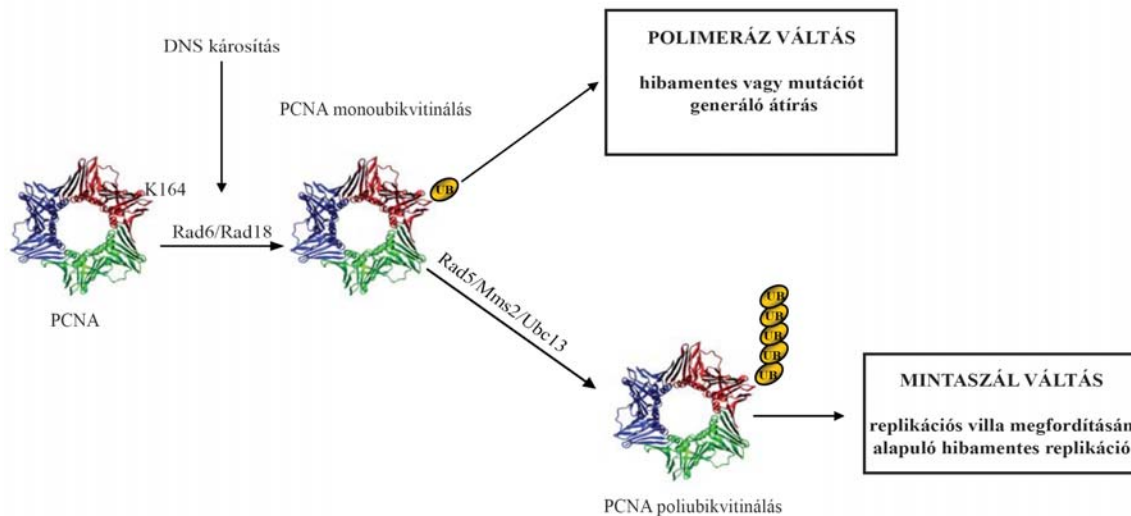


Fig. 3 PCNA mono- és poli-ubikvitinálás szabályozó szerepe a hibaátírásban

3, A PCNA poszttranszlációs módosulásainak (ubikvitin és SUMO) szerepe a DNS hibaátírásban

Időközben kimutatásra került, hogy az élesztő PCNA molekula poszttranszlációs módon módosulhat ubikvitin fehérjével, mely DNS károsító hatásra következik be, és SUMO fehérjével is, amely a sejtciklus S fázisában megy végbe. Ezek jelentőségének a vizsgálatához élesztő mutánsokat készítettünk, melyekben pontmutációkkal inaktiváltuk a PCNA ubikvitin (K164) illetve a SUMO (K164 és K127) módosulási pontjait. A mutánsok episztázis analízisével megvilágítottuk, hogy a PCNA ubikvitinálódása kulcsfontosságú a DNS hibaátíró polimerázok működéséhez, míg a PCNA SUMO-izálása a rekombinációs folyamatok gátlását eredményezi (11). Megállapítottuk, hogy a PCNA ubikvitinálódás nem eredményez fokozott DNS polimeráz aktivitást, viszont fontos a polimerázok replikációs villához történő hozzáférésehez (9). Sikerült kidolgoznunk a PCNA kémiai úton történő SUMO és ubikvitin módosítását (1) és így nagy mennyiségben történő tisztítását, amely megnyitotta az utat további, elsősorban strukturális vizsgálatok irányába is.

Ezek a kísérleteink mélyebb betekintést adtak a PCNA ubikvitin módosítás funkciójába és elsőként szolgáltatott bizonyítékot az élesztő PCNA SUMO módosításának a rekombináció gátlásában betöltött szerepére.



Fig. 4 Az élesztő Rad5 fehérje és ortológjai, a human SHPRH és HLTf, domén szerkezete

III, Az élesztő DNS hibaátíró gének humán ortológjainak azonosítása

Élesztőben a *RAD6-RAD18-POL30* gének szabályozása alatt három hibaátíró útvonal működik. Miután mások és saját eredményeink alapján bizonyossá vált, hogy a Pol η - és a Pol ζ -függő két útvonal nagymértékben konzerválódott az élesztőtől egészen a humán sejtekig, figyelmünk a harmadik *RAD5*-függő hibaátírási útvonal irányába fordult. Ismert volt, hogy élesztőben a Rad5 ubikvitin-ligázként működve a PCNA K63-típusú poliubikvitinálásáért felelős, amely előfeltétele a hibamentes átírásnak. Kérdéses volt, hogy ez az útvonal élesztő specifikus vagy humán sejtekben is fellelhető, mivel az élesztő Rad5 humán ortológja előzőleg még nem került azonosításra.

1, A humán SHPRH fehérje az élesztő Rad5-höz hasonlóan a PCNA poliubikvitin ligázként működhet

Az élesztő Rad5 humán homológja után kutatva fehérje motívum analízissel azonosítottuk a humán SHPRH fehérjét majd funkcionális vizsgálatokkal bizonyítottuk, hogy az SHPRH az élesztő Rad5 egy funkcionális homológja (7). Tisztított SHPRH fehérjét biokémiai vizsgálatnak alávetve kimutattuk, hogy a Rad5-höz hasonlóan a PCNA poliubikvitin ligázként funkcionál, melyet aztán humán sejtekben az SHPRH túltermelésével *in vivo* is sikerült kimutatnunk. Mind *in vitro* mind *in vivo* fehérje-fehérje interakciós vizsgálatokkal megállapítottuk, hogy az SHPRH komplexet formál a PCNA, Rad6-Rad18, és Mms2-Ubc13 fehérjékkel, melyek a *RAD6-RAD18-POL30* hibaátírási útvonal kulcs szereplői (7).

Ezen kísérletek elsőként jelezték az élesztő Rad5 hibaátíró útvonal és az ezzel összefüggő PCNA poliubikvitinálás konzerváltságát humán sejtekben. Ezen felül megfigyeléseink, hogy az SHPRH a károsított DNS hibamentes replikációjában vesz részt, molekuláris betekintéssel szolgáltak az SHPRH már korábban jelzett potenciális tumor szuppresszor funkciójába is.

2, A humán HLTF fehérje az élesztő Rad5 ortológja

Aminosav-szekvencia és domén-struktúra konzerváltságon alapuló analízisünk azt mutatta, hogy humán fehérjék közül a HLTF fehérje mutatja a legnagyobb fokú homológiát az élesztő Rad5 fehérjével (5). Funkciójának feltárása érdekében a HLTF

gént és az általa kódolt fehérjét számos igen szerteágazó kísérleti rendszerben részletes vizsgálatnak vetettük alá, melyek során a következő megfigyeléseket tettük: a humán HLTF komplementálni képes az élesztő *rad5Δ* mutáns DNS károsító hatásra mutatott érzékenységet; a HLTF ubikvitin ligáz aktivitással bír, mely a PCNA-t képes K63 típusú láncsal poliubikvitinálni; a HLTF fehérjekomplexet formál a Rad6-Rad18 és Mms2-Ubc13 fehérjékkel.

Fenti kísérleti eredményeink elsőként jelezték, hogy a HLTF fehérje az élesztő Rad5-höz hasonló módon részt vesz a károsított DNS hibamentes replikációjában és így hozzájárul a genom stabilitásának a biztosításához. Mindez jó összhangban van azzal, hogy a HLTF-et potenciális tumor szuppresszorként tartják számon, amely pl. bélrendszeri tumorok mintegy 40 százalékában promóter hipermetiláció következtében inaktiválódik (2).

IV, DNS mintaszál váltás útján megvalósuló DNS hibaátírás

Élesztő genetikai bizonyítékok azt mutatták, hogy a *RAD5* út hibamentesen járul hozzá a károsított DNS replikációjához. Azonban ebben az útban nem található speciális DNS polimeráz és ezért adódott a kérdés, hogy milyen mechanizmus révén biztosítja az élesztő Rad5 fehérje a károsított DNS replikációját. Hasonló kérdés vetődött fel a humán HLTF esetében is, miután a fentiekben részletezett módon bizonyítottuk, hogy a humán HLTF az élesztő Rad5 ortológja.

1, Az élesztő Rad5 replikációs villa visszafordító aktivitása

Élesztő genetikai bizonyítékok azt mutatták, hogy a Rad5 mintaszál-váltás útján járul hozzá a replikációs villa mentéséhez, azaz az eredeti károsított mintaszálról valamilyen módon váltva a testvérszál újonnan szintetizálódott száláról történik a másolás. Célunk a Rad5 működési mechanizmusának a felderítése volt, melyet *in vitro* kísérleti rendszerben, tisztított Rad5 fehérje és DNS hibánál elakadt replikációs villát modellező DNS struktúra felhasználásával kívántunk véghezvinni. Azt találtuk, hogy a Rad5 ATPáz aktivitása kettős szálú DNS-sel aktiválható, és az ATP hidrolízis energiájának felhasználásával a Rad5 képes a replikációs villa visszafordítására (6). A villa-visszafordítás során új primer-mintaszál pár alakul ki, melyben a mintaszál a

testvérszárlról ered. Tehát a Rad5 újonnan felfedezett villa visszafordító aktivitása magyarázatot nyújt a mintaszál-váltás útján megvalósuló DNS hibaátírásra.

A Rad5 fehérjével végzett biokémiai kísérleteink és a genetikai eredmények együttesen az első koherens bizonyítékot szolgáltatták a speciális DNS polimeráz segítségével nélkül megvalósuló DNS hibaátírásra (2).

2, A humán HLTF kettős szálú DNS transzlokáz aktivitása és in vivo szerepe a károsított DNS replikációjában.

Az élesztő Rad5-höz hasonlóan bizonyítottuk, hogy a humán HLTF rendelkezik replikációs villa visszafordító aktivitással (3). Részletes biokémiai vizsgálatokkal betekintést nyertünk a folyamat részleteibe is és kimutattuk, hogy a villa-visszafordító aktivitás a HLTF kettős szálú DNS transzlokáz aktivitásának következménye.

Célunk volt *in vivo* megfigyelésekkel is alátámasztani a HLTF a károsított DNS replikációjában betöltött szerepét. Ehhez HLTF siRNS csillapított humán sejtvonalakon konfokális mikroszkópián alapuló ún. DNS fiber kísérleteket végeztünk, melyekkel nyomon követhető egyedi replikációs villák sebessége és elakadása is. Megfigyeltük, hogy DNS károsítás után a HLTF csillapított sejtekben a replikációs villák lassabban haladnak előre és nagy gyakorisággal meg is akadnak a kontrol sejtekhez viszonyítva. Ezt a fenotípust az siRNS rezisztens vad típusú HLTF-vel ellentétben az ATPáz mutáns HLTF nem komplementálta, amely alátámasztja a HLTF ATPáz aktivitásán alapuló villamegfordítás jelentőségét a DNS hibák átírásában.

Összefoglalva, eredményeink nemcsak betekintést adtak a mintaszál-váltás útján megvalósuló hibaátírás molekuláris mechanizmusába, de az első bizonyítékot is jelentették ennek konzerváltságára élesztő és humán sejtekben (2)

ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK ÖSSZEFOGLALÁSA

Bár az itt bemutatott eredményeket alátámasztó 24 publikációban egy kivételével vagy utolsó vagy első szerző voltam, hangsúlyozom, hogy ezekhez munkatársaim is nagymértékben hozzájárultak. A károsított DNS replikációjának vizsgálata során négy, egymással szorosan összefüggő területen értünk el új eredményeket.

I, Hibaátíró DNS polimerázok jellemzése

1, Kimutattuk, hogy a Pol η részt vesz számos indukált és spontán kialakult DNS hiba átírásában, és így jelentősen hozzájárul a genom stabilitásához.

2, Rámutattunk, hogy egyes DNS polimerázok pl. a Pol ι és Rev1, mutációkat generálva írják át a DNS hibákat és így csak a pontmutációs események növekedésének árán tudnak hozzájárulni a sejt túléléséhez.

3, A Pol ζ és Pol κ jellemzése során feltártuk, hogy léteznek kimondottan nem bázispárosodott 3' DNS végek továbbírására kifejlődött DNS polimerázok.

4, Bizonyítékot szolgáltatunk arra, hogy bizonyos DNS hibák átírása esetén két polimeráz, melyek közül az egyik beépítő a másik továbbíró, összjátéka hatékonyabb hibaátírást eredményez. Ezek a megfigyelések alapozták meg a ma már széles körben elfogadott két polimeráz-függő DNS hibaátírás modellt.

II, DNS hibaátírás szabályozása

1, Elsőként mutattuk ki a Pol η és PCNA interakcióját és bizonyítottuk ennek fontosságát a Pol η DNS hibánál elakadt replikációs villához történő kötéséhez.

2, Leírtuk a Polκ-PCNA és Polι-PCNA interakciókat és kimutattuk ezek jelentőségét a hibaátírásban. Ennek fényében vált általánosan elfogadottá az a modell, hogy a PCNA interakció szabályozza egy adott polimeráz károsodott DNS-hez történő hozzáférését.

3. Elsőként mutattunk rá az élesztő PCNA SUMO módosításának a rekombináció gátlásában betöltött szerepére. Továbbá, genetikai bizonyítékokkal támasztottuk alá a PCNA ubikvitinnel történő módosulásának jelentőségét a DNS hibaátírásban.

III, Az élesztő DNS hibaátíró gének humán ortológjainak azonosítása

1, Azonosítottuk és jellemeztük az SHPRH fehérjét és rámutattunk, hogy számos tekintetben az élesztő Rad5 egy funkcionális humán homológjának tekinthető.

2, A humán HLTF fehérjéről megállapítottuk, hogy az élesztő Rad5 ortológjának tekinthető. Ezek az eredmények elsőként jelezték, hogy az élesztő Rad5-függő hibaátírási útvonal humán sejtekben is konzervált.

IV, DNS mintaszál váltás útján megvalósuló DNS hibaátírás

1, Az élesztő Rad5 fehérje replikációs villa-visszafordító aktivitásának a felfedezésével biokémiai bizonyítékot szolgáltatunk a mintaszál váltás útján megvalósuló DNS hibaátírásra.

2, *In vivo* és *in vitro* kísérleti rendszerekben is bizonyítottuk, hogy a humán HLTF meghatározó szereplő a károsodott DNS replikációjában. Eredményeink nemcsak betekintést adnak a mintaszál-váltás útján megvalósuló hibaátírás molekuláris mechanizmusába, de az első bizonyítékot is jelentik ennek konzerváltságára az élesztő és humán sejtekben.

PUBLIKÁCIÓK

1. A PhD fokozat megszerzése óta megjelent, az értekezésben felhasznált publikációk

1. Chen, J., Ai, Y., Wang, J., **Haracska, L.** and Zhuang, Z. (2010) Chemically ubiquitylated PCNA as a probe for eukaryotic translesion DNA synthesis. *Nature Chem Biol*, **6**, 270-272.
2. Unk, I., Hajdu, I., Blastyak, A. and **Haracska, L.** (2010) Role of yeast Rad5 and its human orthologs, HLTF and SHPRH in DNA damage tolerance. *DNA Repair (Amst)*, **9**, 257-267.
3. Blastyak, A., Hajdu, I., Unk, I. and **Haracska, L.** (2010) Role of double-stranded DNA translocase activity of human HLTF in replication of damaged DNA. *Mol Cell Biol*, **30**, 684-693.
4. Burkovics, P., Hajdu, I., Szukacsov, V., Unk, I. and **Haracska, L.** (2009) Role of PCNA-dependent stimulation of 3'-phosphodiesterase and 3'-5' exonuclease activities of human Ape2 in repair of oxidative DNA damage. *Nucleic Acids Res*, **37**, 4247-4255.
5. Unk, I., Hajdu, I., Fatyol, K., Hurwitz, J., Yoon, J.H., Prakash, L., Prakash, S. and **Haracska, L.** (2008) Human HLTF functions as a ubiquitin ligase for proliferating cell nuclear antigen polyubiquitination. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **105**, 3768-3773.
6. Blastyak, A., Pinter, L., Unk, I., Prakash, L., Prakash, S. and **Haracska, L.** (2007) Yeast Rad5 protein required for postreplication repair has a DNA helicase activity specific for replication fork regression. *Mol. Cell*, **28**, 167-175.
7. Unk, I., Hajdu, I., Fatyol, K., Szakal, B., Blastyak, A., Bermudez, V., Hurwitz, J., Prakash, L., Prakash, S. and **Haracska, L.** (2006) Human SHPRH is a ubiquitin ligase for Mms2-Ubc13-dependent polyubiquitylation of proliferating cell nuclear antigen. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **103**, 18107-18112.
8. Burkovics, P., Szukacsov, V., Unk, I. and **Haracska, L.** (2006) Human Ape2 protein has a 3'-5' exonuclease activity that acts preferentially on mismatched base pairs. *Nucleic Acids Res*, **34**, 2508-2515.
9. **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*, **103**, 6477-6482.
10. **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.
11. **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.
12. **Haracska, L.**, Prakash, L. and Prakash, S. (2003) A mechanism for the exclusion of low-fidelity human Y-family DNA polymerases from base excision repair. *Genes Dev*, **17**, 2777-2785.

13. **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.
14. **Haracska, L.**, Prakash, L. and Prakash, S. (2002) Role of human DNA polymerase kappa as an extender in translesion synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**, 16000-16005.
15. **Haracska, L.**, Prakash, S. and Prakash, L. (2002) Yeast Rev1 protein is a G template-specific DNA polymerase. *J Biol Chem*, **277**, 15546-15551.
16. **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.
17. **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.
18. **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.
19. **Haracska, L.**, Kondratick, 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.
20. **Haracska, L.**, Unk, I., Johnson, R.E., Johansson, E., Burgers, P.M., Prakash, S. and Prakash, L. (2001) Roles of yeast DNA polymerases delta and zeta and of Rev1 in the bypass of abasic sites. *Genes Dev*, **15**, 945-954.
21. **Haracska, L.**, Washington, M.T., Prakash, S. and Prakash, L. (2001) Inefficient bypass of an abasic site by DNA polymerase eta. *J Biol Chem*, **276**, 6861-6866.
22. **Haracska, L.**, Prakash, S. and Prakash, L. (2000) Replication past O(6)-methylguanine by yeast and human DNA polymerase eta. *Mol Cell Biol*, **20**, 8001-8007.
23. Johnson, R.E.*, Washington, M.T.*, **Haracska, L.***, Prakash, S. and Prakash, L. (2000) Eukaryotic polymerases iota and zeta act sequentially to bypass DNA lesions. *Nature*, **406**, 1015-1019. (* első szerzők, akik egyenlő mértékben járultak hozzá az eredményekhez)
24. **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 eta. *Nat Genet*, **25**, 458-461.

II, A PhD fokozat megszerzése óta megjelent az értekezésben fel nem használt publikációk

25. Jansen, J.G., Tsaalbi-Shtylik, A., Hendriks, G., Verspuy, J., Gali, H., **Haracska, L.** and de Wind, N. (2009) Mammalian polymerase zeta is essential for post-replication repair of UV-induced DNA lesions. *DNA Repair (Amst)*, **8**, 1444-1451.
26. Jansen, J.G., Tsaalbi-Shtylik, A., Hendriks, G., Gali, H., Hendel, A., Johansson, F., Erixon, K., Livneh, Z., Mullenders, L.H., **Haracska, L.** et al. (2009) Separate

- domains of Rev1 mediate two modes of DNA damage bypass in mammalian cells. *Mol Cell Biol*, **29**, 3113-3123.
27. Acharya, N., Yoon, J.H., Gali, H., Unk, I., **Haracska, L.**, Johnson, R.E., Hurwitz, J., Prakash, L. and Prakash, S. (2008) Roles of PCNA-binding and ubiquitin-binding domains in human DNA polymerase eta in translesion DNA synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **105**, 17724-17729.
 28. Zhuang, Z., Johnson, R.E., **Haracska, L.**, Prakash, L., Prakash, S. and Benkovic, S.J. (2008) Regulation of polymerase exchange between Poleta and Poldelta by monoubiquitination of PCNA and the movement of DNA polymerase holoenzyme. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **105**, 5361-5366.
 29. Acharya, N., **Haracska, L.**, Prakash, S. and Prakash, L. (2007) Complex formation of yeast Rev1 with DNA polymerase eta. *Mol Cell Biol*, **27**, 8401-8408.
 30. Acharya, N., Brahma, A., **Haracska, L.**, Prakash, L. and Prakash, S. (2007) Mutations in the ubiquitin binding UBZ motif of DNA polymerase eta do not impair its function in translesion synthesis during replication. *Mol Cell Biol*, **27**, 7266-7272.
 31. Johnson, R.E., **Haracska, L.**, Prakash, L. and Prakash, S. (2006) Role of Hoogsteen edge hydrogen bonding at template purines in nucleotide incorporation by human DNA polymerase iota. *Mol Cell Biol*, **26**, 6435-6441.
 32. Gangavarapu, V., **Haracska, L.**, Unk, I., Johnson, R.E., Prakash, S. and Prakash, L. (2006) Mms2-Ubc13-dependent and -independent roles of Rad5 ubiquitin ligase in postreplication repair and translesion DNA synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol*, **26**, 7783-7790.
 33. **Haracska, L.**, Johnson, R.E., Prakash, L. and Prakash, S. (2005) Trf4 and Trf5 proteins of *Saccharomyces cerevisiae* exhibit poly(A) RNA polymerase activity but no DNA polymerase activity. *Mol Cell Biol*, **25**, 10183-10189.
 34. Acharya, N., **Haracska, L.**, Johnson, R.E., Unk, I., Prakash, S. and Prakash, L. (2005) Complex formation of yeast Rev1 and Rev7 proteins: a novel role for the polymerase-associated domain. *Mol Cell Biol*, **25**, 9734-9740.
 35. 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.
 36. Washington, M.T., Minko, I.G., Johnson, R.E., **Haracska, L.**, Harris, T.M., Lloyd, R.S., Prakash, S. and Prakash, L. (2004) Efficient and error-free replication past a minor-groove N2-guanine adduct by the sequential action of yeast Rev1 and DNA polymerase zeta. *Mol Cell Biol*, **24**, 6900-6906.
 37. Prakash, S., Johnson, R.E., Washington, M.T., **Haracska, L.**, Kondratieck, 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.
 38. Szlanka, T., **Haracska, L.**, Kiss, I., Deak, P., Kurucz, E., Ando, I., Viragh, E. and Udvardy, A. (2003) Deletion of proteasomal subunit S5a/Rpn10/p54 causes lethality, multiple mitotic defects and overexpression of proteasomal genes in *Drosophila melanogaster*. *J Cell Sci*, **116**, 1023-1033.

39. 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.
40. Johnson, R.E., **Haracska, L.**, Prakash, S. and Prakash, L. (2001) Role of DNA polymerase zeta in the bypass of a (6-4) TT photoproduct. *Mol Cell Biol*, **21**, 3558-3563.
41. 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.
42. 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.

SCIENTOMETRIAI ADATOK

Az összes publikáció (PhD megszerzése előtti és utáni) impakt faktora: 443

Az összes publikációra kapott független hivatkozás: 1885

Hirsh-index: 26

A PhD fokozat megszerzését követő publikációk összesített impakt faktora: 429