

TRABAJO FIN DE GRADO
BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

**REGULACIÓN DE LA FUNCIÓN
REPARADORA DEL ADN DE LA
ENDONUCLEASA APE1 POR
NUCLEOFOSMINA**

Autor: Ander de Blas Martín

Directora: Sonia Bañuelos Rodríguez

Codirector: David López Jiménez

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. OBJETIVO.....	4
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	4
3.1. Oligonucleótidos de ADN	4
3.2. Ligación y purificación del ADN sustrato	5
3.3. Comprobación de la ligación del ADN sustrato.....	5
3.4. Ensayos de actividad endonucleasa	5
3.5. Ensayos de unión.....	6
3.6. Ensayos de variación en la movilidad electroforética (EMSA).....	6
4. RESULTADOS	6
4.1. Obtención de un modelo de ADN sustrato	6
4.2. La actividad endonucleasa de APE1 es más eficiente en presencia de NPM1	7
4.3. La unión de APE1 a sitios abásicos se ve favorecida por NPM1	8
4.4. APE1, NPM1 y ADN no forman un complejo ternario	10
5. DISCUSIÓN.....	11
6. CONCLUSIONES.....	13
7. BIBLIOGRAFÍA.....	14

1. INTRODUCCIÓN

El ADN es una biomolécula que presenta de forma constante y dinámica distintos tipos de lesiones debido a multitud de agentes. Las lesiones en el ADN pueden ser causa de múltiples patologías como el cáncer (Lindhahl, 1993). Sin embargo, las células disponen de una maquinaria especializada para repararlas. La ruta de reparación de escisión de bases (BER) es una de las principales rutas de reparación del ADN y mantenimiento de la integridad del genoma tanto en procariontes como en eucariotes (Krokan & Bjørås, 2013). En esta ruta están implicadas distintas enzimas que actúan secuencialmente para reparar las lesiones en el ADN. Esta ruta suele actuar cuando se dan pequeñas modificaciones en las bases nitrogenadas de los nucleótidos, pérdida de bases o rupturas de hebra sencilla o *nicks* como consecuencia de daño oxidativo, de alquilación o hidrolítico (Li & Wilson, 2014). La ruta comienza con el reconocimiento de la base dañada y su escisión por parte de una *N*-glucosilasa generando un sitio abásico en el ADN. El sitio abásico es reconocido por la endonucleasa apurínica/apirimidínica (APE1), que realiza una incisión en la posición 5' respecto al sitio abásico. Posteriormente, una ADN polimerasa β elimina la desoxirribosa-fosfato del producto resultante y la sustituye por el nucleótido correspondiente mediante uno de los dos procesos de reparación alternativos llamados de "parches cortos" o de "parches largos". Finalmente, una ligasa restaura el enlace eliminado por APE1 (Krokan & Bjørås, 2013). Recientemente, se han descrito nuevas lesiones en las que participa la maquinaria de la ruta BER, como en la formación de aductos o enlaces químicos estables en el ADN, así como enlaces intercatenarios (Mullins, et al., 2019).

Muchas proteínas implicadas en reparación del ADN se localizan normalmente en el nucleolo. El nucleolo, además de su papel canónico en el metabolismo del ARN, presenta multitud de funciones esenciales para la célula tales como el control del ciclo celular, la regulación de rutas relacionadas con la detección del estrés o la regulación de proteínas que participan en rutas de reparación del ADN (Antoniali, et al., 2014). Estas últimas proteínas se relocalizan en las distintas regiones subnucleares en función de modificaciones postraduccionales y señales de proteínas sensores como ATM, p53, etc. en respuesta a lesiones en el ADN (Fantini, et al., 2010; Antoniali, et al., 2014). Existe un gran dinamismo en el tráfico de proteínas nucleolares. Se distinguen dos tipos de proteínas que se localizan en el nucleolo: i) las proteínas residentes, que presentan señales de localización nucleolar (NoLS) que les permiten interactuar con componentes del nucleolo para permanecer en él y ii) las proteínas visitantes, que forman complejos de anclaje con las proteínas residentes para permanecer en el nucleolo un tiempo definido en función de su afinidad. Todas las proteínas del nucleoplasma pueden ser visitantes nucleolares, pero solo son retenidas en el nucleolo las que presentan afinidad por alguna proteína residente (Antoniali, et al., 2014).

La endonucleasa apurínica/apirimidínica 1 (APE1) es una proteína visitante nucleolar clave en la ruta BER de mamíferos (Antoniali, et al., 2014). Además de su actividad endonucleasa, APE1 actúa como coactivador redox de distintos factores de transcripción para la regulación de expresión de genes en respuesta a daño oxidativo (Li & Wilson, 2014). Igualmente, está involucrada en el metabolismo del ARN (Vascotto, C., et al., 2009). APE1 consta de un dominio globular C-terminal que lleva a cabo la actividad endonucleasa del enzima. Dicho dominio está formado por una estructura de sándwich- $\alpha\beta$ donde dos láminas- β formadas por 6 hebras

están rodeadas de hélices- α . El sitio activo se encuentra en un bolsillo sobre el sándwich- $\alpha\beta$ rodeado de tres lazos o *loops* que intervienen en el reconocimiento del sitio abásico (Gorman, *et al.*, 1997). En su secuencia alberga una señal de exportación nuclear (NES) y una señal de localización mitocondrial (MTS) que le permiten dirigirse a reparar el daño del ADN mitocondrial (Li & Wilson, 2014). Además, APE1 presenta una región N-terminal que, aparte de incluir una señal de localización nuclear (NLS) (Antoniali, *et al.*, 2014), se encarga de las funciones de coactivación redox (Xanthoudakis, *et al.*, 1994) y unión y procesamiento de ARN ribosómico (ARNr) (**Fig. 1A**) (Li & Wilson, 2014). Estructuralmente, el dominio se divide en i) los residuos 43-62 que forman un largo lazo que interacciona mediante puentes de hidrógeno e interacciones electrostáticas con algunas hebras- β del dominio catalítico y ii) una región intrínsecamente desordenada (IDR) en sus primeros 43 residuos (Tsutakawa, *et al.*, 2013) que se encarga de la regulación de la actividad del dominio C-terminal mediante distintas modificaciones postraduccionales, destacando las acetilaciones (Fantini, *et al.*, 2010), e interacciones con otras proteínas gracias a las altas accesibilidad y versatilidad que presenta la IDR (**Fig. 1B**) (Li & Wilson, 2014). Este dominio no aparece en proteínas homólogas bacterianas, reflejando que podría ser una adaptación evolutiva (Antoniali, *et al.*, 2014).

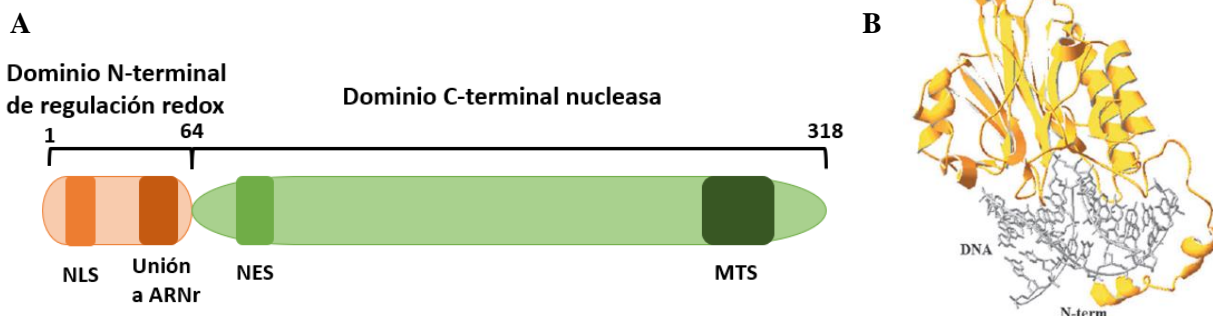


Figura 1. Representación y estructura de APE1. **A)** Representación topológica de los elementos principales de APE1. El dominio N-terminal, que incluye los residuos 1-64, presenta función de coactivación redox. Esta región alberga una secuencia de localización nuclear (NLS) y sitio de unión a ARN ribosómico (ARNr). Los primeros 43 residuos del dominio componen una región intrínsecamente desordenada (IDR) susceptible de sufrir numerosas modificaciones postraduccionales. El dominio C-terminal corresponde a los residuos 64-318 y presenta actividad endonucleasa. **B)** Estructura cristalográfica de APE1 unida a ADN abásico. Se representan la estructura resuelta de APE1 truncada (residuos 40-318) (PDB: 1DEW) y los residuos 1-42 del dominio N-terminal añadidos de forma manual. Dicho dominio presenta una IDR y un largo lazo. El resto de la proteína adquiere una conformación ordenada con estructura secundaria mayoritariamente de lámina- β que se pliega formando un sándwich- $\alpha\beta$. Imagen tomada de Antoniali, *et al.* (2014).

Para llevar a cabo su actividad endonucleasa de sitios abásicos, APE1 escanea el ADN de forma progresiva exhibiendo poca afinidad por los sitios no abásicos hasta encontrar su sitio de unión abásico (Yu, *et al.*, 2010). En este momento, se une con gran afinidad a él ocasionando una distorsión en el ADN para permitir una mayor accesibilidad del sitio catalítico al sitio abásico generando el complejo de preincisión. Este complejo se estabiliza por interacciones entre distintos residuos del centro activo con el sitio abásico, la base huérfana de la hebra complementaria, moléculas de agua adaptadoras y un átomo de Mg^{2+} (Freudenthal, *et al.*, 2015). El Mg^{2+} actúa como cofactor del enzima y es esencial para su actividad catalítica (Tsutakawa, *et al.*, 2013). Por último, realiza una incisión en el extremo 5' del sitio abásico formando el complejo de postincisión, también estabilizado por interacciones iguales o similares a las que se forman en el complejo de preincisión (Freudenthal, *et al.*, 2015). El complejo recluta la ADN polimerasa β para transferirle el producto, evitando soltarlo al medio puesto que una molécula de ADN con una rotura de hebra sencilla resultaría más mutagénico y deletéreo que el propio sitio abásico (Yu, *et al.*, 2010). No se conoce el mecanismo molecular de

transferencia, pudiendo tratarse de una competitividad entre las dos proteínas por el ADN y/o la formación de un complejo ternario que facilite la transferencia del producto de incisión (Yu, *et al.*, 2010; Liu, *et al.*, 2007)

APE1 muestra una localización fundamentalmente nuclear (Tell, *et al.*, 2005), encontrándose enriquecida en nucleolo debido a su interacción con la proteína residente del nucleolo nucleofosmina 1 (NPM1). NPM1 es una proteína homopentamérica que se considera un eje en el nucleolo al interactuar con múltiples ligandos regulando su localización nucleolar (Antoniali, *et al.*, 2014). La proteína presenta un dominio N-terminal o núcleo de estructura barril- β formado por ocho hebras responsable de la oligomerización (Lee, *et al.*, 2007). Dicho dominio presenta una o dos secuencias NES que permiten su salida al citosol por mediación de la exportina CRM1 (Arregi, *et al.*, 2015). Asimismo, NPM1 tiene un dominio central IDR rico en residuos ácidos con una NLS y un dominio C-terminal rico en residuos básicos y aromáticos formado por tres hélices- α cortas unidas por lazos (Grummitt, *et al.*, 2008). Este último dominio es responsable de la unión a ácidos nucleicos, de lo cual depende su anclaje al nucleolo (**Fig. 2A**) (Box, *et al.*, 2016). NPM1 realiza múltiples funciones: biogénesis de ARN, actividad de chaperona nuclear, control de la duplicación del centrosoma, mantenimiento de la integridad del genoma, actividad endorribonucleasa, etc. (Lindström, 2011). Para llevar a cabo estas funciones, NPM1 se transloca de forma dinámica y regulada entre nucleolo, nucleoplasma y citoplasma gracias a los distintos péptidos señal que presenta en su secuencia: NES, NLS y dominio de anclaje al nucleolo (Box, *et al.*, 2016). La localización subcelular de NPM1 está regulada por multitud de señales, así como modificaciones postraduccionales. Entre sus modificaciones, destacan las fosforilaciones en múltiples residuos que regulan tanto su localización como función. La fosforilación en Thr199 inhibe la interacción con ARN ocasionando su salida del nucleolo al nucleoplasma (Heath, *et al.*, 2017).

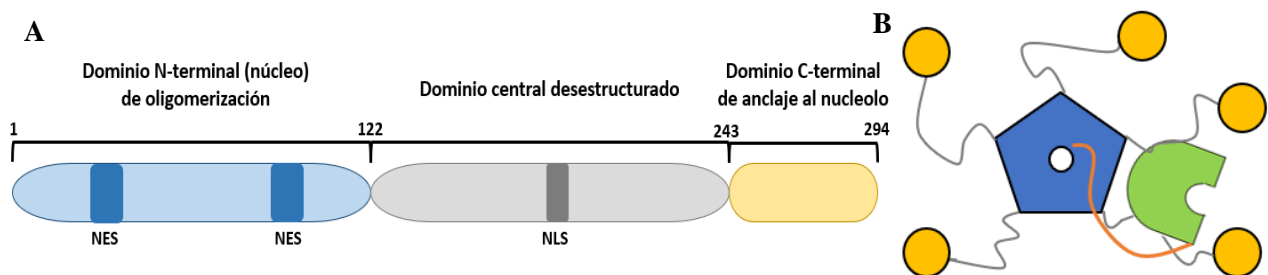


Figura 2. Representación de NPM1 y estructura esquemática de su interacción con APE1. **A)** Representación topológica de los elementos principales de NPM1. El dominio N-terminal o nuclear es el responsable de su oligomerización. Se cree que presenta dos señales de exportación nuclear (NES) para su salida al citosol. A continuación, se encuentra el dominio central, rico en residuos ácidos que incluye una señal de localización nuclear (NLS). Se trata de una región intrínsecamente desordenada (IDR) que conecta los dos dominios de los extremos. Finalmente, el dominio C-terminal presenta una región rica en residuos básicos y otra rica en residuos aromáticos. El dominio adopta una estructura que le permite interactuar con componentes del nucleolo dando a NPM1 su carácter de proteína residente del nucleolo. **B)** Esquema de la interacción APE1-NPM1. Las proteínas interactúan por sus respectivos dominios N-terminales. El dominio N-terminal de APE1 (naranja) interactúa con el dominio nuclear de barril- β de NPM1 (azul). Se representan en amarillo el dominio C-terminal de NPM1, estructurado por hélices- α y en verde, el dominio C-terminal de APE1.

La interacción APE1-NPM1 se da fundamentalmente entre los dominios N-terminales de ambas proteínas (**Fig. 2B**). La interacción con NPM1, no solo regula la localización nucleolar de APE1, sino que también regula su actividad. Se ha descrito que la actividad endonucleasa de APE1 sobre ADN de doble hebra incrementa en presencia de NPM1, pero se inhibe sobre ARN de hebra sencilla (Vascotto, *et al.*, 2009). Por otro lado, según la relación molar NPM1/APE1, la actividad endonucleasa sobre G-cuádruplex teloméricos se inhibe o activa (Burra, *et al.*, 2019). La interacción entre APE1 y NPM1 podría estar regulada por modificaciones

postraduccionales en ambas proteínas. Son destacables las acetilaciones en varias lisinas de la IDR N-terminal de APE1, que impiden la interacción al neutralizar las cargas positivas de dichos residuos (Fantini, *et al.*, 2010).

La interacción APE1-NPM1 es de gran interés en el posible tratamiento de patologías como el cáncer. Se han estudiado inhibidores de la interacción que podrían tener interés terapéutico antitumoral interfiriendo en la reparación del ADN, aunque su mecanismo de acción no ha sido resuelto (Poletto, *et al.*, 2016). Asimismo, mutaciones en NPM1 están asociadas con leucemia mieloide aguda (AML) de tipo NPM1c⁺. Estos mutantes presentan una mutación en la que se insertan cuatro nucleótidos originando una alteración en el marco de lectura durante la traducción del dominio C-terminal causando un plegamiento defectuoso. Además, se forma una nueva NES que se hace accesible a exportinas por el desplegamiento del dominio originando una localización citosólica aberrante (Heath, *et al.*, 2017). En nuestro grupo se ha explorado la posibilidad de un tratamiento para AML basado en chaperonas farmacológicas que favorezcan el plegamiento del dominio C-terminal para revertir su translocación (Urbaneja, *et al.*, 2017). Se desconoce la causa por la cual este tipo de mutante ocasiona AML, algunos autores lo atribuyen a una pérdida de función y otros a una ganancia de función en citosol (Heath, *et al.*, 2017). Una de las razones podría ser el transporte aberrante de sus ligandos, como APE1, al citosol. En este caso, APE1 no sería capaz de actuar en el núcleo en la ruta BER, no pudiendo reparar lesiones en el ADN que desembocarían en distintos tipos de cáncer (Vascotto, *et al.*, 2014).

Debido a su posible implicación en el cáncer, cualquier nueva información sobre la interacción APE1-NPM1 puede ser de interés terapéutico dada la relevancia de la reparación del ADN en este tipo de patología. No obstante, debido a los múltiples factores que influyen, la regulación de la actividad endonucleasa de APE1 por su interacción con NPM1 y por modificaciones postraduccionales es compleja y aún faltan muchos aspectos por dilucidar.

2. OBJETIVO

El objetivo de este trabajo es el análisis del efecto de NPM1 en la actividad endonucleasa de APE1 sobre ADN abásico de doble hebra, así como dilucidar el mecanismo por el cual NPM1 ejerce su modulación caracterizando su interacción con APE1.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Oligonucleótidos de ADN

Para los experimentos de actividad del ADN se empleó un oligonucleótido de secuencia 5'-CTGGAGCTTGCTCCAGCGCXCGGTCGATCGTAAGATCGACCGTGCG-3' como ADN sustrato (ADNS) sintetizado por la empresa IDT. Para los ensayos de unión, dicho ADN contaba con la sonda fluorescente fluoresceína en timina 28. Se empleó como modelo de sitio abásico una molécula de tetrahidrofurano (THF) (representada como X en la secuencia), tal y como lo describió Freudenthal, *et al.* (2015). El oligonucleótido se sometió a ligación (ver apartado 3.2) para obtener una molécula cerrada en forma de mancuerna o doble horquilla que presentaba una región central de doble hebra y en los extremos unas horquillas. (**Fig. 3**).

Para los ensayos EMSA, se empleó un oligonucleótido de secuencia 5'-XCGGTCGATCGTAAGATCGACCG TGCGCTGGAGCTTGCTCCAGCGC-3' como ADN producto (ADNP). Para los ensayos de unión, dicho ADN presentaba la sonda fluorescente fluoresceína en timina 9. También se empleó THF como modelo de sitio abásico.



Figura 3. Representación del ADN empleado en el trabajo. El ADNS es una molécula cerrada que presenta forma de mancuerna donde el sitio abásico está presente en una región de doble hebra. El modelo de sitio abásico se realiza con una molécula de tetrahidrofurano (THF), representada por X. En el caso del ADN fluorescente, la fluoresceína (naranja) se encuentra en timina 28. El ADNP consiste en la misma molécula no ligada por un enlace fosfodiéster entre el tetrahidrofurano y la base en posición 5'.

3.2. Ligación y purificación del ADN sustrato

Las moléculas de ADN sustrato se ligaron para generar una molécula cerrada mediante la ADN ligasa T4 (New England BioLabs). Tras un proceso de anillado o *annealing*, donde se sometió el ADN durante 5 minutos a 95 °C y se dejó enfriar lentamente, se realizó el ensayo de ligación de ADN con 4000 U/nmol ADN ligasa T4 en buffer de ligación (50 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl₂, 1mM ATP, 10 mM DTT, pH 7.5) para ligar los extremos del ADN siguiendo el protocolo de Freudenthal, *et al.* (2015). Con el objetivo de purificar el ADN ligado, se llevó a cabo una electroforesis en 18% poliacrilamida y 8 M urea en gel de 1 mm de grosor y en tampón TBE como fue descrito por Summer, *et al.* (2009). Antes de la carga de la muestra en el gel, este se sometió a 175V durante 30 minutos para atemperarlo y limpiarlo del exceso de urea. La electroforesis se desarrolló al mismo voltaje durante 80 minutos. Las bandas se visualizaron mediante tinción con GelRed (Biotium) y el equipo Gel Doc EZ (Bio-Rad). Aquella correspondiente al ADN ligado se cortó y se incubó en tampón de purificación (0.5 M Acetato de amonio, 1 mM EDTA, pH 8.0) para separar el ADN de fragmentos de acrilamida y otros contaminantes. Siguiendo el método de Maxam & Gilbert, (1977) y usando el kit “Nucleotide Removal Kit” de (QIAGEN) se purificó el ADN sustrato, cuya concentración se estimó mediante absorbancia a 260 nm en el espectrofotómetro de bajo volumen Nanodrop 2000 (ThermoFisher Scientific).

3.3. Comprobación de la ligación del ADN sustrato

Para corroborar que la banda seleccionada era la correspondiente al ADN ligado se llevó a cabo un ensayo de escisión del ADN por parte de APE1. Se incubó 5 µM ADN ligado con 20 nM APE1 en tampón 50 mM HEPES, 100 mM KCl, 5 mM MgCl₂, pH 7.5. Tras 15 minutos a 37 °C, el enzima se inactivó diluyendo la muestra a la mitad con la disolución de carga (96% formamida, 10 mM EDTA, 0.1% Azul bromofenol) y calentándola a 95 °C durante 5 minutos. Para la visualización de la incisión se llevó a cabo una electroforesis y visualización de las bandas en las mismas condiciones anteriormente descritas para la ligación y purificación del ADN.

3.4. Ensayos de actividad endonucleasa

Se estudió la actividad endonucleasa de APE1 a concentraciones crecientes del enzima (0-200 pM). El ensayo se llevó a cabo en tampón de actividad (20 mM K₃PO₄, 50 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 2 mM DTT, pH 7.0). APE1 se preincubó 30 minutos con 5 µM NPM1 y posteriormente se mezcló con 5 µM ADNS durante 15 minutos a 37 °C. La reacción se paró con tampón de carga tal y como se realizó en la ligación y purificación del ADN. El desarrollo electroforético, tinción y visualización del gel se llevaron a cabo en las mismas

condiciones anteriormente descritas, a excepción del tiempo de electroforesis, que fue de 140 minutos a 175 V. La cuantificación de la intensidad de las bandas se realizó mediante densitometría con el software ImageJ.

3.5. Ensayos de unión

Se analizó la unión de APE1 al ADN a distintas concentraciones de la proteína (0-10 μM). Para ello, el ensayo se realizó en tampón de unión (20 mM K_3PO_4 , 50 mM NaCl, 10 mM EDTA, 2 mM DTT, pH 7.0) sobre 10 nM ADNS o ADNP fluorescentes, para determinar la afinidad de la unión APE1-ADN dependiendo de la presencia o ausencia de una incisión en la secuencia de nucleótidos, respectivamente. Para evitar la incisión en el ADNS y para poder ver así el equilibrio de unión que se establecía entre APE1-ADNS se usó un tampón sin Mg^{2+} . Además, se analizó el efecto de 5 μM NPM1 en la unión APE1-ADNS (sin incisión) y APE1-ADNP (con incisión). La unión se monitorizó mediante anisotropía de fluorescencia a 520 nm en un fluorímetro SLM 8100 (Aminco). La curva de unión se ajustó a una función cuadrática para estimar K_D con el software Origin8.

3.6. Ensayos de variación en la movilidad electroforética (EMSA)

Con el objetivo de ver el efecto de NPM1 en la formación del complejo APE1-ADN., se preincubó 2 μM APE1 con 5 μM ADNP durante 15 minutos en tampón de actividad. Posteriormente, se añadió 0-10 μM NPM1 y la mezcla se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente, tras lo cual se procedió a realizar una electroforesis en gel nativo 4-16% PAGE, Bis-Tris (Invitrogen). Los tampones de carga y de desarrollo electroforético que se emplearon también eran de Invitrogen. La electroforesis se realizó a 4°C a 150 V durante 130 minutos. El gel se tiñó con GelRed y Coomassie para detectar las bandas correspondientes a ADN y proteínas, respectivamente. El revelado se llevó a cabo con el equipo Gel Doc EZ (Bio-Rad). Las bandas se cuantificaron densitométricamente con el software ImageJ.

4. RESULTADOS

4.1. Obtención de un modelo de ADN sustrato

El ADN, además de por su longitud, presenta distinta movilidad electroforética en función de si es una molécula lineal o cerrada. La ligasa T4 liga el oligonucleótido de secuencia 5'-CTGGAGCTTGCTCCAGCGC XCGGTTCGATCGTAAGATCGACCGTGCG-3' transformándolo en una molécula cerrada en forma de mancuerna gracias a la complementariedad de bases centrales de esta estructura (**Fig. 3**). Tras la ligación y mediante una electroforesis, se consiguió distinguir el ADN ligado del que no lo había sido, puesto que el cerrado presentaba una movilidad electroforética mayor que el lineal. Además, por la intensidad de las bandas, se vio que la mayor parte del ADN había sido ligada (**Fig. 4A**). De modo que la ligación y purificación de dicho oligonucleótido permitió la preparación del modelo de ADNS, tanto fluorescente como no fluorescente. Este modelo de ADN en forma de mancuerna permite que, tras la incisión por APE1, la molécula entera de ADN permanezca unida formando el complejo de postincisión APE1-ADN. Esto no ocurriría si el ADN tuviera forma de horquilla simple sin los extremos ligados, ya que el reducido número de puentes de hidrógeno formados no permitiría que la molécula se mantuviera como una entidad.

Para confirmar que la banda seleccionada era realmente la correspondiente al ADN ligado, se llevó a cabo un ensayo de actividad con APE1 donde se revertiría la formación del ADN cerrado. Este ensayo parte de la

premisa que, a partir de un sustrato cerrado, si la endonucleasa realizaba una incisión en la posición 5' respecto al THF, la molécula se linealizaría presentando una movilidad similar al ADN sin el tratamiento de ligación. Por el contrario, si el sustrato fuese lineal, este se escindiría en dos fragmentos formando dos bandas en el gel, con una movilidad mayor que en el anterior caso debido a su menor longitud (**Fig. 4B**). En el gel se vio, que el ADN tratado con T4 y APE1, formaba una única banda cuyo tamaño era similar al ADN control sin tratar con la ligasa T4, demostrándose de esta manera que la banda escogida era la correspondiente al ADN sustrato (**Fig. 4C**).

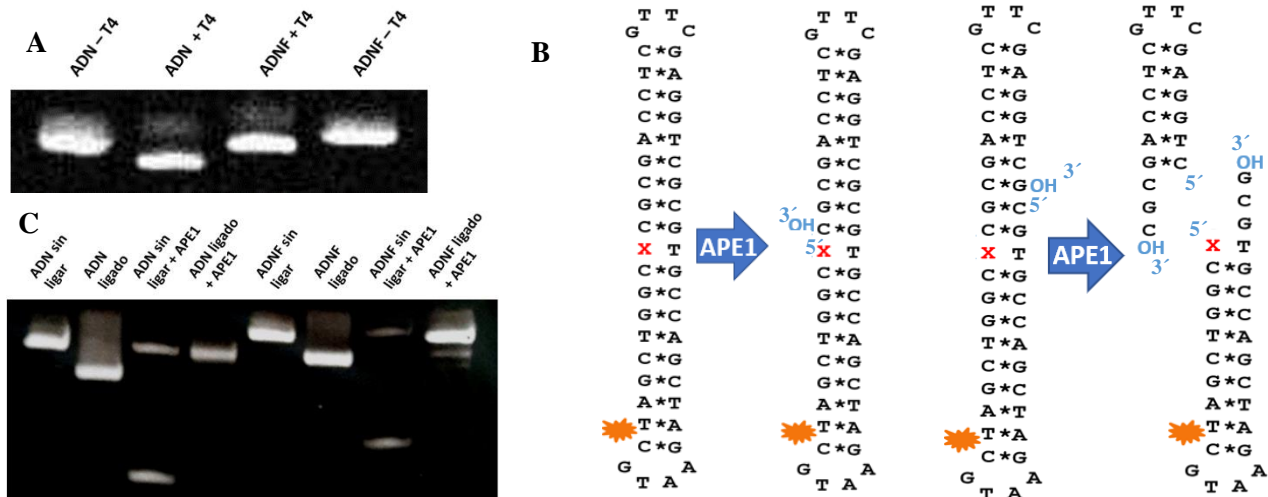


Figura 4. Preparación de la molécula de ADN sustrato. **A)** Electroforesis preparativa en gel de 18% poliacrilamida, 8M urea en tampón TBE con preparaciones de 8.8 μ M ADNS en presencia o ausencia de 4000 U/nmol ADN de ligasa T4. La ligasa T4 crea un enlace fosfodiéster entre dos nucleótidos de una cadena sencilla. Tanto el ADN normal como el fluorescente, cuando son ligados por T4, presentan mayor movilidad electroforética que cuando no lo están. **B)** Esquema de las consecuencias de la incisión de APE1 en un ADN ligado (izquierda) y un ADN no ligado (derecha). Si APE1 corta un sustrato ligado en la posición 5' al THF, la molécula se linealiza presentando una movilidad similar al ADN sin el tratamiento de ligación. Si corta un sustrato no ligado, se escinde en dos fragmentos formando dos bandas en el gel. **C)** Electroforesis en gel de 18% poliacrilamida, 8M urea en buffer TBE. Se visualiza 5 μ M de ADN normal o ADN fluorescente no ligados, ligados y cada uno de ellos en presencia de 20 nM APE1. El ADN ligado cortado por APE1 presenta una movilidad electroforética similar al ADN sin ligar. El ADN sin ligar cortado muestra dos bandas en el gel.

4.2. La actividad endonucleasa de APE1 es más eficiente en presencia de NPM1

APE1 reconoce un sitio abásico en el ADN y realiza una incisión en el enlace en posición 5' respecto a ese residuo mediante su actividad endonucleasa (Freudenthal, *et al.*, 2015). En condiciones de estrés, y debido a distintas señales, tanto NPM1 como APE1 salen del nucleolo (Antoniali, *et al.*, 2014), por lo que NPM1 podría participar en la ruta BER regulando la actividad de APE1. Por ello, se quiso analizar el efecto de NPM1 en la incisión que APE1 realiza sobre el ADN. En el sistema empleado, la incisión de APE1 supone la apertura de la molécula de ADN debido a que se induce su linealización. En el gel de poliacrilamida se distingue el sustrato del producto gracias a que el primero presenta mayor movilidad electroforética por formar un oligonucleótido cerrado, tal y como se vio en la **Fig. 4C**. A medida que la concentración de APE1 incrementa, también lo hace la densidad óptica de la banda que se corresponde con el ADN, la cual está en una posición superior a la banda correspondiente a ADNS. Se muestra cómo a mayor concentración de APE1, mayor aparición de producto, y con ello mayor tasa de actividad (**Fig. 5A**). Este resultado refleja la elevada actividad de APE1 y demuestra que la APE1 recombinante producida adquiere su conformación nativa permitiéndole ser activa. En el caso de la incisión de APE1 en el ADN en presencia de NPM1, la densidad óptica de las bandas

correspondientes al ADNP crece mucho más rápido que en ausencia de NPM1 (**Fig. 5B**). Los datos demuestran que la presencia de NPM1 influye en la actividad de APE1 provocando un aumento en su actividad.

La cuantificación densitométrica de cada una de las bandas correspondientes a sustrato y producto permite conocer el porcentaje de ADN cortado a cada concentración de APE1, pudiendo crear una curva de actividad en función de la concentración. A medida que aumenta la concentración de APE1, la relación ADN:APE1 decrece puesto que la concentración de ADN se mantiene constante. En ausencia de NPM1, cuando se alcanza una relación ADN:APE1 25000:1 (mol:mol) se cuantifica una incisión del 100% únicamente por la actividad intrínseca de APE1. Por su parte, la presencia de NPM1 provoca un 100% de incisión por parte de APE1 a concentraciones menores de la endonucleasa, con una concentración de ADN 50000 veces superior (**Fig. 5C**). Los resultados reflejan la gran eficiencia de la actividad de APE1 *in vitro*, tal y como fue descrita por Vascotto, *et al.* (2009). La actividad endonucleasa de APE1 es muy alta en presencia de un sitio abásico y NPM1 potencia esta actividad haciendo la enzima más eficiente.

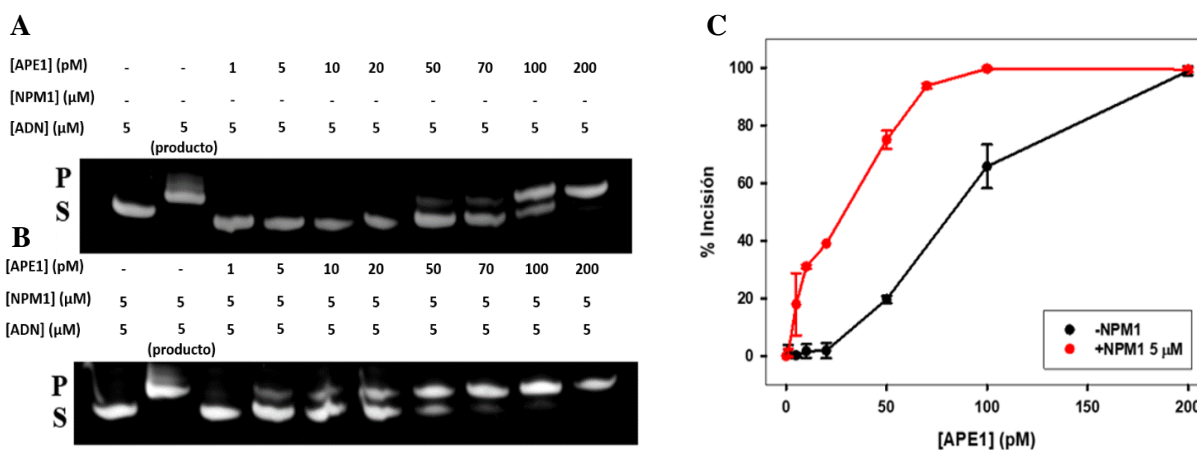


Figura 5. Actividad endonucleasa de APE1 y la influencia de NPM1. A) Electroforesis en gel de 18% poliacrilamida, 8M urea. Se ve la cantidad de 5 μM ADN cortado en función de la concentración de APE1. Las concentraciones de APE1 a las que se realiza el ensayo se encuentran en un intervalo de 0-200 pM. Se distinguen sustrato (S) y producto (P) ya que el primero presenta mayor movilidad electroforética. A medida que la concentración de APE1 incrementa, también lo hace la densidad óptica de la banda que se corresponde con el producto, la cual está en una posición superior a la otra en el gel. Se refleja así el aumento de la aparición de producto. B) Electroforesis en gel de 18% poliacrilamida, 8M urea. Se incuban las mismas concentraciones de ADN y APE1 en presencia de 5 μM NPM1. En este caso, la densidad óptica de las bandas del producto incrementa más en comparación con la ausencia de NPM1. C) Representación de la actividad endonucleasa, en unidades de porcentaje de incisión, frente a la concentración de APE1. La cuantificación densitométrica de cada una de las bandas correspondientes a sustrato y producto permite conocer el porcentaje de ADN cortado a cada concentración de APE1.

4.3. La unión de APE1 a sitios abásicos se ve favorecida por NPM1

La mayor eficiencia en la actividad endonucleasa que presenta APE1 en presencia de NPM1 puede ser debida a distintas causas, una de ellas puede ser un aumento de afinidad de la enzima por su sustrato. Para saber si NPM1 favorece la unión al ADN por parte de APE1, se procedió a cuantificar la unión al ADNS marcado con fluoresceína mediante anisotropía de fluorescencia. El Mg²⁺ actúa como cofactor de APE1 y, por tanto, su ausencia en el medio imposibilita la actividad endonucleasa de la enzima cuando esta se une al ADN (Freudenthal, *et al.*, 2015). De este modo, es posible cuantificar en el equilibrio la unión entre APE1 y el ADNS sin que haya corte en la hebra de ADN y se genere el ADNP. Tal y como muestra la curva de unión (**Fig. 6A**), a medida que la concentración de APE1 aumenta, mayor cantidad de proteína se une al ADN sustrato, reflejado en el aumento de la anisotropía. Mediante el ajuste de la curva de unión, se cuantificó una constante de

equilibrio de disociación (K_D) de 39 nM, de acuerdo con Hadi, *et al.* (2000). Sin embargo, otros autores han descrito una mayor afinidad por el sustrato que la calculada en este trabajo, con una K_D de 0.4 nM (Freudenthal, *et al.*, 2015). Estas diferencias se pueden deber a que en el estudio presente se ha empleado un tampón de mayor fuerza iónica, así como una mayor concentración de ADN. Debido a limitaciones del equipo de anisotropía, la concentración de ADN no se pudo disminuir por debajo de la K_D calculada por Freudenthal, *et al.* (2015) lo que puede explicar el valor de K_D superior obtenida en este estudio. Por otro lado, la presencia de NPM1 provoca una tendencia de la curva de unión APE1-ADNS a desplazarse hacia valores de concentración de APE1 menores, lo que se corresponde con una K_D de 25.3 nM, indicando, por tanto, un aumento en la afinidad de APE1 por el ADNS.

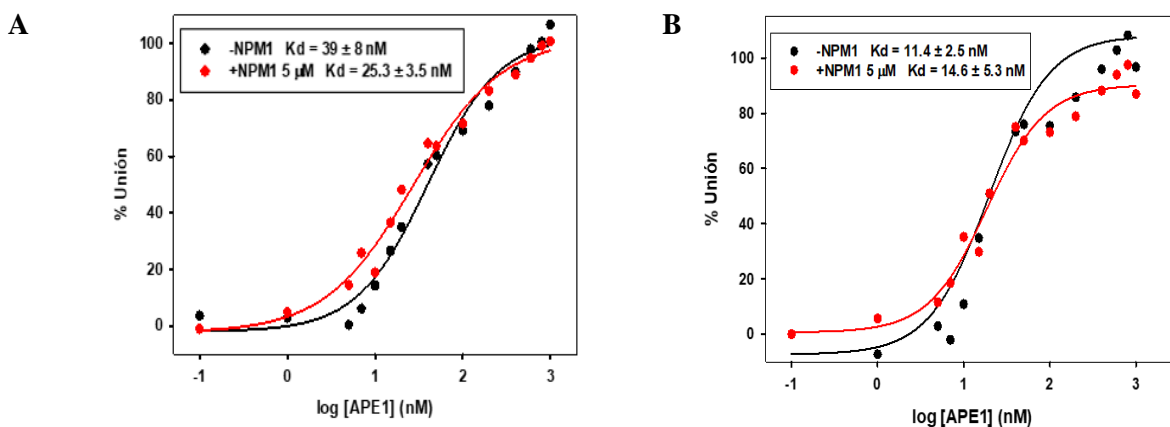


Figura 6. Unión de APE1 al sitio abásico del ADN y la influencia de NPM1. La unión se cuantifica mediante anisotropía de fluorescencia empleando ADN marcado con fluoresceína. A medida que APE1 se une al ADN, este ve limitada su capacidad para rotar aumentando así su anisotropía. **A)** Incremento de anisotropía de 10 nM ADNS, traducido a porcentaje de unión, en función de la concentración de APE1, que oscila en un intervalo de 0-1 μ M. La unión se compara en condiciones con y sin presencia de 5 μ M NPM1. **B)** Incremento de anisotropía del ADNP, traducido a porcentaje de unión, en función de la concentración de APE1. Las concentraciones de cada componente se mantienen iguales.

Se había descrito que APE1 también se une al producto de su actividad endonucleasa para evitar la liberación al medio de un ADN que presentara un corte en una hebra o *nick*. Por ello, se repitió el proceso con el ADNP marcado con fluoresceína para ver el efecto de NPM1 en la unión entre APE1 y el ADN tras la incisión. La curva de unión (**Fig. 6B**) refleja que APE1 muestra aún gran afinidad por el ADNP, con una K_D de 11.4 nM, superando la afinidad por el ADNS. Freudenthal, *et al.* (2015) describieron también una gran afinidad por el producto, pero sin ser mayor que la presentada por el sustrato, calculando una K_D de 2.7 nM. El proceso de ligación y purificación a los que se ha sometido al ADNS pueden haber hecho que en nuestro caso la afinidad de APE1 por este ligando descienda. Por su parte, la unión al producto es independiente de la presencia de NPM1, siendo la K_D cuando está presente de 14.6 nM, no suponiendo una diferencia significativa. NPM1 favorece la unión al ADNS, pero no presenta ningún efecto en la unión entre APE1 y el sitio abásico del ADN tras la incisión.

APE1 reconoce el sitio abásico del ADN uniéndose a él para llevar a cabo su función endonucleasa. Sin embargo, APE1 también es capaz de unirse con menor afinidad a otras regiones del ADN, incluidos sus extremos (Yu, *et al.*, 2010). No obstante, esta unión de menor afinidad no provoca la incisión de la región unida al no tener sitio abásico. Con el propósito de analizar si NPM1 favorece más una unión u otra, se procedió a evaluar la unión tanto en ADNS como en ADNP mediante anisotropía de fluorescencia. Para estudiar la

unión a otras regiones distintas al sitio abásico, la titulación de APE1 se llevó a cabo a concentraciones superiores a las empleadas para ver unión al sitio abásico, puesto que esta segunda unión es de menor afinidad. En ambos casos (ADNS y ADNP), la segunda unión se hace visible a partir de una concentración de APE1 superior a 1 μM . En la gráfica se hace notable la presencia de un segundo proceso de unión al aparecer un cambio en la pendiente de la curva de unión a concentraciones de APE1 superiores a 1 μM (**Fig. 7**). La disminución de anisotropía de fluorescencia en presencia de NPM1 en la segunda parte de la curva de unión refleja el papel de NPM1 como competidor por APE1 en la unión a regiones del ADN sin sitio abásico. De este modo, NPM1 impide parte de la unión de APE1 a sitios donde no actúa como endonucleasa y por lo que, a priori, la unión no tiene función o no es productiva. NPM1 permite a APE1 unirse al sitio abásico de forma más eficiente y evita, al menos parcialmente, la unión de la enzima a otras regiones.

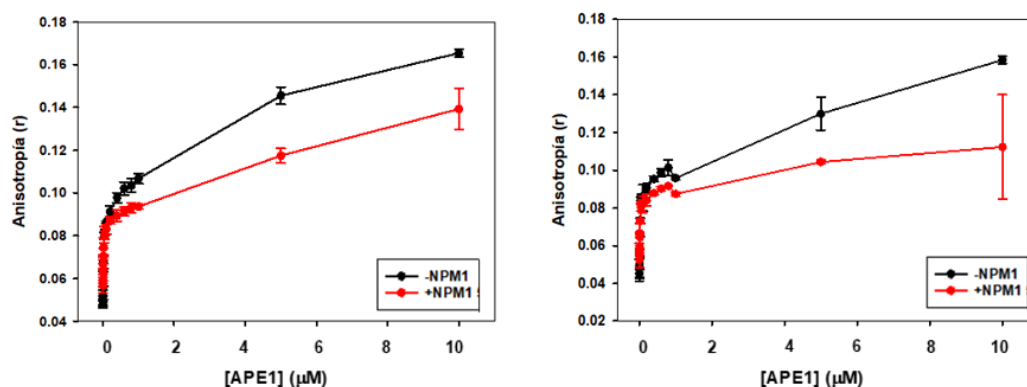


Figura 7. Unión de APE1 al sitio no abásico del ADN y la influencia de NPM1. La unión se cuantifica mediante anisotropía de fluorescencia empleando fluoresceína unida al ADN fluorescente. A medida que APE1 se une al ADN, este ve limitada su capacidad para rotar aumentando así su anisotropía. Se registra una curva de unión en base al incremento de anisotropía de 10 nM ADNS (izquierda) y ADNP (derecha) en función de la concentración de APE1, que oscila en un intervalo de 0-10 μM . La unión se compara en condiciones con y sin presencia de 5 μM NPM1.

4.4. APE1, NPM1 y ADN no forman un complejo ternario

Se quiso discernir el mecanismo por el cual NPM1 aumenta la afinidad de APE1 por el sustrato e impide su unión a regiones no abásico. Los ensayos de unión no parecían reflejar la formación de un complejo ternario entre APE1, NPM1 y ADN puesto que la anisotropía no subía en presencia de NPM1, lo que habría indicado la presencia de dicho complejo ternario. No obstante, se quiso analizar la interacción entre los tres elementos por otra técnica. Para ello, se hizo una titulación de APE1 a concentraciones constantes de NPM1 y ADNP. La visualización de los complejos se realizó mediante un gel nativo por un ensayo EMSA. APE1 a pH 7.0 presenta una carga positiva, por lo que no entra en el gel nativo. Sin embargo, si se asocia con ADN o con NPM1 (con carga negativa al pH empleado), los complejos entran y se resuelven en el gel. Las tinciones con GelRed y Coomassie permitieron detectar la presencia de ADN y proteínas, respectivamente (**Fig. 8A**). En el gel se observa una banda blanca (ADN) y azul (proteína) muy definida. Se atribuye esta banda a complejos binarios de ADN con APE1. Se observa una mayor densidad óptica del complejo binario en presencia de NPM1 en comparación con su ausencia. Por otro lado, a concentraciones altas de APE1, además de dicho complejo binario, se detecta una banda difusa ya que probablemente está formada por distintas proporciones molares APE1:ADN. Debido a que se une más de una molécula de APE1 a cada oligonucleótido se deduce que estas bandas corresponden a los complejos formados por la unión de APE1 a regiones abásicas y no

abásicas del ADN. En este caso, se observa un comportamiento diferente respecto al control de ADN y APE1 en ausencia de NPM1. También destaca una banda azul difusa por encima de la otra que pone de manifiesto la formación de complejo binario entre las dos proteínas. Estos resultados indican, de acuerdo con los resultados de anisotropía, que NPM1 es capaz de competir con el ADN por la unión de APE1 a sitios no abásicos.

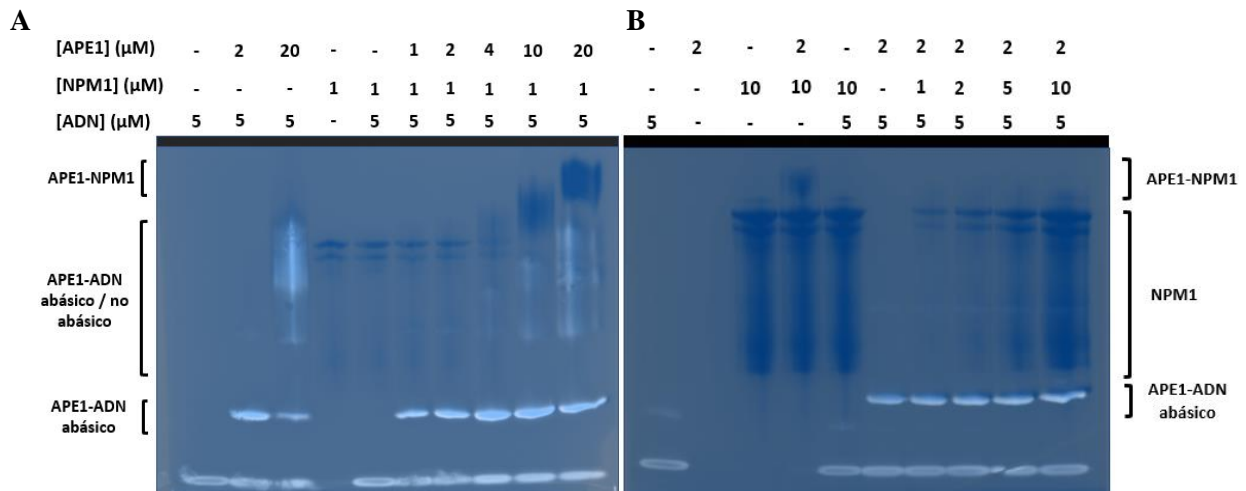


Figura 8. Efecto de NPM1 en la formación de complejos binarios. La formación de complejos APE1-ADN y APE1-NPM1 se visualiza mediante un ensayo EMSA empleando un gel de 4-16% poliacrilamida en condiciones nativas. La visualización de ADN y proteínas se realiza por tinción GelRed y Coomassie, respectivamente. Ambas imágenes aparecen solapadas. **A)** Formación de los complejos resultantes de la incubación de 5 μM ADN producto, 1 μM NPM1 y concentraciones crecientes de APE1 (0-20 μM), así como sus respectivos controles. Se ven complejos binarios formados por ADNP y APE1 unida a sitios abásicos, complejos binarios formados por distintas relaciones molares de ADNP y APE1 unida a sitios abásicos y no abásicos y complejos binarios formados por APE1 y NPM1. **B)** Formación de los complejos resultantes de la incubación de 5 μM ADN producto, 2 μM APE1 y concentraciones crecientes de NPM1 (0-10 μM), así como sus respectivos controles. Se ven complejos binarios formados por ADNP y APE1 unida a sitios abásicos, NPM1 en exceso que no forma ningún complejo y complejos binarios formados por APE1 y NPM1.

Sin embargo, la diferencia de comportamiento de la banda difusa respecto al control no descartaba la formación de un complejo ternario. Para saber si el efecto de NPM1 está mediado por la formación de un complejo ternario, se hizo una titulación de NPM1 a concentraciones constantes de APE1 y ADNP para ver el efecto de la proteína titulada en la formación del complejo binario APE1-ADN (**Fig. 8B**). En estas condiciones, seguía viéndose la banda perteneciente al complejo binario APE1-ADN. Por el contrario, la banda difusa desapareció debido a que la concentración de APE1 disponible era menor. También se vio la banda perteneciente al complejo APE1-NPM1 sin ADN. Densitométricamente se cuantificó una mayor cantidad de complejo binario APE1-ADNP a medida que la concentración de NPM1 aumentaba. NPM1 seguía favoreciendo la unión de APE1 a sitios abásicos del ADN evitando la unión a sitios no abásicos sin llegarse a formar un complejo ternario.

5. DISCUSIÓN

APE1 es una endonucleasa implicada en múltiples procesos celulares como la ruta BER, coactivación redox de factores de transcripción, etc. (Li & Wilson, 2014). En concreto, en la ruta BER, esta endonucleasa reconoce un sitio abásico en el ADN y corta el enlace en posición 5' para permitir su reparación. La enzima, en ausencia de daño o estrés, se encuentra mayoritariamente en el nucleoplasma. Sin embargo, en función de ciertas señales se transloca a citosol, así como a mitocondrias para la reparación del ADN mitocondrial (Tell, *et al.*, 2005). APE1 también puede encontrarse en nucleolo en función de su interacción con NPM1 y modificaciones

postraduccionales (Fantini, *et al.*, 2010). NPM1 es una proteína que interacciona con muchas proteínas nucleolares regulando su dinámica de localización, de forma que su salida del nucleolo conlleva también la salida de las moléculas con las que interacciona (Antoniali, *et al.*, 2014). La fosforilación de NPM1 en T199 en respuesta a distintos daños celulares, induce su salida del nucleolo (Heath, *et al.*, 2017). En el caso de APE1, su salida mediada por NPM1 permite dar respuesta a la señal que desencadena la translocación, como puede ser daño oxidativo en el ADN (Antoniali, *et al.*, 2014). La colocalización de ambas proteínas podría reflejar su interacción *in vivo* y con ello, la modulación de APE1 por parte de NPM1 (Antoniali, *et al.*, 2014; Vascotto, *et al.*, 2009). Pese a la gran importancia de las funciones de ambas proteínas, se conoce poco acerca de su interacción y la función de esta. En este trabajo se ha estudiado la regulación que ejerce NPM1 sobre la actividad endonucleasa de APE1 y un posible mecanismo por el cual podría darse dicha modulación.

Como se ha comprobado en este estudio, APE1 presenta una alta afinidad por el sitio abásico del ADN, lo que permite un rápido reconocimiento y con ello una elevada actividad. Su elevada eficiencia catalítica resulta útil para responder con rapidez ante un daño en el ADN, reduciendo la posibilidad de aparición de mutaciones y sus consecuencias. APE1 muestra una alta afinidad por el sitio abásico esté o no cortado su enlace 5', de ahí su gran afinidad tanto por su sustrato como por su producto. Este factor es relevante puesto que, si el ADN se disociara rápidamente tras la incisión antes de que la siguiente enzima de la ruta lo captara, se estaría generando un ADN con una rotura de hebra sencilla, lo cual facilitaría la aparición de mutaciones en el intento de la célula por reparar rápidamente la lesión.

Según nuestros resultados, la interacción con NPM1 provoca un aumento en la afinidad de APE1 por su sustrato, facilitando la unión de APE1 al sitio abásico. El aumento en la afinidad favorece la capacidad de reconocimiento de APE1 por el sitio abásico, lo que explicaría el aumento de la actividad endonucleasa. Sin embargo, la afinidad de APE1 por el producto también influye en la actividad puesto que el enzima requiere la disociación del producto para captar un nuevo sustrato. Nuestros datos indican que NPM1, una vez realizado el corte, no hace aumentar la afinidad por el producto, puesto que esto se opondría a la disociación entre APE1 y el producto y disminuiría la actividad de APE1. No obstante, NPM1 tampoco facilita la disociación de APE1 del producto, aunque fuese favorable en la actividad de la endonucleasa. Por lo tanto, el aumento de actividad de APE1 por NPM1 estaría basado en favorecer la unión al sustrato, pero no agilizar la disociación del producto, lo cual es interesante para la célula puesto que se evita riesgo de mutaciones y citotoxicidad por la creación de un ADN con una incisión en una hebra.

NPM1 también tiene efecto sobre la unión de APE1 sobre regiones no abásicas del ADN. Debido a que estas interacciones son de menor afinidad, NPM1 es capaz de competir con ellas. NPM1 permite a APE1 reconocer y unirse al sitio abásico de forma más eficiente excluyendo su unión a otras regiones, lo que se traduce en una mayor concentración de APE1 disponible para su unión a regiones productivas o donde cumpla una función. Parece que NPM1 hace más selectiva APE1 para su unión a su sustrato o sitios abásicos. Mediante este efecto, la actividad de APE1 también se ve favorecida puesto que no se pierde parte de la enzima secuestrada por interacciones, *a priori*, no funcionales.

Según los resultados obtenidos en nuestro grupo, la interacción entre APE1 y NPM1 es menos afín que la que establecen APE1 y los sitios abásicos del ADN, con valores de K_D de 0.4 μM y 39 nM, respectivamente. La discordancia entre las K_D entre APE1 y ADN calculadas por Freudenthal, *et al.* (2015) (0.4 nM) y las presentadas en este trabajo se pueden deber a la utilización de un tampón con mayor fuerza iónica, así como la concentración de ADN empleada. El estudio de los valores de afinidad entre APE1 y los sitios abásicos del ADN por anisotropía teniendo en cuenta los datos de K_D previamente publicados implicaba el uso de unas concentraciones de ADN por debajo del límite de resolución. Por ello, la concentración de ADN empleada no se pudo disminuir por debajo de la K_D calculada por Freudenthal, *et al.* (2015), lo que puede explicar el mayor valor de la K_D obtenido en el presente trabajo. En base a nuestros resultados, la regulación de NPM1 en la actividad endonucleasa de APE1 podría basarse en dos efectos: por un lado, NPM1 compite con sitios no abásicos del ADN por su unión a APE1, de modo que interacciona con la enzima impidiendo su unión a estos sitios resultando en una mayor concentración de APE1 hábil; por otro lado, aunque la afinidad entre las dos proteínas sea menor que la que presenta APE1 por sitios abásicos, la presencia de mucha mayor concentración de NPM1 en la célula (Box, *et al.*, 2016) facilita la interacción entre las dos proteínas, que a su vez hace aumentar la afinidad por los sitios abásicos induciendo la unión de APE1 al ADN.

Aun con todo, se sigue sin conocer el mecanismo molecular por el cual NPM1 regula la actividad de APE1. Se ha visto que APE1, NPM1 y ADN no forman un complejo ternario, es decir, NPM1 ejerce su función interaccionando con APE1, pero no con el ADN. NPM1 interacciona con el extremo N-terminal de APE1 (Vascotto, *et al.*, 2009), que es una región intrínsecamente desordenada (IDR) en la que se predicen multitud de sitios de regulación de APE1 por modificación postraduccionales y de unión a ligandos (Antoniali, *et al.*, 2014). En este trabajo se ha visto que la interacción con NPM1 aumenta la actividad del enzima. Modificaciones postraduccionales de esta región, tales como acetilaciones, también favorecen la actividad (Roychoudhury, *et al.*, 2019). Además, la acetilación del dominio impide la interacción con NPM1, favoreciendo la salida del nucleolo de APE1 (Antoniali, *et al.*, 2014; Fantini, *et al.*, 2010). Todo ello parece mostrar la importancia de este dominio en la regulación de la actividad de APE1. No obstante, la dificultad de resolver la estructura del dominio por su alta flexibilidad no permite conocer a nivel atómico su interacción con ADN. Este dominio podría actuar como un brazo que “abraza” el ADN dificultando la interacción con el sitio abásico y/o dificultando la disociación. Modificaciones postraduccionales en él o interacciones con otras proteínas podrían cambiar la conformación del dominio y con ello modular su función. NPM1 podría abrir el “brazo” haciendo más accesible el centro activo de la proteína al ADN y facilitar así el reconocimiento e interacción de APE1 con el sitio abásico. Una vez que APE1 interaccionara con el ADN, NPM1 se disociaría permitiendo que el brazo rodease el ADN estabilizando el complejo. La falta de influencia de NPM1 sobre la unión con el producto se podría deber a su incapacidad de competir por APE1 una vez el complejo APE1-ADN estable se forme.

6. CONCLUSIONES

APE1 es una endonucleasa con gran afinidad por sitios abásicos en el ADN, lo que parece estar directamente relacionado con su alta actividad. Nuestros resultados permiten concluir que NPM1, al interaccionar con APE1,

aumenta aún más la afinidad de APE1 por un sitio abásico en el ADN, no viéndose lo mismo con el producto. Por otro lado, NPM1 contrarresta la tendencia de APE1 por unirse a sitios no abásicos del ADN, lo que se supone que genera una mayor concentración hábil de APE1 aumentado también su actividad sobre los sitios abásicos. La combinación de estas acciones de NPM1 explicaría que favorezca la actividad catalítica de APE1.

Queda por dilucidar el mecanismo exacto por el cual NPM1 ejerce su modulación, descartándose la formación de un complejo ternario que module la unión de APE1 al ADN. NPM1 podría ejercer su regulación modulando la conformación de la región N-terminal de APE1. Se sugiere continuar la investigación teniendo en cuenta la conformación que adopta dicha región en cada momento del ciclo de incisión, tanto en el momento de asociación como tras la incisión.

7. BIBLIOGRAFÍA

- Antoniali, G., Lirussi, L., Poletto, M., & Tell, G. (2014). Emerging roles of the nucleolus in regulating the DNA damage response: the noncanonical DNA repair enzyme APE1/Ref-1 as a paradigmatical example. *Antioxidants & redox signaling*, 20(4), 621-639.
- Arregi, I., Falces, J., Olazabal-Herrero, A., Alonso-Mariño, M., *et al.* (2015). Leukemia-associated mutations in nucleophosmin alter recognition by CRM1: molecular basis of aberrant transport. *PloS one*, 10(6), e0130610.
- Box, J. K., Paquet, N., Adams, M. N., Boucher, D., *et al.* (2016). Nucleophosmin: from structure and function to disease development. *BMC molecular biology*, 17(1), 19.
- Burra, S., Marasco, D., Malfatti, M. C., Antoniali, G., *et al.* (2019). Human AP-endonuclease (Ape1) activity on telomeric G4 structures is modulated by acetyltable lysine residues in the N-terminal sequence. *DNA repair*, 73, 129-143.
- Fantini, D., Vascotto, C., Marasco, D., D'ambrosio, C., *et al.* (2010). Critical lysine residues within the overlooked N-terminal domain of human APE1 regulate its biological functions. *Nucleic acids research*, 38(22), 8239-8256.
- Freudenthal, B. D., Beard, W. A., Cuneo, M. J., Dyrkheeva, N. S., *et al.* (2015). Capturing snapshots of APE1 processing DNA damage. *Nature structural & molecular biology*, 22(11), 924.
- Gorman, M. A., Morera, S., Rothwell, D. G., de La Fortelle, E., *et al.* (1997). The crystal structure of the human DNA repair endonuclease HAP1 suggests the recognition of extra-helical deoxyribose at DNA abasic sites. *The EMBO journal*, 16(21), 6548-6558.
- Grummitt, C. G., Townsley, F. M., Johnson, C. M., Warren, A. J., *et al.* (2008). Structural consequences of nucleophosmin mutations in acute myeloid leukemia. *Journal of Biological Chemistry*, 283(34), 23326-23332.
- Hadi, M. Z., Coleman, M. A., Fidelis, K., Mohrenweiser, H. W., *et al.* (2000). Functional characterization of Ape1 variants identified in the human population. *Nucleic acids research*, 28(20), 3871-3879.
- Heath, E. M., Chan, S. M., Minden, M. D., Murphy, T., *et al.* (2017). Biological and clinical consequences of NPM1 mutations in AML. *Leukemia*, 31(4), 798.
- Krokan, H. E., & Bjørås, M. (2013). Base excision repair. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 5(4), a012583.

- Lee, H. H., Kim, H. S., Kang, J. Y., Lee, B. I., *et al.* (2007). Crystal structure of human nucleophosmin-core reveals plasticity of the pentamer–pentamer interface. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 69(3), 672-678.
- Li, M., & Wilson III, D. M. (2014). Human apurinic/apyrimidinic endonuclease 1. *Antioxidants & redox signaling*, 20(4), 678-707.
- Lindahl, T. (1993). Instability and decay of the primary structure of DNA. *Nature*, 362(6422), 709-715.
- Lindström, M. S. (2011). NPM1/B23: a multifunctional chaperone in ribosome biogenesis and chromatin remodeling. *Biochemistry research international*, 2011.
- Liu, Y., Prasad, R., Beard, W. A., Kedar, P. S., *et al.* (2007). Coordination of steps in single-nucleotide base excision repair mediated by apurinic/apyrimidinic endonuclease 1 and DNA polymerase β . *Journal of Biological Chemistry*, 282(18), 13532-13541.
- Maxam, A. M., & Gilbert, W. (1977). A new method for sequencing DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 74(2), 560-564.
- Mullins, E. A., Rodriguez, A. A., Bradley, N. P., & Eichman, B. F. (2019). Emerging Roles of DNA Glycosylases and the Base Excision Repair Pathway. *Trends in biochemical sciences* (En prensa)
- Poletto, M., Malfatti, M. C., Dorjsuren, D., Scognamiglio, P. L., *et al.* (2016). Inhibitors of the apurinic/apyrimidinic endonuclease 1 (APE1)/nucleophosmin (NPM1) interaction that display anti-tumor properties. *Molecular carcinogenesis*, 55(5), 688-704.
- Roychoudhury, S., Pramanik, S., Harris, H. L., & Bhakat, K. K. (2019). Biochemical and Cellular Assays to Assess the Effects of Acetylation on Base Excision Repair Enzymes. En *Protein Acetylation* (pp. 191-206). Humana, New York, NY.
- Summer, H., Grämer, R., & Dröge, P. (2009). Denaturing urea polyacrylamide gel electrophoresis (Urea PAGE). *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*, (32), e1485.
- Tell, G., Damante, G., Caldwell, D., & Kelley, M. R. (2005). The intracellular localization of APE1/Ref-1: more than a passive phenomenon?. *Antioxidants & redox signaling*, 7(3-4), 367-384.
- Tsutakawa, S. E., Shin, D. S., Mol, C. D., Izumi, T., *et al.*, (2013). Conserved structural chemistry for incision activity in structurally non-homologous apurinic/apyrimidinic endonuclease APE1 and endonuclease IV DNA repair enzymes. *Journal of Biological Chemistry*, 288(12), 8445-8455.
- Urbaneja, M. A., Skjærven, L., Aubi, O., Underhaug, J., *et al.* (2017). Conformational stabilization as a strategy to prevent nucleophosmin mislocalization in leukemia. *Scientific reports*, 7(1), 13959.
- Vascotto, C., Fantini, D., Romanello, M., Cesaratto, L., *et al.* (2009). APE1/Ref-1 interacts with NPM1 within nucleoli and plays a role in the rRNA quality control process. *Molecular and cellular biology*, 29(7), 1834-1854.
- Vascotto, C., Lirussi, L., Poletto, M., Tiribelli, M., *et al.* (2014). Functional regulation of the apurinic/apyrimidinic endonuclease 1 by nucleophosmin: impact on tumor biology. *Oncogene*, 33(22), 2876.
- Xanthoudakis, S., Miao, G. G., & Curran, T. (1994). The redox and DNA-repair activities of Ref-1 are encoded by nonoverlapping domains. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 91(1), 23-27.
- Yu, E., Gaucher, S. P., & Hadi, M. Z. (2010). Probing conformational changes in Ape1 during the progression of base excision repair. *Biochemistry*, 49(18), 3786-3796.