

4-бөлім
**МОЛЕКУЛАЛЫҚ
БИОЛОГИЯ ЖӘНЕ ГЕНЕТИКА**

Раздел 4
**МОЛЕКУЛЯРНАЯ
БИОЛОГИЯ И ГЕНЕТИКА**

Section 4
**MOLECULAR
BIOLOGY AND GENETICS**

Бисенбаев А.К.

Казахский национальный университет имени аль-Фараби, Казахстан, Алматы
Научно-исследовательский институт проблем биологии и биотехнологии

Эксцизионная репарация оксидативно поврежденных оснований ДНК в растениях

Активные формы кислорода вызывают повреждение всех клеточных макромолекул. Повышенный уровень активных форм кислорода приводит к гибели, как клеток растений, так и животных, что указывает на общность механизмов действия свободных радикалов кислорода. ДНК является основной мишенью для радикалов кислорода. В настоящее время описано 80 разных типов повреждений ДНК связанных с радикалами кислорода, включая разрывы в цепи ДНК и модификации сахаров. Окислительное повреждение оснований ДНК в основном являются субстратом эксцизионной репарации оснований. Механизмы репарации таких повреждений ДНК является объектом интенсивных исследований у бактерий, дрожжей и клеток млекопитающих, малоизвестными и практически не изученными остаются эти проблемы в растениях, пренебрегая при этом особым статусом растений среди живых существ и их сельскохозяйственной ценностью. Последние данные в области изучения репарации ДНК у высших растений указывают на то, что растения используют механизмы, аналогичные тем, которые присутствуют в других эукариотических организмах.

Ключевые слова: Активные формы кислорода, Эксцизионная репарация, ДНК-гликозилаза, AP-эндонуклеаза, ДНК-полимераза.

Bissenbaev A.K.

Al-Farabi Kazakh National university, Kazakhstan, Almaty
Scientific Research Institute of biology and biotechnology problems

Base Excision Repair of Oxidative DNA lesions in plants

Reactive oxygen species cause damage to all cellular macromolecules. Increased level of reactive oxygen species triggers cell death in plant and animal organisms indicating common mechanisms and targets of the free radicals action. DNA is the main cellular target for reactive oxygen species, currently, about 80 different types of oxidative damage to DNA have been identified including strand breaks, base and sugar modifications. In cells reactive oxygen species generate mostly non-bulky DNA lesions, the majority of which are substrates for the base excision repair. Until now, molecular characterizations of the DNA repair mechanisms have been mainly focused on E. coli, yeast and mammalian cells. To keep genome integrity and to assure faithful transfer of genetic information during cell division, living organisms develop several distinct DNA repair systems that remove and/or tolerate the DNA lesions. Although DNA repair mechanisms are well studied in bacteria, yeast, nematode and mammalian cells, little is known about the base excision repair pathway in plant. Recent advances in the study of DNA repair in higher plants show that they use mechanisms similar to those present in other eukaryotes to remove oxidized bases and other oxidative DNA lesions.

Key words: Reactive oxygen species, Base excision repair, DNA-glycosylase, AP-endonuclease, DNA-polymerase.

Бисенбаев А.Қ.

Әл-Фараби атындағы Қазақ ұлттық университеті, Қазақстан, Алматы
Биология және биотехнология мәселелері ғылыми-зерттеу институты

Өсімдіктерде тотыға зақымданған ДНҚ негіздерінің эксцизиялық репарациясы

Оттегінің белсенді формалары бүкіл клеткалық макромолекулалардың: мембраналық липидтер, белоктар мен нуклеин қышқылдарының зақымдануына алып келеді. Оттегінің белсенді түрлерінің жоғары мөлшері өсімдік клеткаларымен қатар жануар клеткаларын өлімге душар етуі оларда оттегінің бос радикалдарының әсер ету механизмдерінің ортақтығын көрсетеді. ДНҚ оттегі радикалдарының негізгі нысаны болып табылады. Қазіргі уақытта оттегінің радикалдарымен байланысты ДНҚ тізбегіндегі үзілістер мен қанттардың модификациясын қамтитын 80 түрлі ДНҚ зақымданулары белгілі. ДНҚ негіздерінің тотыға зақымданулары негіздердің эксцизиялық репарациясының субстраты болып табылады. Мұндай ДНҚ зақымдануларының репарациялану механизмі сүтқоректілер клеткасы, ашытқылар мен бактерияларда қарқынды зерттеу объектісі болып табылады. Алайда ауылшаруашылық маңыздылығына және тірі организмдер арасындағы ерекше орнына қарамастан өсімдіктерде бұл проблемалар әлі де түсініксіз және іс жүзінде зерттелмеген күйде қалуда. Жоғары сатыдағы өсімдіктерде ДНҚ репарациясын зерттеу бағытындағы соңғы деректер өсімдіктер басқа эукариоттық ағзаларда кездесетін механизмдерге ұқсас механизмдерді қолданатынын көрсетеді.

Түйін сөздер: Оттегінің белсенді формалары, Эксцизиялық репарация, ДНҚ-гликозилаза, AP-эндонуклеаза, ДНҚ-полимераза

ЭКСЦИЗИОННАЯ РЕПАРАЦИЯ ОКСИДАТИВНО ПОВРЕЖДЕННЫХ ОСНОВАНИЙ ДНК В РАСТЕНИЯХ

Введение

Клеточная ДНК является объектом активного действия различных агентов экзогенного и эндогенного происхождения. При этом, окислительное повреждение ДНК, вызванное активными формами кислорода (АФК) считается основным типом эндогенных клеточных повреждений. Окислительное повреждение ДНК под действием радикалов кислорода происходит непрерывно во время нормального клеточного метаболизма, под действием ионизирующего и УФ- излучения, а также редокс-активных соединений. Так как остатки оснований предоставляют важную информацию, потеря такого компонента приводит к ошибочному синтезу или к остановке работы ДНК полимеразы. Что, в свою очередь, ведет к мутациям и к замыканию репликативной вилки во время репликации и транскрипции. Такие повреждения могут привести к нестабильности генома, в виде хромосомных aberrации и дефектов экспрессии генов, в конечном счете, к патологии и дисфункции на клеточном и тканевом уровне связанные с дефектами в репарации ДНК [1]. В клетке существует несколько путей репарации ДНК. Поврежденные азотистые основания удаляет система эксцизионной репарации оснований (BER) [2]. Хотя механизмы репарации таких повреждений ДНК является объектом интенсивных исследований у бактерий, дрожжей, нематод и клеток млекопитающих [3], малопонятными и практически не изученными остаются эти проблемы в растениях [4].

Растения не могут изменять своё положение в грунте, и поэтому постоянно подвергаются воздействию экологических и генотоксических агентов, в том числе ультрафиолетовому и ионизирующему излучению [4]. Всё это, в первую очередь, действует на клеточную ДНК, вызывая её повреждения. Поскольку развитие половых клеток (гамет) и соматических клеток у растений не разделено, т.е. половые клетки растений, образуются из обычных соматических тканевых клеток, мутаций, образуемые в этих клетках напрямую передаются в половые клетки.

Таким образом, в растениях репарация ДНК является не только фундаментальным клеточным процессом для защиты клеток от повреждений, но также отвечает за правильную пе-

редачу генетической информации от одного поколения к другому. Следовательно, в растениях, возможно, существует сильное эволюционное давление на развитие систем репарации ДНК.

Источники окислительного повреждения ДНК

Растения непрерывно генерируют активные формы кислорода (АФК) в качестве побочных продуктов метаболических реакции клетки, которые происходят в хлоропластах, митохондриях и пероксисомах [5]. АФК генерируемые в хлоропластах в качестве побочных продуктов фотосинтеза включают синглетный кислород ($^1\text{O}_2$) и супероксид радикал ($\text{O}_2\cdot$), тогда как в пероксисомах продуцируются в основном $\text{O}_2\cdot$ и пероксид водорода (H_2O_2). В темное время суток, большая часть АФК накапливается за счет функционирования митохондрий, которые в основном формируют $\text{O}_2\cdot$ в результате последовательного одновалентного восстановления кислорода в цепи переноса электронов [6,7]. АФК также активно генерируются в реакциях катализируемых оксидазами и пероксидазами в ответ на действие определенных факторов окружающей среды, таких как патогены и другие стимулы, которые играют важную роль в развитии растений [8]. Система NADPH-оксидазы в плазматической мембране является одним из активных механизмов накопления АФК, который в основном генерирует $\text{O}_2\cdot$. NADPH-оксидаза участвует в нескольких физиологических процессах, таких как «окислительный взрыв», который является одной из наиболее ранних реакции растений на любые стрессовые воздействия (как биотической, так и абиотической) [9]. Накопление АФК в клетке может быть вызван под воздействием неблагоприятных факторов окружающей среды таких как озон [10], УФ [11] и ионизирующего излучения [12]. Время *полужизни*, реакционные и диффузионные способности разных типов АФК сильно влияют на их повреждающий эффект. H_2O_2 является относительно стабильным, внутриклеточное содержание которой достигает до микромолярной концентрации, остальные радикалы кислорода характеризуется очень коротким временем *полужизни*. $\text{O}_2\cdot$ могут быть преобразованы в H_2O_2 в реакциях катализируемом супероксиддисмутазой (СОД) и возможно, из H_2O_2 может образовываться гидроксид-радикал ($\text{OH}\cdot$), который является весьма сильным окислителем. Подсчитано, что среднее расстояние диффузии

$\text{OH}\cdot$ до вступления в реакцию с клеточным компонентом составляет всего 3 нм, примерно средний диаметр типичного белка [13]. Поэтому $\text{OH}\cdot$ должен накапливаться в непосредственной близости от ДНК, чтобы окислить его.

Против окислительного стресса у растительной клетки выработана антиоксидантная система. Эта система состоит из антиоксидантных ферментов (супероксиддисмутазы, аскорбатпероксидазы, каталазы и др.) и низкомолекулярных антиоксидантов, таких как глутатион, аскорбиновая кислота, каротиноиды, токоферолы и др. Степень цитотоксического повреждения компонентов клетки вызванного АФК, в конечном счете, зависит от баланса между антиоксидантными системами и АФК продуцирующими механизмами. низкомолекулярные антиоксиданты играют важную роль в сбалансированном ответе на генерацию АФК. Так, у мутантой формы арабидопсиса с повышенной чувствительностью к озону обнаружено дефицит аскорбиновой кислоты, и данное растение также показал высокую чувствительность к другим АФК генерирующим факторам, таким как диоксид серы и УФ-излучение [14].

Типы окислительного повреждения ДНК

Около 80 типов окисленных форм молекул ДНК было обнаружено. Чувствительный аналитический метод с использованием 8-гидроксидеооксигуанозина (8-OHdG) для выявления окисленных молекул ДНК позволяет исследование реакций окислений ДНК *in vivo*. Необходимо отметить, что результатом взаимодействия АФК с молекулой ДНК является структурная модификация азотистых оснований, разложение пятичленного кольца дезоксирибозы, а также расщепление сахаро-фосфатного остова, что ведет к фрагментации этого полимера (рисунки 1). Гидроксильный радикал, атакуя С5-С6 двойные связи, продуцирует окси-6-ил и 6-гидрокси-5-ил радикалы, которые в дальнейшем вступая в реакцию, приводит к образованию многочисленных стабильных повреждений ДНК [15]. Большая часть продуктов окисления пиримидинов представляет собой тимин-гликоль, 5,6-дигидро-тимин и цитозин-гликоль [16]. При дезаминировании цитозин-гликоль превращается в урацил-гликоль, тогда как дезаминирование и дегидратация цитозина приводит к образованию 5-гидроксиурацила [17]. Кроме этого, под действием АФК ароматические кольца пиримидинов могут подвергаться к фрагментации с образова-

нием метил-*тартронил*-мочевины, 5-гидроксигидантоина, N-формил-мочевины или мочевины [18]. Гидроксильный радикал также реагирует с пуринами, при этом взаимодействие происходит с С4-, С5- и С8- атомами пуринов [19]. Среди модифицированных пуриновых оснований особенно часто встречается 7,8-гидро-8-гидроксигуанин (8-охоG) (в стационарном состоянии 0,07–145 аддуктов/106 нт), которые образуют пару с А, и вызывает трансверсии G→Т. Кроме того он, как и многие другие модифицированные нуклеотиды, может включаться в ДНК из внутриклеточного пула модифицированных dNTP, образуя пару с С или А, при этом вызывая трансверсии не только G→Т, но и А→С. Другой окисленный вариант гуанина 2,6-диамино-4-гидрокси-5-формаимидопиримидин (FaPyGua) [15]. Менее изученными являются окисленные производные аденина, которые включают в себя 8-охо-аденин и 4,6-диамино-5-формаимидопиримидин (FaPyAde) [20].

Помимо прямого окисления, основания, молекула ДНК может быть повреждена, опосредовано, в результате реакции с промежуточными продуктами свободно-радикального окисления других макромолекул. Одним из основных источников опосредованного окислительного повреждения оснований является перекисное окисление липидов, вызванное атакой радикалами кислорода полиненасыщенных жирных кислот. В числе продуктов этого процесса – малондиальдегид, кротональдегид и акролеин. Малондиальдегид реагирует с остатками гуанина в составе ДНК с образованием так называемого M1G аддукта, пиримидопуринона [21]. В свою очередь акролеин и кротональдегид приводит к образованию этено-аддуктов, таких как этено-А и этено-С [22].

Дополнительным источником окислительного повреждения ДНК является свободно радикальная модификация дезоксирибоз. Окислительной атаке АФК дезоксирибоза подвержена в положении С1, что ведет к появлению участка без основания (апуриновые/ апиримидиновые сайты, AP-сайт), и С4, что вызывает фрагментацию дезоксирибозы [1]. Если в обеих цепях ДНК AP-участки располагаются друг против друга или фрагментация дезоксирибозы произошла вблизи, то появляются дунитиевые разрывы ДНК.

Окислительные повреждения имеют разные генотоксичные эффекты. Крайние формы окисленных пиримидинов, такие как мочевина, сильно блокирует репликацию ДНК [23], тогда

как окислительно поврежденные пиримидины, сохраняющие интактное кольцо, например дигидротимин, как правило, не блокируют синтез ДНК, и ДНК полимеразы легко обходит такие повреждения в составе ДНК [24].

Как отмечалось выше, действие АФК на ДНК является одной из причин возникновения многочисленных модифицированных азотистых оснований, которые удаляются ДНК-гликозилазами. Однако специфическая ДНК-гликозилазная реакция приводит к образованию AP-сайтов и, как следствие, в ДНК может генерироваться одно – и дунитиевые разрывы. Общее число AP-сайтов, образующихся в течение дня в геномной ДНК отдельной клетки человека, оценивается в ~10 000 [174], а по другим оценкам может достигать в клетках разных тканей человека и грызунов 50 000–200 000 [1]. Обычно, в отсутствие репарации, AP-сайты приводят к заменам нуклеотидов (AP-сайт→Т), а также могут быть источником мутаций со сдвигом рамки считывания и других мутаций [2]. Образование AP-сайтов может быть следствием спонтанной депуринизации ДНК, однако модификация азотистых оснований с участием АФК и других свободных радикалов рассматривается в качестве одной из основных причин этого явления.

ДНК-гликозилазы ключевой фермент BER механизма репарации

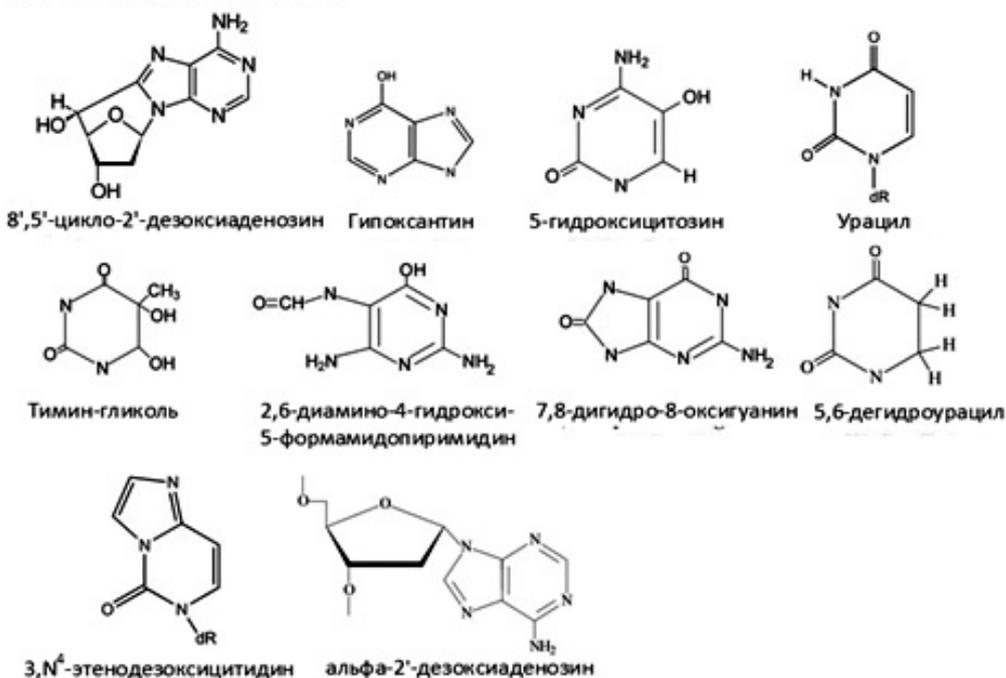
Окислительное повреждение оснований ДНК в основном репарируются с помощью BER механизма репарации [2]. Этот процесс инициируется ферментами ДНК-гликозилазами. ДНК-гликозилазы относительно небольшие (молекулярная масса приблизительно 30-50 кДа) мономерные белки, которые не требуют кофакторов для проявления их активности. В BER механизме репарации ДНК, ДНК-гликозилаза расщепляет N-гликозидную связь между поврежденным основанием и сахарофосфатным остовом, в результате чего на месте поврежденного звена образуется AP-сайты и/или одноцепочечные разрывы в ДНК, которые в последующем тоже должны подвергаться процессингу для продолжения BER. ДНК-гликозилазы классифицируются на две большие группы: Монофункциональные и бифункциональные [2].

Монофункциональные ДНК-гликозилазы расщепляют N-гликозидную связь между поврежденным основанием и сахарофосфатным остовом, в результате образуются AP- сайты (рисунок 2). AP-сайты, служат субстратами для

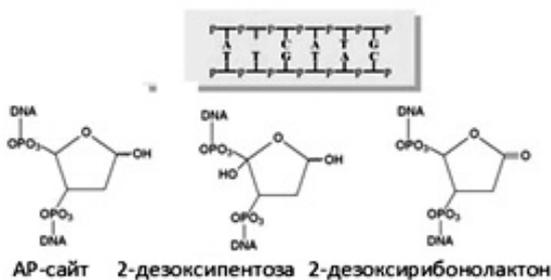
AP-эндонуклеаз, которые гидролизуют фосфодиэфирную связь непосредственно с 5'-стороны от AP-сайта и приводит к появлению одноцепочечного разрыва с 3'-концевой OH-группой, служащей субстратом для ДНК-полимераз, и 5'-концевым остатком 2'-деоксирибозо-5'-фосфата (dRP). Для завершения репарации необходим репаративный синтез ДНК (заполнение

бреши) и последующее лигирование разрыва. Однако, бифункциональные ДНК-гликозилазы не только генерируют AP-сайты (расщепляют N-гликозидную связь), но и удаляют поврежденные основания через β и δ -элиминацию, что приводит к накоплению генотоксичных разрывов с 3'-блокирующими группами (рисунок 1 и 2).

А. Повреждение основания ДНК



В Поврежденные сахара



С Одно- и двухцепочечные разрывы с 3'-блокирующими группами

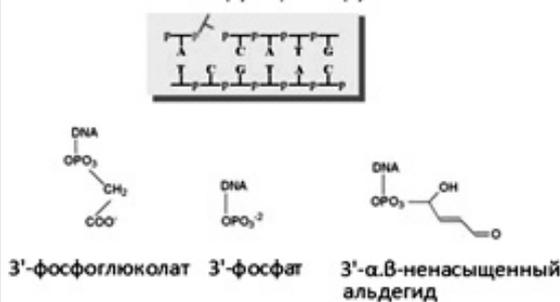
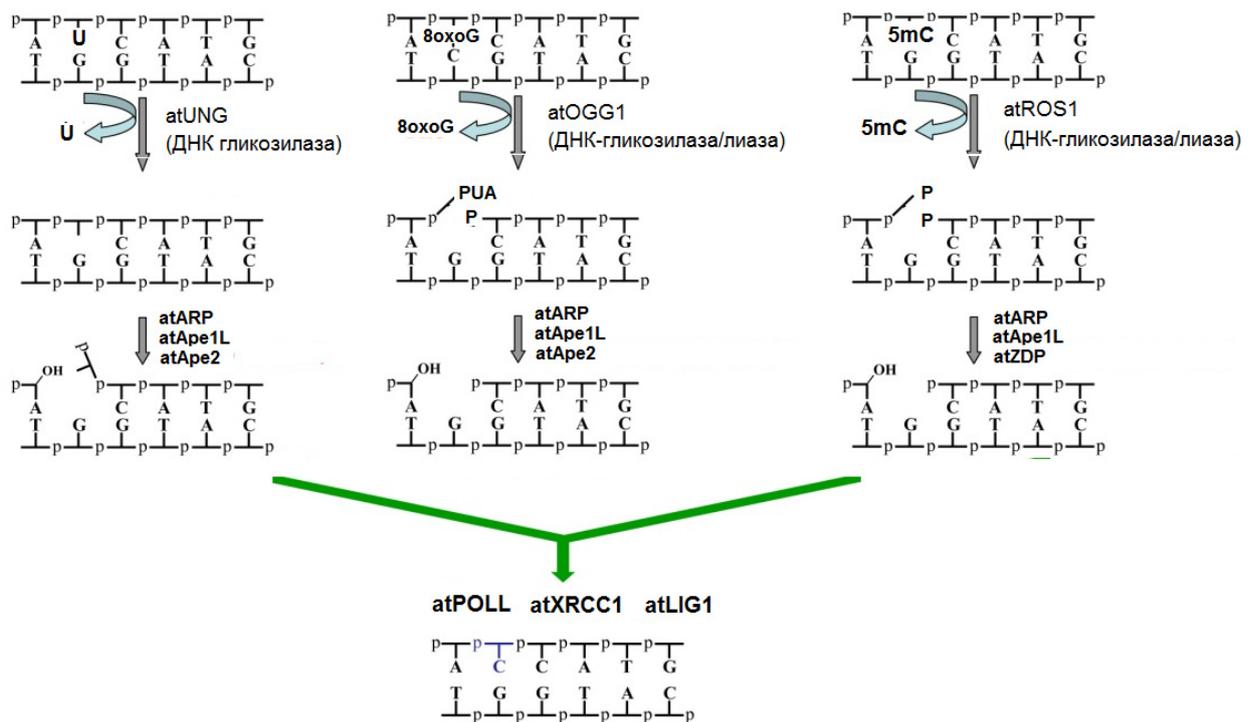


Рисунок 1 – АФК индуцируемые модификации основания ДНК



Обозначения: PUA- 3' фосфо- α,β -ненасыщенный альдегид; P-остаток фосфорной кислоты

Рисунок 2 – BER механизмы репарации ДНК

Несколько ДНК-гликозилаз специфичных окисленным основаниям ДНК выявлены у про- и эукариот. Показано, что большинство из этих ферментов относятся бифункциональным ДНК-гликозилазам/лиазам и удаляют структурно близкие повреждения. Несмотря на то, что эти ферменты обладают более или менее широкой субстратной специфичностью, в общем, в клетке окислительно – поврежденные основания распознаются пиримидин или пурин-специфичными ферментами. В *Escherichia coli* специфичной к окисленным пиримидинам ДНК гликозилазой является – фермент Nth (эндонуклеаза III) [25]. Nth проявляет активность по отношению ко многим поврежденным пиримидиновым основаниям в составе ДНК. Структурный и функциональный гомолог Nth выявлен в растениях арабидопсис и обозначена как atNth1 (таблица 1) [26]. atNth1 проявляет ДНК-гликозилазную активность на различных ДНК субстратах с поврежденными пиримидинами, а также способна удалять мочевины и тиминогликолы из двухцепочечной ДНК. Кроме этого, фермент также обладает апурином/апириимидин

лиазной активностью на УФ- и гамма – облученных субстратах ДНК. У большинства ДНК-гликозилаз в их структуре содержатся определенные ДНК связывающие мотивы, что позволяет их отнести к одному из трех суперсемейств. Последовательность atNth1 содержит все характерные для белков этого суперсемейства (Nth) мотив «спираль-шпилька-спираль»(HhH), а также железосерный кластер типа Fe4S4, который удерживается четырьмя консервативными остатками Cys. Присутствие консервативного остатка Lys в 240 положении в atNth1 обеспечивает правильную AP-лиазную активность фермента [26]. Этот критический важный остаток Lys сохраняется во всех функционально охарактеризованных гомологах Nth и отсутствует в структуре других ДНК-гликозилаз со сходной последовательностью, но без AP-лиазной активностью [27]. Геном арабидопсиса кодирует также второго предполагаемого гомолога Nth (AtNTH2), как у *Saccharomyces cerevisiae* (таблица 1)[28]. Детальный филогенетический анализ белков суперсемейства HhH позволило сгруппировать эти два гомолога из каждого вида (*Arabidopsis thaliana* и *S. cerevi-*

siae) вместе, что указывает на то, что они являются паралогичными генами, возникшими в результате дупликации генов после дивергенции растений и дрожжей [29]. У *S.cerevisiae*

показано, что два гомолога Nth локализованы в разных структурных образованиях клетки, т.е. в ядре и митохондрии. Однако данных о субклеточной локализации atNth1 и atNth2 отсутствует.

Таблица 1 – Белки, участвующие в репарации окислительно поврежденных оснований и одноцепочечных разрывов ДНК [4]

	<i>E. coli</i>	<i>S.cerevisiae</i>	<i>H. sapiens</i>	<i>A. thaliana</i>
Распознавание повреждений и разрывов цепи ДНК				
Эксцизия окисленных пиримидинов	Nth	Ntg1p, Ntg2p	NTH1	AtNTH1, AtNTH2
Эксцизия окисленных пуринов	MutM	-	-	AtMMH
	-	Ogg1p	OGG1	AtOGG1
Эксцизия окисленных пуринов и пиримидинов	Nei	-	NEIL1, NEIL2, NEIL3	-
Эксцизия аденина в паре с 8-охоG	MutY	-	MYH	AtMUTY
Эксцизия этено-А и этено-С	MUG	-	TDG	-
Заполнение брешей на цепи ДНК				
Удаление 3'-dRP после β – элиминации	Xth	Apn2p	APEX1, APEX2	AtArp, AtAPE1, AtAPE2
Удаление 3'-фосфатной группы после β, δ -элиминации	-	Tpp1p	PNKP	AtZDP
Связывание с одноцепочечными разрывами	-	-	PARP-1, PARP-2	AtPARP1, AtPARP2, AtPARP3
Структурные и каркасные белки	-	-	XRCC1	AtXRCC1
Синтез ДНК и лигирование				
ДНК полимеразы семейства А	PolI	-	-	-
	-	-	POLB	-
ДНК полимеразы семейства X	-	Pol4p	POLL	AtPOLL
NAD+ – зависимая ДНК-лигаза	LigA	-	-	-
АТФ-зависимая ДНК-лигаза	-	Cdc9p	LIG1	AtLIG1

В *E. coli* имеется вторая группа ДНК-гликозилаз репарирующие окисленные пиримидины, так называемая Nei (Эндонуклеаза VIII) [30]. ДНК-гликозилазы суперсемейства эндонуклеазы VIII (formamidopyrimidine_DNA glycosylase/endonuclease eight (Fpg/Nei)) выделяются на основе характерной структуры, включающей в себя N-концевой и C-концевой домены, связанные гибким линкером. Основу N-концевого домена составляет двухслойный β-сэндвич, состоящий из восьми антипараллельных складок. C-концевой домен содержит характерный для всего суперсемейства ДНК-связывающий мотив спираль–два поворота–спираль, а также во многих случаях –

цинковый палец типа Cys4, состоящий из двух антипараллельных β-складок [30]. Хотя в геноме человека содержится три гена Nei ДНК-гликозилазы [30], в геноме растений гомологов Nei ДНК-гликозилазы не обнаружено. Эволюционная история ДНК-гликозилаз суперсемейства Nei сопровождалась неоднократными случаями исчезновения кодирующих их генов из определенных ветвей. Это может быть связано с тем, что известные функции белков Nei фактически дублируются другими ДНК-гликозилазами – членами структурного суперсемейства Nth.

Фермент MutM в *E. coli* является архетипичной ДНК-гликозилазой для репарации ок-

сидативно поврежденных пуринов в составе ДНК. Так как фермент способен удалять метилированный аналог Fary-Gua (mFary-Gua), фермент впоследствии получил название формамидопиримидин-ДНК-гликозилаза (Fpg). После того, как было показано, что ДНК-гликозилаза, специфичная к основаниям 8-охоG, идентична Fpg, фермент получил еще одно название – 8-оксогуанин-ДНК-гликозилаза. Следовательно, этот фермент представляет собой ДНК-гликозилазу/лиазу, что вырезает 8-охоG из ДНК через механизм δ, β -элиминации, оставляя на месте поврежденного звена однонуклеозидную брешь, обрамленную фосфатными группами. Следует отметить, что Fpg удаляет из ДНК не только окисленные остатки пуринов (8-охоG, FaryG, FaryA), но и некоторые окисленные пиримидины, например, дигидроуридин. Fpg выщепляет охоG из пар с цитозином, которые образуются при окислении гуанина в составе двуцепочечной ДНК, и обладает низкой активностью по отношению к субстратам, содержащим охоG напротив аденина, что позволяет избежать неправильной репарации пары 8-охоG:А к Т:А. Пара 8-охоG:А распознается гликозилазой MutY *E. coli* (гомолог эндонуклеазы III, выщепляющей из ДНК тиминовые гликоли, цитозиновые гидраты и другие повреждения). Эта гликозилаза обладает лиазной активностью, удаляет А из ДНК и вносит разрыв в сахарофосфатный остов. Гены сходные с MutY выявлены и охарактеризованы у некоторых эукариот, включая архей [31].

Клетки эукариотических организмов, включая дрожжей и человека содержат структурные или функциональные гомологи этих бактериальных ферментов. Удаление остатков 8-оксогуанина из ДНК эукариот осуществляет 8-оксогуанин-ДНК-гликозилаза (OGG1). Хотя последовательность OGG1 не идентична к бактериальному MutM белку, впервые OGG1 обнаружено у *S. cerevisiae* [32], позже у млекопитающих [33].

Фермент OGG1 является бифункциональной ДНК-гликозилазой/ β -лиазой, он способен расщеплять N-гликозидную связь поврежденного основания с образованием свободного 8-охоG, а затем катализировать разрыв 3'-фосфодиэфирной связи, т.е. удаляет 8-охоG по механизму β -но не δ, β -элиминации. Интересно, ядерный геном растений кодирует функциональные гомологи обоих, MutM и OGG1 ферментов [34–36] (Таблица 1).

В клетках растений арабидосис с гена гомолога mutM (AtMMH) в результате альтернатив-

ного сплайсинга образуется два транскрипта и высокомолекулярный вариант фермента (AtMMH-1) проявляет активность к 8-охоG в паре с цитозином, гуанином и тиминном, но не с аденином [34]. В настоящее время данные относительно ферментативной роли и субстратной специфичности другой формы AtMMH отсутствуют. Два гена кодирующие гомолога бактериального MutM белка обнаружена у однодольных растений [37].

Гомолог OGG1 (AtOGG1) является бифункциональной ДНК-гликозилазой/лиазой, который также удаляет 8-охоG по механизму β -элиминации из ДНК-дуплекса содержащей пару 8-охоG:С [36]. Инактивация ДНК-гликозилаз в одноклеточных организмах приводит к снижению жизнеспособности из-за повышенного уровня мутагенеза за счет увеличения эндогенно образуемых 8-охоG. Показано, что экспрессия AtOGG1 в мутантных по генам mutM и mutY штаммах *E. coli* полностью подавляет дефект в репарации 8-охоG [35,36]. Субстратная специфичность и кинетические параметры AtOGG1 детально исследованы [37]. AtOGG1 эффективно выщепляет охоG и Fary-Gua в составе двуцепочечной ДНК содержащей множественные повреждения вызванные под действием ионизирующего излучения [38]. AtOGG1 преимущественно удаляет охоG из пар с цитозином, и обладает низкой активностью по отношению к паре охоG:А. Показано, что растения с двойным нокаутными мутациями по генам AtMMH и AtOGG1 (с Т-ДНК вставками) не имеют какие-либо отклонения в фенотипе, хотя генерация 8-охоG в их ДНК не была исследована [39]. Гены atOGG1 и AtMMH активно экспрессируются в различных тканях растений, что указывает важность этих ферментов в росте и развитии растений [40]. Так как среди представителей эукариот ортологичные гены к прокариотическим MutM имеются только у растений, высказано предположение о том что, в процессе эволюции этот ген, возможно, *перенесен* из древнего *хлоропласта* в ядро [41, 42]. Если дело обстоит именно так, возможно, роли AtOGG1 и AtMMH могут быть связаны с их различным филогенетическим происхождением, с ядерной функцией для AtOGG1 и AtMMH для репарации хлоропластной ДНК. Однако, внутриклеточное локализация этих ферментов до сих пор неизвестны. Геном арабидопсиса кодирует предполагаемый ортолог MutY ДНК-гликозилазы *E. coli*, который, возможно, удаляет аденин из пары 8-охоG:А, однако, данный фермент до сих

пор функционально не охарактеризован. Известно, что в бактериях и млекопитающих BER механизм репарации удаляет не только окисленные основания, но и экзоциклические аддукты, такие как этено-А и этено-С, которые генерируются под действием промежуточных продуктов свободно-радикального окисления липидов (кротональдегид и акролеин). Такого характера повреждения оснований репарируются с помощью мисматч-специфичной урацил ДНК-гликозилазой *E. coli* (MUG) и в клетках человека тимин ДНК-гликозилазой (TDG) [43]. Так как в растениях гомологичные гены к этим ДНК-гликозилазам не идентифицированы, остается открытым вопрос о том, как происходит репарация экзоциклических аддуктов генерируемых эндогенными продуктами перекисного окисления липидов. Необходимо отметить, что перекисное окисление липидов было предложено в качестве одного из основных факторов ухудшения всхожести семян [44]. Показано, строгая корреляция между утратой жизнеспособности семян и накоплением промежуточного продукта перекисного окисления липидов -малондиальдегида [45].

У млекопитающих, пост-репликативное метилирование цитозина по 5 атому углерода (5mC) в ДНК обеспечивает молекулярную основу эпигенетической регуляции экспрессии генов. Метилирование ДНК имеет важное значение для развития организма, дифференцировки клеток, геномном импринтинге и в репрессии мобильных элементов генома. Около 60–70 % всех CpG-динуклеотидов у млекопитающих метилированы. Неметилированные CpG-динуклеотиды сгруппированы в т. н. «CpG-островки», которые присутствуют в 5' регуляторных областях многих генов [46]. Недостатком этого способа регуляции экспрессии генов является то, что спонтанное дезаминирование 5mC генерирует тимин, что приводит к образованию неправильной G:T пары, которые, если не репарировать приводит мутациям в виде C→T транзиции в CpG динуклеотидах.

В клетках млекопитающих TDG и Метил-CpG-специфическая эндонуклеаза (MBD4/MED1) предотвращают мутагенное воздействие дезаминирования 5mC вырезанием тимина из G:T пары в CpG-контексте, который затем заменяется на цитозин по BER механизму репарации [44, 45]. Белок MBD4 млекопитающих был идентифицирован в ходе поиска полипептидов, содержащих метилсвязывающий домен (methyl-binding domain, MBD) и способных связывать

ДНК с большим количеством последовательностей 5-mCG. MBD4 белок связывается с CG-метилированной ДНК за счет MBD-домена в N-концевой части. C-конец белка содержит отдельный домен, обладающий каталитической активностью по отношению к Т или U напротив G и наиболее специфичный к этим гетеродуплексам в составе 5-mCG-последовательностей.

Как отмечалось выше гомолога TDG ДНК-гликозилазы не обнаружено в растениях. Однако, предполагаемый гомолог гена MBD4 обнаружен в *Arabidopsis thaliana* и обозначена как MBD4L (похожий на MBD4 белок). В белке MBD4L отсутствует метилсвязывающий домен, но он имеет консервативный ДНК-гликозилазный домен с критическими аминокислотными остатками для распознавания субстрата и катализа реакции. Белок MBD4L вырезает урацил (или тимин), расположенный напротив G, однако, проявляет низкую активность по отношению к производным цитозина, таким как 5-метилцитозин и 5-гидроксиметилцитозин. У растений 5-метилцитозин можно обнаружить в динуклеотидах CG и тринуклеотидах CNG (T-C, A или T). Профиль метилирования, сильно влияющий на функциональное состояние гена, стабильно передается в ряду клеточных поколений. С этой точки зрения, для организмов с большой продолжительностью жизни и интенсивной тканевой регенерацией (позвоночные, растения) надежная система эпигенетической наследственности (типа метилирования ДНК) жизненно необходима [46]. Следовательно, можно предположить, что MBD4L играет важную роль в предотвращении мутагенного воздействия дезаминирования 5mC и в регуляции экспрессии генов в растениях [47].

Как отмечалось выше, растительный геном подвергается значительному изменению в характере метилирования цитозина во время развития и в ответ на факторы окружающей среды. У *A. thaliana* ферменты семейства 5mC-ДНК гликозилаз, ROS1, DME, DML2, DML3 участвуют в регуляции импринтинга и сайленсинга генов [48]. Эти ферменты являются бифункциональными ДНК гликозилазами, поэтому помимо ДНК-гликозилазной активности, они обладают AP-лиазной активностью. Эти ферменты за счет ДНК-гликозилазной активности вырезают метилированный цитозин (5mC), затем образованный в результате AP-сайт расщепляют с помощью реакции элиминации межнуклеозидных фосфатов при реакциях β-элиминации и/или β/δ-элиминации. Конечным продуктом действия

5mC-ДНК гликозилаз являются разрывы ДНК с 5'-концевым фосфатом и 3'-концевым фосфо- α,β -ненасыщенным альдегидом (3'-РА), или образуется однонуклеотидный разрыв ДНК с 5'-концевым фосфатом и 3'-концевым фосфатом (3'-Р). Таким образом, активное деметилирование генома иницированное 5mC-ДНК гликозилазами в растениях приводит к образованию высоко генотоксичных разрывов цепей ДНК, содержащие нелигируемые 3'-блокирующие группы. Эти 3'-блокирующие группы репарируются BER механизмом, предполагая, что функционально такая репарация нужна не только для удаления повреждения в ДНК, но также для регуляции развития растений и экспрессии генов.

Последующие реакции BER механизма репарации ДНК

В механизме репарации BER требуется четыре или пять ферментов которые участвуют в основных стадиях реакции по восстановлению поврежденных оснований. Они включают в себя ДНК гликозилазы, АП эндонуклеазы, ДНК полимеразы и ДНК лигазы [2]. Специализированные ДНК-гликозилазы опознают и удаляют поврежденные или модифицированные азотистые основания ДНК с образованием AP-сайта (рисунок 2). AP-сайт генерируется в результате расщепления N-гликозидной связи между сахарофосфатным остовом и поврежденным основанием и в результате удаления модифицированного азотистого основания.

AP-эндонуклеаза 1 (APE1/НАР1/Ref-1) является одним из ключевых ферментов репарации ДНК в клетках человека [49]. В процессе BER, APE1 специфически связывает апуриновые/апиридиновые сайты, образующиеся в ДНК после удаления окисленного основания ДНК-гликозилазой, и гидролизует 5'-фосфодиэфирную связь AP-сайта с образованием 3'-гидроксильной и 5'-фосфата. После этого ДНК-полимераза удаляет 5'-дезоксирибозофосфат (dRp) и застраивает образовавшуюся брешь, а ДНК-лигаза лигирует концы разрыва, восстанавливая интактную последовательность ДНК.

AtNTH1 и AtOGG1 являются бифункциональной ДНК-гликозилазой/лиазой, поэтому помимо ДНК-гликозилазной активности, они обладают AP-лиазной активностью. Следовательно, эти ферменты расщепляют AP-сайт с помощью реакции элиминации межнуклеозидных фосфатов при реакциях β -элиминации.

В результате генерируются разрывы ДНК с 5'-концевым фосфатом и 3'-концевым фосфо- α,β -ненасыщенным альдегидом (3'-РА). Эти 3'-концевые блокирующие группы должны быть удалены на последующих этапах перед началом репаративного синтеза ДНК (рисунок 2). Этот процесс катализируется AP-эндонуклеазой, который также удаляет AP-сайты образуемые после удаления модифицированных оснований под действием монофункциональных ДНК-гликозилаз и генерируемых путем спонтанной апуринизации гетероциклических оснований [49]. При этом эти AP-эндонуклеазы разрезают фосфодиэфирную связь на 5'-конце поврежденного дезоксирибонуклеотида с образованием на 3'-конце разрыва гидроксильной группы, на 5'-конце – фосфатной. Образование 3'-гидроксильной группы делает возможным дальнейший репарационный синтез ДНК.

Геном широко используемого модельного организма *A. thaliana* кодирует три предполагаемых гомологов главной человеческой AP-эндонуклеазы 1 (APE1): *Arp*, *Ape1L* и *Ape2*. Ген AP-эндонуклеазы (ARP) растений арабидопсиса частично охарактеризована, и показана редокс функция этого фермента на транскрипционных факторах человека [50].

Генетические исследования показали, что *A. thaliana* дефицитные по одному из *Arp*, *Ape1L* и *Ape2* генов не приводит к появлению заметных аномальных фенотипических признаков по сравнению с диким типом [51]. Однако двойные нокаутные мутации по генам *Ape1L* и *Ape2* летальны, тогда как мутанты по *Arp* в комбинации с любым из *Ape1L* и *Ape2* не летальны [51]. Эти данные позволяют предположить, что *Ape1L* и *Ape2* востребованы для репарации эндогенных повреждений ДНК, которые происходят во время развития семян и/или для процессинга 3'-концевых блокирующих групп во время активного деметилирования ДНК иницированного различными 5mC-ДНК гликозилазами растений.

На данный момент не имеется никакой детальной информации о биохимических свойствах и ДНК субстратной специфичности растительных белков *Arp* и *Ape2*, так и о присутствии 3'-фосфатазной и 3'-фосфодиэстеразной активностей этих двух растительных AP-эндонуклеаз. Недавно мы впервые клонировали и охарактеризовали кДНК пшеницы, кодирующего гомолога AP-эндонуклеазы семейства ExoIII, которые включают Xth *E. coli*, человеческий APE1 и AtApe1L *A. thaliana* [52]. Мы очистили AP-эн-

донуклеазу пшеницы до гомогенного состояния, условно обозначив ее как TaApe1L, и дали характеристику ДНК субстратной специфичности при различных повреждениях ДНК. Показано что TaApe1L обладает АП эндонуклеазной, 3'-фосфодиэстеразной, 3'-фосфатазной и 3'→5' экзонуклеазной активностями. Изучение кинетических параметров ферментативных реакций показало, что TaApe1L удаляет 3'-блокирующий сахарофосфат и 3'-фосфатные группы с очень большой эффективностью ($k_{cat}/K_M = 630$ и $485 \mu M^{-1} \cdot min^{-1}$, соответственно), но сравнительно с человеческим гомологом, этот фермент обладал очень низкой AP-эндонуклеазной активностью.

В противоположность к AtNTN1 и AtOGG1, бифункциональная ДНК-гликозилаза AtMMH катализирует разрезание AP-сайта через механизм δ, β -элиминации, оставляя на месте поврежденного звена однонуклеозидную брешь с 3'-фосфатной группой. В клетках млекопитающих 3'-фосфатная группа превращается в 3'-ОН с помощью фермента полинуклеотид киназа (PNKP) [53]. Фермент PNKP также удаляет 3'-фосфатную группу с одноцепочечных разрывов инициируемых под действием ионизирующего излучения [54]. Впервые фермент (ZDP) с фосфатазной активностью к 3'-фосфатной группе одноцепочечных разрывов был выявлен и очищен у кукурузы [55]. Гомолог данного фермента у арабидопсис (AtZDP) также проявляет 3'-фосфатазную активность, который связывается с одноцепочечным разрывом ДНК через N-концевой домен, содержащий цинковый палец типа Cys3-His [56].

Как отмечалось выше у *A. thaliana* ферменты семейства 5mC-ДНК гликозилаз, ROS1, DME, DML2, DML3 участвуют в регуляции импринтинга и сайленсинга генов [48]. ROS1 является бифункциональной ДНК-гликозилазой, при вырезании 5mC из состава ДНК, оставляет разрыв ДНК с 3'-концевым фосфо- α, β -ненасыщенным альдегидом (3'-РА) или образуется однонуклеотидный разрыв ДНК с 5'-концевым фосфатом и 3'-концевым фосфатом (3'-Р). Показано, что фосфатаза AtZDP удаляет 3'-концевую фосфатную группу образованного под действием ROS1, обеспечивая, таким образом, возможным дальнейший репарационный синтез ДНК [57]. Однако, недавно показано, что AP-эндонуклеаза Ape1L также способна превращает генерированные под действием фермента ROS1 3'-РА и 3'-Р блокирующие группы в лигируемые 3'-ОН концы [58]. Таким образом, AtApe1L является новым компонентом механизма актив-

ного деметилирования ДНК и, вместе с AtZDP, регулирует импринтинга и сайленсинга генов в *A. thaliana*.

Для завершения BER механизма репарации ДНК требуются дополнительные ферменты и вспомогательные белки (рисунок 2). Как отмечалось выше, AP-эндонуклеаза гидролизует фосфодиэфирную связь с 5'-стороны от AP-сайта, в результате чего в последовательности ДНК возникает разрыв с гидроксильной группой на 3'-конце и фосфатом на 5'-конце. В клетках млекопитающих, ДНК-полимераза β (Pol β) заполняет однонуклеотидную брешь, подготавливая цепь для лигирования ДНК-лигазой I, или комплексом ДНК-лигазы III и XRCC1 белка.

Pol β , относящаяся к X-семейству, – важнейший участник экцизионной репарации оснований, она обладает дезоксирибофосфатлиазной активностью, способна корректно восстанавливать структуру ДНК после удаления «неправильных» оснований с помощью ДНК-гликозилаз и осуществляет синтез ДНК в участках, содержащих бреши. У растений арабидопсис отсутствует какой-либо гомолог Pol β , предполагается функцию Pol β в растениях выполняет другая ДНК полимеразы – Pol λ , также принадлежащая к X-семейству [59].

Pol λ (AtPOLL) содержит все критические аминокислотные остатки консервативные в Pol β и других ДНК полимераз принадлежащих к X-семейству [59]. Показано, что экспрессия AtPOLL связана с клеточной пролиферацией меристемы и мейоза ткани [60].

С другой стороны, экцизионная репарация окислительного повреждения геномной ДНК пластид и митохондрии может потребовать участия других ДНК-полимераз. Две ДНК-полимеразы, сходные с ДНК-полимеразой I цианобактерий были идентифицированы в арабидопсис [61]. Оба локализованы в пластидах и экспрессия одного из них (AtPolII типа B) индуцируется H_2O_2 , что указывает на возможную роль данного фермента в репарации окислительных повреждений ДНК [61]. Детальное исследование биохимических характеристик ДНК полимеразы риса (OsPOLP1) позволяет предположить об его участии в репликации и экцизионной репарации геномной ДНК пластид [62].

У млекопитающих белок XRCC (X-ray-induced damage repair cross complementing) взаимодействует с лигазой III и ДНК-полимеразой β , при этом N-концевой участок этого белка взаимодействует с ДНК-полимеразой β ,

а С-концевой участок – с ДНК-лигазой III. Лигирующий комплекс лигаза III/белок XRCC1 может служить как мост для координации последующих стадии репарации ДНК [63]. Геном арабидопсиса кодирует ортолог гена XRCC1 млекопитающих [64], однако его функция в BER механизме репарации ДНК растений не известно. Геном арабидопсиса кодирует четыре гена ДНК-лигазы: AtLIG1, AtLIG1a, AtLIG4 и AtLIG6. Фермент AtLIG1 функционирует в ходе репликации и BER механизме репарации. Фермент AtLIG4 является ортологом гена

ДНК-лигазы IV млекопитающих и обеспечивает *соединение* двух различных *негомологичных концов* в репарации *повреждения ДНК* [65]. Интересно отметить, что изоформы фермента AtLIG1 образуемые из альтернативных сайтов *инициации трансляции направляется* в разные компартменты клетки – ядро и митохондрии.

Благодарности

Работа поддержана грантом ГФ4/4342 МОН РК

Литература

- 1 Dizdaroglu M, Jaruga P, Birincioglu M, Rodriguez H (2002) Free radical-induced damage to DNA: mechanisms and measurement, *Free Radic Biol Med*, 32:1102-1115.
- 2 Hegde ML, Hazra TK, Mitra S (2008) Early steps in the DNA base excision/single-strand interruption repair pathway in mammalian cells, *Cell Research*, 18:27-47.
- 3 Hoeijmakers JH (2009) DNA damage, aging, and cancer, *N Engl J Med*, 361:1475-1485.
- 4 Roldarn-Arjona T, Ariza RR (2009) Repair and tolerance of oxidative DNA damage in plants, *Mutation Research*, 681:169-179.
- 5 Foyer CH, Noctor G. (2003) Redox sensing and signalling associated with reactive oxygen in chloroplasts, peroxisomes and mitochondria, *Physiol Plant*, 119:355-364.
- 6 Bissenbaev AK, Ishchenko AA, Taipakova SM, Saparbaev MK (2011) Presence of base excision repair enzymes in the wheat aleurone and their activation in cells undergoing programmed cell death, *Plant Physiol Biochem*, 49:1155-1164.
- 7 Bissenbaev AK, Altybaeva NA, Kolbaeva GA (2007) Role of reactive oxygen species and antioxidant enzymes in hormone regulating programmed cell death of wheat aleurone layer, *Journal of Cell and Molecular Biology*, 6(1): 41-48.
- 8 Apel K, Hirt H (2004) Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction, *Annu Rev Plant Biol*, 55:373-399.
- 9 Mehlhorn H, Tabner BJ, Wellburn AR (1990) Electron-spin-resonance evidence for the formation of free-radicals in plants exposed to ozone, *Physiol Plant*, 79: 377-383.
- 10 Landry LG, Chapple CC, Last RL (1995) Arabidopsis mutants lacking phenolic sunscreens exhibit enhanced ultraviolet-B injury and oxidative damage, *Plant Physiol*, 109:1159-1166.
- 11 Ward JF (1988) DNA damage produced by ionizing radiation in mammalian cells: identities, mechanisms of formation, and reparability, *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol*, 35: 95-125.
- 12 Hutchinson F (1957) The distance that a radical formed by ionizing radiation can diffuse in a yeast cell, *Radiat Res*, 7: 473-483.
- 13 Conklin PL, Williams EH, Last RL (1996) Environmental stress sensitivity of an ascorbic acid-deficient Arabidopsis mutant, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93: 9970-9974.
- 14 Dizdaroglu M (1993) Chemistry of free radical damage to DNA and nucleoproteins, in: B Halliwell, OI Aruoma (Eds.). *DNA and Free Radicals*. Ellis Horwood, London. – P.19
- 15 Furlong EA, Jorgenson TJ, Henner WD (1986) Production of dihydrothymine stereoisomers in DNA by gamma-radiation, *Biochemistry*, 25: 4344-4349.
- 16 Teoule R (1987) Radiation-induced DNA damage and its repair, *Int J Radiat Biol*, 51: 589.
- 17 Dizdaroglu M (1985) Formation of an 8-hydroxyguanine moiety in deoxyribonucleic acid on gamma-irradiation in aqueous solution, *Biochemistry*, 24: 4476- 4481.
- 18 Fuciarelli AF, Wegher BJ, Blakely WF, Dizdaroglu M (1990) Yields of radiation-induced base products in DNA: effects of DNA conformation and gassing conditions, *Int J Radiat Biol*, 58: 397-415.
- 19 Fink SP, Reddy GR, Marnett LJ (1997) Mutagenicity in Escherichia coli of the major DNA adduct derived from the endogenous mutagen malondialdehyde, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94: 8652-8657.
- 20 Saparbaev M, Laval J (1998) 3,N4-ethenocytosine, a highly mutagenic adduct, is a primary substrate for Escherichia coli double-stranded uracil-DNA glycosylase and human mismatch-specific thymine-DNA glycosylase, *Proc Natl Acad Sci U.S.A.*, 95: 8508-8513.
- 21 Ide H, Kow YW, Wallace SS (1985) Thymine glycols and urea residues in M13 DNA constitute replicative blocks in vitro, *Nucleic Acids Res*, 13: 8032-8052.
- 22 Evans J, Maccabee M, Hatahet Z, Courcelle J, Bockrath R, Ide H, Wallace S (1993) Thymine ring saturation and fragmentation products: lesion bypass, misinsertion and implications for mutagenesis, *Mutat Res*, 299: 147-156.

- 23 Boorstein RJ, Hilbert TP, Cadet J, Cunningham RP, Teebor GW (1989) UV-induced pyrimidine hydrates in DNA are repaired by bacterial and mammalian DNA glycosylase activities, *Biochemistry*, 28: 6164-6170.
- 24 Roldan-Arjona T, Garcia-Ortiz MV, Ruiz-Rubio M, Ariza RR (2000) cDNA cloning, expression and functional characterization of an *Arabidopsis thaliana* homologue of the *Escherichia coli* DNA repair enzyme endonuclease III, *Plant Mol Biol*, 44: 43-52.
- 25 Krokan HE, Standal R, Slupphaug G (1997) DNA glycosylases in the base excision repair of DNA, *Biochem J*, 325: 1-16.
- 26 Girard PM, Boiteux S (1997) Repair of oxidized DNA bases in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, *Biochimie*, 79:559-566.
- 27 Denver DR, Swenson SL, Lynch M (2003) An evolutionary analysis of the helix-hairpin-helix superfamily of DNA repair glycosylases, *Mol Biol Evol*, 20: 1603-1611.
- 28 Alseth I, Eide L, Pirovano M, Rognes T, Seeberg E, Bjoras M (1999) The *Saccharomyces cerevisiae* homologues of endonuclease III from *Escherichia coli*, Ntg1 and Ntg2, are both required for efficient repair of spontaneous and induced oxidative DNA damage in yeast, *Mol Cell Biol*, 19: 3779-3787.
- 29 Jiang D, Hatahet Z, Blaisdell JO, Melamede RJ, Wallace SS (1997) *Escherichia coli* endonuclease VIII: cloning, sequencing, and overexpression of the nei structural gene and characterization of nei and nei nth mutants, *J Bacteriol*, 179: 3773-3782.
- 30 Grin IR, Zharkov DO (2011) Eukaryotic homologs of endonuclease VIII: new elements of excision repair of DNA base [Biohimya]. 76(1):99 – 114.
- 31 Tchou J, Kasai H, Shibutani S, Chung MH, Laval J, Grollman AP, Nishimura S (1991) 8-Oxoguanine (8-hydroxyguanine) DNA glycosylase and its substrate specificity, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 88:4690-4694.
- 32 Eisen JA, Hanawalt PC (1999) A phylogenomic study of DNA repair genes, proteins, and processes, *Mutat Res*, 435:171-213.
- 33 van der Kemp PA, Thomas D, Barbey R, de Oliveira R, Boiteux S (1996) Cloning and expression in *Escherichia coli* of the OGG1 gene of *Saccharomyces cerevisiae*, which codes for a DNA glycosylase that excises 7,8-dihydro-8-oxoguanine and 2,6-diamino-4-hydroxy-5-N-methylformamidopyrimidine, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93: 5197-5202.
- 34 Roldan-Arjona T, Wei YF, Carter KC, Klungland A, Anselmino C, Wang RP, Augustus M, Lindahl T (1997) Molecular cloning and functional expression of a human cDNA encoding the antimutator enzyme 8-hydroxyguanine-DNA glycosylase, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94:8016-8020.
- 35 Ohtsubo T, Matsuda O, Iba K, Terashima I, Sekiguchi M, Nakabeppu Y (1998) Molecular cloning of AtMMH, an *Arabidopsis thaliana* ortholog of the *Escherichia coli* mutM gene, and analysis of functional domains of its product, *Mol Gen Genet*, 259:577-590.
- 36 Dany AL, Tissier A (2001) A functional OGG1 homologue from *Arabidopsis thaliana*, *Mol Genet Genom*, 265: 293-301.
- 37 Garcia-Ortiz MV, Ariza RR, Roldan-Arjona T (2001) An OGG1 orthologue encoding a functional 8-oxoguanine DNA glycosylase/lyase in *Arabidopsis thaliana*, *Plant Mol Biol*, 47: 795-804.
- 38 Scortecci KC, Lima AF, Carvalho FM, Silva UB, Agnez-Lima LF, Batistuzzo de Medeiros SR (2007) A characterization of a MutM/Fpg ortholog in sugarcane—a monocot plant, *Biochem Biophys Res Commun*, 361: 1054-1060.
- 39 Morales-Ruiz T, Birincioglu M, Jaruga P, Rodriguez H, Roldan-Arjona T, Dizdaroglu M (2003) *Arabidopsis thaliana* Ogg1 protein excises 8-hydroxyguanine and 2,6-diamino-4-hydroxy-5-formamidopyrimidine from oxidatively damaged DNA containing multiple lesions, *Biochemistry*, 42: 3089-3095.
- 40 Murphy TM (2005) What is base excision repair good for? knockout mutants for FPG and OGG glycosylase genes in *Arabidopsis*, *Physiol Plant*, 123: 227-232.
- 41 Leprince O, Atherton NM, Deltour R, Hendry G (1994) The involvement of respiration in free radical processes during loss of desiccation tolerance in germinating *Zea mays* L, *Plant Physiol*, 104: 1333-1339.
- 42 Reuzeau C, Cavalie G (1995) Activities of free-radical processing enzymes in dry sunflower seeds, *New Phytol*, 130: 59-66.
- 43 Bird AP (1980) DNA methylation and the frequency of CpG in animal DNA, *Nucleic Acids Res*, 8: 1499-1504.
- 44 Hendrich B, Hardeland U, Ng HH, Jiricny J, Bird A (1999) The thymine glycosylase MBD4 can bind to the product of deamination at methylated CpG sites, *Nature*, 401: 301-304.
- 45 Petronzelli F, Riccio A, Markham GD, Seeholzer SH, Genuardi M, Karbowski M, Yeung AT, Matsumoto Y and Bellacosa A (2000) Investigation of the substrate spectrum of the human mismatch-specific DNA N-glycosylase MED1 (MBD4): fundamental role of the catalytic domain, *J Cell Physiol*, 185: 473-480.
- 46 Nota F, Cambiagno DA, Ribone P, Alvarez ME (2015) Expression and function of AtMBD4L, the single gene encoding the nuclear DNA glycosylase MBD4L in *Arabidopsis*, *Plant Sci*, 235:122-129.
- 47 He XJ, Chen T, Zhu JK (2011) Regulation and function of DNA methylation in plants and animals, *Cell Res*, 21: 442-465.
- 48 Zhu JK (2009) Active DNA demethylation mediated by DNA glycosylases, *Annu Rev Genet*, 43: 143-166.
- 49 Chou KM, Cheng YC (2002) An exonucleolytic activity of human apurinic/apyrimidinic endonuclease on 3' mispaired DNA, *Nature*, 415: 655-659.
- 50 Babiychuk E, Kushnir S, Van Montagu M, Inze D (1994) The *Arabidopsis thaliana* apurinic endonuclease Arp reduces human transcription factors Fos and Jun, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91:3299-3303.
- 51 Murphy TM, Belmonte M, Shu S, Britt AB, Hatteroth J (2009) Requirement for abasic endonuclease gene homologues in *Arabidopsis* seed development, *PLoS One*, 4: e4297.
- 52 Joldybayeva B, Prorok P, Grin IR, Zharkov DO, Ishenko AA, et al. (2014) Cloning and Characterization of a Wheat Homologue of Apurinic/Apyrimidinic Endonuclease Ape1L // *PLoS ONE*, 9(3): e92963, doi:10.1371/journal.pone.0092963.
- 53 Wiederhold L, Leppard JB, Kedar P, Karimi-Busheri F, Rasouli-Nia A, Weinfeld M, Tomkinson AE, Izumi T, Prasad R, Wilson SH, Mitra S, Hazra TK (2004) AP endonuclease-independent DNA base excision repair in human cells, *Mol Cell*, 15: 209-220.

- 54 Whitehouse CJ, Taylor RM, Thistlethwaite A, Zhang H, Karimi-Busheri F, Lasko DD, Weinfeld M, Caldecott KW (2001) XRCC1 stimulates human polynucleotide kinase activity at damaged DNA termini and accelerates DNA single-strand break repair, *Cell*, 104: 107-117.
- 55 Betti M, Petrucco S, Bolchi A, Dieci G, Ottonello S (2001) A plant 30-phosphoesterase involved in the repair of DNA strand breaks generated by oxidative damage, *J Biol Chem*, 276: 18038-18045.
- 56 Petrucco S, Volpi G, Bolchi A, Rivetti C, Ottonello S (2002) A nick-sensing DNA 30- repair enzyme from Arabidopsis, *J Biol Chem*, 277: 23675-23683.
- 57 Martinez-Macias MI, Qian W, Miki D, Pontes O, Liu Y, et al. (2012) A DNA 3' -phosphatase functions in active DNA demethylation in Arabidopsis, *Mol Cell*, 45: 357-370.
- 58 Garcia-Diaz M, Dominguez O, Lopez-Fernandez LA, de Lera LT, Saniger ML, Ruiz JF, Parraga M, Garcia-Ortiz MJ, Kirchhoff T, del Mazo J, Bernad A, Blanco L (2000) DNA polymerase lambda (Pol lambda), a novel eukaryotic DNA polymerase with a potential role in meiosis, *J Mol Biol*, 301: 851-867.
- 59 Uchiyama Y, Kimura S, Yamamoto T, Ishibashi T, Sakaguchi K (2004) Plant DNA polymerase lambda, a DNA repair enzyme that functions in plant meristematic and meiotic tissues, *Eur J Biochem*, 271: 2799-2807.
- 60 Mori Y, Kimura S, Saotome A, Kasai N, Sakaguchi N, Uchiyama Y, Ishibashi T, Yamamoto T, Chiku H, Sakaguchi K (2005) Plastid DNA polymerases from higher plants, Arabidopsis thaliana, *Biochem Biophys Res Commun*, 334: 43-50.
- 61 Takeuchi R, Kimura S, Saotome A, Sakaguchi K (2007) Biochemical properties of a plastidial DNA polymerase of rice, *Plant Mol Biol*, 64: 601-611.
- 62 Vidal AE, Boiteux S, Hickson ID, Radicella JP (2001) XRCC1 coordinates the initial and late stages of DNA abasic site repair through protein-protein interactions, *EMBO J*, 20: 6530-6539.
- 63 Taylor RM, Thistlethwaite A, Caldecott KW (2002) Central role for the XRCC1 BRCT I domain in mammalian DNA single-strand break repair, *Mol Cell Biol*, 22: 2556-2563.
- 64 Taylor RM, Hamer MJ, Rosamond J, Bray CM (1998) Molecular cloning and functional analysis of the Arabidopsis thaliana DNA ligase I homologue, *Plant J*, 14: 75-81.
- 65 Wu YQ, Hohn B, Ziemienowic A (2001) Characterization of an ATP-dependent type I DNA ligase from Arabidopsis thaliana, *Plant Mol Biol*, 46: 161-170.