

System BER w naprawie uszkodzeń oksydacyjnych u roślin

System BER in the repair of oxidative damage in plants

Sylwia Włodarczyk ✉



Krajowe Centrum Roślinnych Zasobów Genowych,
Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin – Państwowy Instytut Badawczy w Radzikowie, Radzików IHAR 1,
05–870 Błonie,
✉ s.wlodarczyk@ihar.edu.pl

Rośliny wytworzyły szereg mechanizmów odpowiadających za naprawę uszkodzeń oksydacyjnych wywołanych reaktywnymi formami tlenu. System naprawy poprzez wycinanie zasad wydaje się głównym systemem naprawczym prowadzącym do zniwelowania zmian wytworzonych przez reaktywne formy tlenu. Uważa się, że dwoma ważnymi enzymami odpowiadającymi za usuwanie 8-oksoguaniny są glikozylaza 8-oksoguaniny DNA i glikozylaza DNA formamidopirimidyny. Wielu badaczy zauważa zależność pomiędzy nagromadzeniem zmian oksydacyjnych w komórce, a aktywnością glikozylazy 8-oksoguaniny DNA i glikozylazy DNA formamidopirimidyny, oraz starzeniem się nasion. Potwierdzono, że poziom FPG oraz OGG1 wzrasta podczas imbibicji nasion. Niniejsza praca ma na celu przybliżenie działania systemu naprawczego BER w procesie napraw uszkodzeń oksydacyjnych oddziałujących na starzenie się nasion. Celem pracy jest przedstawienie obecnego stanu na temat działania systemu BER (ang Base Excision Repair) w naprawie uszkodzeń oksydacyjnych wpływających na starzenie się nasion.

Słowa klucze: system BER, starzenie nasion, ROS, uszkodzenia oksydacyjne, FPG, OGG1

Plants have developed a number of mechanisms that are responsible for repairing the oxidative damage caused by reactive oxygen species. The base excision repair system is the main repair system for removing such changes. Herein, 8-oxoguanine DNA glycosylase and formamidopyrimidine DNA glycosylase are the two enzymes of importance for removing 8-oxoG. Researchers have confirmed that FPG and OGG1 levels increase during seed imbibition. Indeed, many researchers note the relationship between the accumulation of oxidative changes in the cell and the activity of OGG1 and FPG and the aging of seeds. This short review aims at presenting the published data on the operation of the base excision repair system in the process of repairing oxidative damage affecting seed aging.

Key words: BER system, seed aging, ROS, oxidative damage, FPG, OGG1

Wstęp

Reaktywne formy tlenu (Reactive Oxygen Species – ROS) mogą być wytwarzane jako produkty uboczne metabolizmu komórki i uważane są za jedną z głównych przyczyn utraty żywotności nasion oraz pogorszenia się ich zdolności kiełkowania (El-Maarouf-Bouteau i wsp., 2011). W trakcie przechowywania nasion, utrata żywotności związana jest z nagromadzeniem się pęknięć nici DNA i aberracjami chromosomów, co potwierdza związek pomiędzy zmniejszonym kiełkowaniem podczas starzenia się nasion, a uszkodzeniami DNA (Waterworth i wsp., 2011). ROS indukuje wiele uszkodzeń DNA w tym powstawanie modyfikacji guaniny najczęściej 8-oksoguaniny (8-oksoG), której poziom znacznie wzrasta podczas starzenia się nasion. W naprawie tych uszkodzeń bierze udział system naprawczy BER (Base Excision Repair), w którym

pośredniczą dwa enzymy FPG (glikozylaza DNA formamidopirimidyny) oraz OGG1 (glikozylaza 8-oksoguaniny DNA) odpowiedzialne za rozpoznawanie oraz usuwanie zmian oksydacyjnych. Celem pracy jest przybliżenie działania systemu naprawczego BER w procesie napraw uszkodzeń oksydacyjnych oddziałujących na starzenie się nasion.

1. System naprawczy BER i jego rola w redukcji uszkodzeń oksydacyjnych

Jedną z głównych ścieżek naprawy DNA obecną we wszystkich organizmach jest naprawa poprzez wycinanie zasad. BER zapobiega mutagenym i cytotoksycznym skutkom uszkodzeń, które występują w zasadach azotowych DNA, a jego rola w utrzymaniu integralności genomu jest istotna (Drohat i Coey, 2016). Uszkodzenia oksydacyjne takie jak 8-oksoguanina (utleniona

forma guaniny) naprawiane są głównie poprzez system BER (Zharkov, 2008). Mechanizm naprawy BER jest inicjowany przez glikozylazy DNA (specyficzne dla danego uszkodzenia), które przecinają wiązanie N-glikozydowe między uszkodzoną zasadą, a deoksyrybozą tworząc w ten sposób miejsce apurynowe/apirymidynowe (AP). Następnie niezbędna do usunięcia miejsca AP jest endonukleaza AP, bądź liaza AP, powodująca rozkład do oligonukleotydów poprzez rozerwanie wiązań fosfodiesterowych wewnątrz łańcucha DNA (Zharkov, 2008). W kolejnym etapie ścieżka naprawy może przebiegać w dwojaki sposób za pomocą mechanizmu „krótkiej” bądź „długiej” łąty. O wyborze danego mechanizmu decyduje rodzaj zaangażowanego enzymu oraz występująca zmiana. Mechanizm „krótkiej łąty” generowany jest w momencie gdy potrzebna jest wymiana jednego niewłaściwego nukleotydu natomiast „długa łąta” aktywowana jest podczas naprawy 2–13 nukleotydów. Obie ścieżki wymagają fragmentów oflankowanych poprzez 3'-OH i 5'-dRP. W proces naprawy „długiej łąty” jest zaangażowana polimeraza, która uzupełnia sekwencje wypychając fragment oflankowany 5'dRP wraz z kilkoma nukleotydami. Następnie endonukleaza usuwa wypchnięty przez polimerazę fragment. W kolejnym etapie uzupełniona sekwencja zostaje połączona z nicią DNA poprzez działanie ligazy. Natomiast w mechanizmie „krótkiej łąty” uczestniczy liaza 5'-dRP usuwając oflankowane miejsce. Następnie poprzez działanie polimerazy DNA oraz ligazy DNA następuje uzupełnienie usuniętego miejsca AP oraz połączenie nici. Niestety tożsamość polimerazy DNA zaangażowanej w ten proces nie jest jeszcze do końca poznana. Badacze sugerują, że może być to Polimeraza α jednak nie ma co do tego pewności. Niezbędne są dalsze badania, które dostarczą więcej informacji na ten temat (Roldan-Arjona T. i wsp., 2019). (Rys. 1).

1.1. Glikozylazy

Glikozylazy DNA to enzymy, które rozpoznają uszkodzone lub zmodyfikowane zasady w DNA i usuwają je poprzez rozszczepienie wiązania N-glikozydowego, które łączy zasady z cukrem 2-deoksyrybozowym (Brooks i wsp., 2013). Przeszukiwanie zasad w łańcuchu DNA ułatwia lokalizowanie zmian, które nie zniekształcają znacznie ogólnej struktury DNA. Każdy gatunek biologiczny ma kilka różnych glikozylaz DNA (Zharkov, 2008). Różne rodzaje glikozylaz DNA wyspecjalizowane są w wyszukiwaniu konkretnych typów

uszkodzeń i zmian. W roślinach wykryto cztery nadrodziny strukturalne glikozylaz DNA, w tym glikozylazę alkiladeniny DNA (AAG), glikozylazę uracylu DNA (UDG), glikozylazy zawierające motyw helisa-spinka-helisa (HhH-GPD) oraz glikozylazy z nadrodziny białek H2TH (Dalhus i wsp., 2009). Na szczególną uwagę zasługują nadrodziny HhH-GPD oraz H2TH. Nadrodzina HhH-GPD posiada domenę wiążącą DNA w sposób niezależny od sekwencji. Do tej grupy enzymów zaliczamy glikozylazy 8-oksoguaniny DNA (OGG), które usuwają główne produkty utleniania puryny 8-oksoG. Nadrodzina H2TH zawiera enzymy dwufunkcyjne mające zdolności przecinania szkieletu cukrowo-fosforanowego (Huffman i wsp., 2005). Do tej nadrodziny należy glikozylaza DNA formamidopirimidyny (FPG) rozpoznająca produkty utleniania 8-oksoG takie jak formamidopirimidyny, spiroiminodihydantoinę i guanidynohydantoinę (Kathe i wsp., 2009). Enzymy OGG1 oraz FPG są zaangażowane w naprawę uszkodzeń oksydacyjnych.

1.2. Endonukleazy AP

Endonukleazy te hydrolizują wiązanie 5'-3' fosfodiesterowe po stronie 5' od miejsca AP. W efekcie następuje pojedyncze pęknięcie nici z wolnymi końcami 3'-OH i 5'-dRP. W genomach rzodkiewnika, ryżu i trzciny cukrowej zidentyfikowano geny trzech endonukleaz: ARP (ang. apurinic endonuclease-redox protein), APE1L (ang. apurinic/aprimidinic endonuclease 1) i APE2 (ang. apurinic/aprimidinic endonuclease 2) (Murphy i wsp., 2009; Joldybayayeva i wsp., 2014; Maira i wsp., 2014; Cabral Medeiros i wsp., 2019). Endonukleaza ARP jest niezbędna do przetwarzania nacięć produktów pośrednich naprawy DNA w starzejących się nasionach. Aktywność liaz OGG1 i FPG podczas naprawy 8-oxoG powoduje powstawanie zablokowanych końców 3', które muszą zostać przetworzone do końców 3'-hydroksylowych, zanim nastąpi etap uzupełnienia luki oraz ligacja DNA. Endonukleaza ARP ma aktywność 3'-fosfodiesterazy, która usuwa grupy blokujące końce 3' (Cordoba-Cañero i wsp., 2014).

1.3. Polimerazy i ligazy

W syntezie DNA podczas naprawy BER bierze udział polimeraza należąca do jednej z trzech rodzin: A (eukariotyczna mitochondrialna Pol γ), B (eukariotyczna DNA Pol δ , ϵ , α) oraz X (eukariotyczna DNA Pol α , β) (Zharkov, 2008). Niestety badania na temat polimeraz biorących udział w naprawie

BER u roślin nie są jeszcze na tyle zaawansowane, aby w pełni scharakteryzować ich działanie. W systemie BER uzupełnienie jednoniciowych końcówek DNA następuje poprzez aktywność liganzy DNA. Enzymy te biorą udział w wielu procesach metabolizmu DNA i posiadają zdolność do wytworzenia wiązania fosfodiesterowego (Tomkinson i wsp., 2006).

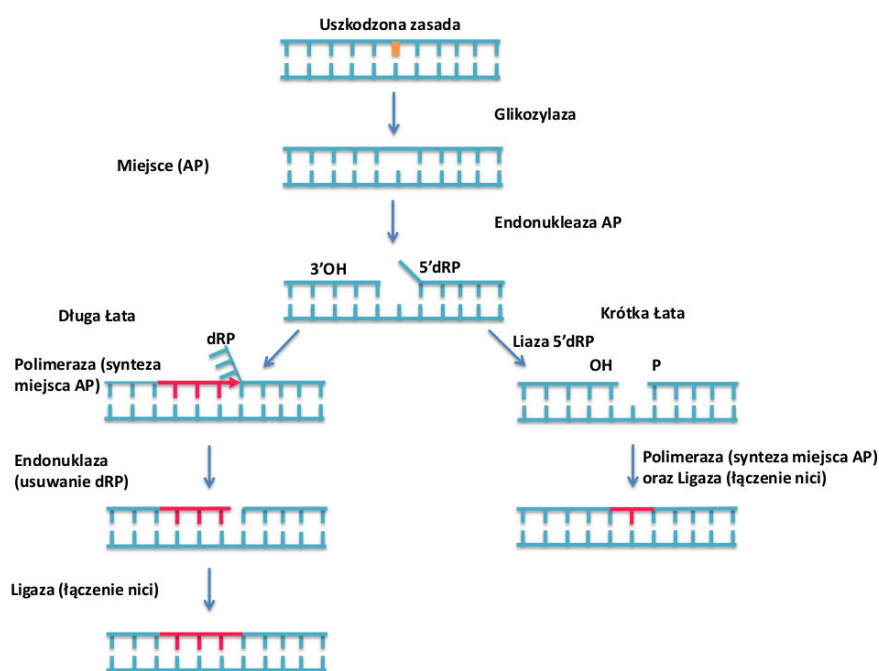
2. Rola systemu BER w starzeniu nasion

Nasiona przechowywane długoterminowo są podatne na uszkodzenia oksydacyjne wywołane przez reaktywne formy tlenu (Jeevan Kumar i wsp., 2015). W badaniach nad żywotnością przechowywanych nasion buka wykazano, że poziom H_2O_2 jest silnie skorelowany ze zmniejszonym poziomem kiełkowania (Ratajczyk i wsp., 2015). Wzrost poziomu H_2O_2 wpływa również negatywnie na zdolność kiełkowania u owsa, pszenicy, słonecznika, dębu i bawełny (Kong i wsp., 2015; Kibinza i wsp., 2006; Goel i Sheoran, 2003; Romero-Rodriguez i wsp., 2018). W badaniach nad *Arabidopsis thaliana* (Chen i wsp., 2012), *Medicago truncatula* (Macovei i wsp., 2011) i *Shorea robusta* (Chandra i wsp., 2018) wykazano, że zwiększony poziom 8-oksoG wpływa negatywnie na proces kiełkowania i prowadzi do przyspieszonego starzenia się nasion. Uszkodzenia oksydacyjne wywołane przez ROS w szczególności 8-oksoG są naprawiane poprzez system BER, dzięki udziałowi specyficznych enzymów takich jak FPG oraz OGG1. Są to glikozylazy

DNA, które hydrolizują wiązanie glikozydowe między deoksyrybozą a błędną zasadą, uwalniając w ten sposób uszkodzoną zasadę i tworząc miejsce AP (Roldan-Arjona i Ariza, 2009). Geny FPG zostały opisane w *A. thaliana* oraz trzcinie cukrowej (Murphy i George, 2005; Scortecci i wsp., 2007). Roślinny OGG1 po raz pierwszy został wyizolowany i scharakteryzowany u *A. thaliana* (Dany i Tisser, 2001). W badaniach na *M. truncatula* wykazano, że geny OGG1 i FPG biorą udział w mechanizmach naprawy nasion podczas stresu oksydacyjnego. Potwierdzono, że poziom ekspresji obu genów wzrasta podczas imbibicji. Wskazuje to na ich udział w mechanizmach naprawy uszkodzeń oksydacyjnych w nasionach (Macovei i wsp., 2011).

Wnioski

Starzenie się jest poważnym problemem dla utrzymania żywotności nasion podczas długoterminowego przechowywania zarówno w warunkach naturalnych, jak i bankach genów. Udowodniono, że starzenie jest powiązane z szeregiem pogarszających się zmian zachodzących na poziomie komórkowym, biochemicznym i metabolicznym (El-Maaraouf-Bouteau i wsp., 2011). Zrozumienie mechanizmów fizjologii i biochemii zjawiska starzenia się jest niezbędne dla opracowania odpowiednich protokołów przechowywania nasion dla różnych gatunków roślin (Chen i wsp., 2013; Michalak i wsp., 2015). Uważa się, że nadmierna



Rys. 1. Mechanizm systemu naprawczego BER – Base Excision Repair

Fig.1. Mechanism of system repair BER - Base Excision Repair

akumulacja reaktywnych form tlenu przyczynia się do starzenia nasion podczas długoterminowego przechowywania (Chandra i wsp., 2018). System BER wydaje się głównym systemem naprawczym prowadzącym do zniwelowania zmian wytworzonych przez ROS. Uważa się, że dwoma ważnymi enzymami odpowiadającymi za usuwanie 8-oksoG są OGG1 i FPG. Enzymy te działają poprzez wyszukanie i wycięcie uszkodzenia oksydacyjnego. Wielu badaczy zauważa zależność pomiędzy nagromadzeniem zmian oksydacyjnych w komórce, a aktywnością OGG1 i FPG oraz starzeniem się nasion. Niestety dokładny mechanizm działania tych dwóch enzymów na proces starzenia wywołanego ROS nie jest jeszcze do końca poznany.

Literatura

- Brooks, S. C., Adhikary, S., Rubinson, E. H., Eichman, B. F., (2013). Recent advances in the structural mechanisms of DNA glycosylases. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics* 1834, 247–271. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2012.10.005>
- Cabral Medeiros, N. M., Córdoba-Cañero, D., García-Gil, C. B., Ariza, R. R., Roldán-Arjona, T., Scortecci, K. C., (2019). Characterization of an AP endonuclease from sugarcane – ScARP1. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 514, 926–932. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2019.04.156>
- Chandra, J., Parkhey, S., Keshavkant, S., (2018). Ageing-regulated changes in genetic integrity of two recalcitrant seeded species having contrasting longevity. *Trees* 32, 109–123. <https://doi.org/10.1007/s00468-017-1615-6>
- Chen, H., Chu, P., Zhou, Y., Li, Y., Liu, J., Ding, Y., Tsang, E. W. T., Jiang, L., Wu, K., Huang, S., (2012). Overexpression of AtOGG1, a DNA glycosylase/AP lyase, enhances seed longevity and abiotic stress tolerance in Arabidopsis. *Journal of Experimental Botany* 63, 4107–4121. <https://doi.org/10.1093/jxb/ers093>
- Chen, H., Osuna, D., Colville, L., Lorenzo, O., Graeber, K., Küster, H., Leubner-Metzger, G., Kranner, I., (2013). Transcriptome-Wide Mapping of Pea Seed Ageing Reveals a Pivotal Role for Genes Related to Oxidative Stress and Programmed Cell Death. *PLoS ONE* 8, e78471. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0078471>
- Córdoba-Cañero, D., Roldán-Arjona, T., Ariza, R. R., (2014). Arabidopsis ZDP DNA 3'-phosphatase and ARP endonuclease function in 8-oxoG repair initiated by FPG and OGG1 DNA glycosylases. *Plant J* 79, 824–834. <https://doi.org/10.1111/tbj.12588>
- Dalhus, B., Laerdahl, J. K., Backe, P. H., Bjørås, M., (2009). DNA base repair – recognition and initiation of catalysis. *FEMS Microbiol Rev* 33, 1044–1078. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2009.00188.x>
- Dany, A. L., Tissier, A., (2001). A functional OGG1 homologue from Arabidopsis thaliana. *Molecular Genetics and Genomics* 265, 293–301. <https://doi.org/10.1007/s004380000414>
- Drohat, A. C., Coey, C. T., (2016). Role of Base Excision “Repair” Enzymes in Erasing Epigenetic Marks from DNA. *Chem. Rev.* 116, 12711–12729. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.6b00191>
- El-Maarouf-Bouteau, H., Mazuy, C., Corbineau, F., Bailly, C., (2011). DNA alteration and programmed cell death during ageing of sunflower seed. *Journal of Experimental Botany* 62, 5003–5011. <https://doi.org/10.1093/jxb/err198>
- Goel, A., Sheoran, I., (2003). Lipid Peroxidation and Peroxide-Scavenging Enzymes in Cotton Seeds Under Natural Ageing. *Biologia Plantarum* 46, 429–434. <https://doi.org/doi.org/10.1023/A:1024398724076>
- Huffman, J. L., Sundheim, O., Tainer, J. A., (2005). DNA base damage recognition and removal: New twists and grooves. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 577, 55–76. <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2005.03.012>
- Jeevan Kumar, S. P., Rajendra Prasad, S., Banerjee, R., Thammneni, C., (2015). Seed birth to death: dual functions of reactive oxygen species in seed physiology. *Ann Bot* 116, 663–668. <https://doi.org/10.1093/aob/mcv098>
- Joldybayeva, B., Prorok, P., Grin, I. R., Zharkov, D. O., Ishenko, A. A., Tudek, B., Bissenbaev, A. K., Saparbaev, M., (2014). Cloning and Characterization of a Wheat Homologue of Apurinic/Apyrimidinic Endonuclease Ape1L. *PLoS ONE* 9, e92963. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0092963>
- Kathe, S. D., Barrantes-Reynolds, R., Jaruga, P., Newton, M. R., Burrows, C. J., Bandaru, V., Dizdaroglu, M., Bond, J. P., Wallace, S. S., (2009). Plant and fungal Fpg homologs are formamidopyrimidine DNA glycosylases but not 8-oxoguanine DNA glycosylases. *DNA Repair* 8, 643–653. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2008.12.013>
- Kibinza, S., Vinel, D., Côme, D., Bailly, C., Corbineau, F., (2006). Sunflower seed deterioration as related to moisture content during ageing, energy metabolism and active oxygen species scavenging. *Physiol Plant* 128, 496–506. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.2006.00771.x>
- Kong, L., Huo, H., Mao, P., (2015). Antioxidant response and related gene expression in aged oat seed. *Front. Plant Sci.* 6. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00158>
- Macovei, A., Balestrazzi, A., Confalonieri, M., Faé, M., Carbonera, D., (2011). New insights on the barrel medic MtOGG1 and MtFPG functions in relation to oxidative stress response in planta and during seed imbibition. *Plant Physiology and Biochemistry* 49, 1040–1050. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2011.05.007>
- Maira, N., Torres, T. M., de Oliveira, A. L., de Medeiros, S. R. B., Agnez-Lima, L. F., Lima, J. P. M. S., Scortecci, K. C., (2014). Identification, characterisation and molecular modelling of two AP endonucleases from base exci-

- sion repair pathway in sugarcane provide insights on the early evolution of green plants. *Plant Biol J* 16, 622–631. <https://doi.org/10.1111/plb.12083>
- Michalak, M., Plitta-Michalak, B. P., Naskręt-Barciszewska, M., Barciszewski, J., Bujarska-Borkowska, B., Chmielarz, P., (2015). Global 5-methylcytosine alterations in DNA during ageing of *Quercus robur* seeds. *Ann Bot* 116, 369–376. <https://doi.org/10.1093/aob/mcv104>
- Murphy, T. M., Belmonte, M., Shu, S., Britt, A. B., Hatteroth, J., (2009). Requirement for Abasic Endonuclease Gene Homologues in Arabidopsis Seed Development. *PLoS ONE* 4, e4297. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0004297>
- Murphy, T.M., George, A., (2005). A comparison of two DNA base excision repair glycosylases from Arabidopsis thaliana. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 329, 869–872. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2005.02.054>
- Ratajczak, E., Małecka, A., Bagniewska-Zadworna, A., Kalemba, E. M., (2015). The production, localization and spreading of reactive oxygen species contributes to the low vitality of long-term stored common beech (*Fagus sylvatica* L.) seeds. *Journal of Plant Physiology* 174, 147–156. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2014.08.021>
- Roldán-Arjona, T., Ariza, R. R., (2009). Repair and tolerance of oxidative DNA damage in plants. *Mutation Research/ Reviews in Mutation Research* 681, 169–179. <https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2008.07.003>
- Roldán-Arjona, T., Ariza, R. R., Córdoba-Cañero, D., (2019). DNA Base Excision Repair in Plants: An Unfolding Story With Familiar and Novel Characters. *Front. Plant Sci.* 10, 1055. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.01055>
- Romero-Rodríguez, M. C., Archidona-Yuste, A., Abril, N., Gil-Serrano, A. M., Meijón, M., Jorrín-Novo, J. V., (2018). Germination and Early Seedling Development in *Quercus ilex* Recalcitrant and Non-dormant Seeds: Targeted Transcriptional, Hormonal, and Sugar Analysis. *Front. Plant Sci.* 9, 1508. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01508>
- Scortecci, K. C., Lima, A. F. O., Carvalho, F. M., Silva, U. B., Agnez-Lima, L. F., de Medeiros, S. R. B., (2007). A characterization of a MutM/Fpg ortholog in sugarcane—A monocot plant. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 361, 1054–1060. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2007.07.134>
- Tomkinson, A. E., Vijayakumar, S., Pascal, J. M., Ellenberger, T., (2006). DNA Ligases: Structure, Reaction Mechanism, and Function. *Chem. Rev.* 106, 687–699. <https://doi.org/10.1021/cr040498d>
- Waterworth, W. M., Drury, G. E., Bray, C. M., West, C. E., (2011). Repairing breaks in the plant genome: the importance of keeping it together: Tansley review. *New Phytologist* 192, 805–822. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2011.03926.x>
- Zharkov, D. O., (2008). Base excision DNA repair. *Cell. Mol. Life Sci.* 65, 1544–1565. <https://doi.org/10.1007/s00018-008-7543-2>

Sponsorzy Dni Młodego Naukowca:

