

# Michał Szewczuk

Numer albumu: 133/SSD/2018

# Wpływ 5',8-cyklo-2'-deoksypuryn na aktywność glikozylaz w naprawie uszkodzeń zespolonych DNA

Rozprawa na stopień doktora nauk farmaceutycznych Promotor: Prof. dr hab. n. farm. Bolesław T. Karwowski Zakład Bromatologii Wydziału Farmaceutycznego

Łódź 2023

# Podziękowania

Składam szczególne podziękowania Panu prof. Bolesławowi Karwowskiemu za ogrom bezcennej wiedzy teoretycznej i praktycznej, przekazanej mi w trakcie realizacji moich badań oraz podczas przygotowywania niniejszej pracy. Dziękuję za wsparcie naukowe, wszelką pomoc oraz poświęcony mi czas.

Dziękuję również mojej mamie, pozostałym członkom rodziny, przyjaciołom oraz pracownikom Zakładu Bromatologii za okazane wsparcie i każdą, nawet najdrobniejszą pomoc, bez której realizacja niniejszej pracy nie byłaby możliwa.

Dedykacja

Niniejszą rozprawę doktorską dedykuję mojej babci – Alicji Napieralskiej.

# Spis treści

1.	Cel	i założenia pracy	7
2.	Do	robek naukowy	9
2.1.	Р	Publikacje naukowe stanowiące podstawę rozprawy doktorskiej	9
2.2.	Р	Pozostałe publikacje naukowe, które współtworzyłem jako pierwszy autor	9
2.3.	Р	Pozostałe publikacje naukowe	.10
2.4.	V	Wystąpienia naukowe i plakaty	.11
3.	Czę	ęść teoretyczna	.13
3.1.	τ	Jszkodzenia materiału genetycznego organizmów żywych	.13
3.2.	C	Czynniki ryzyka w uszkodzeniach DNA	.17
3.2	2.1.	Promieniowanie jonizujące	.18
3.2	2.2.	Jonizacja pośrednia i bezpośrednia	.19
3.2	2.3.	Promieniowanie niejonizujące	.20
3.2	2.4.	Stres oksydacyjny	.21
3.3.	C	Charakterystyka uszkodzeń DNA	.22
3.3	3.1.	Uszkodzenia izolowane	.22
3.3	3.2.	Uszkodzenia tandemowe i zespolone	.24
3.3	3.3.	Uszkodzenia DNA badane w niniejszej pracy	.27
3	.3.3	.1. 7,8-dihydro-8-oksoguanina	.27
3	.3.3	.2. 5',8-cyklo-2'-deoksypuryny	.29
3.4.	Ν	Aechanizmy naprawcze uszkodzeń DNA	.32
3.4	4.1.	System naprawy poprzez wycięcie zasady – base excision repair	.32
3.4	4.2.	System naprawy poprzez wycięcie nukleotydu – nucleotide excision repair	.33
3.4	4.3.	Pozostałe systemy naprawy DNA	.35
3.4	1.4.	Organizmy eukariotyczne	.37
3.4	4.5.	Organizmy prokariotyczne	.41
3.5.	C	Charakterystyka jednostek chorobowych	.42
3.5	5.1.	Skóra pergaminowa	.43
3.5	5.2.	Zespół Cockayne'a	.45
3.5	5.3.	Trichotiodystrofia	.46
4.	Dys	skusja	.47

4.1.	Zastosowanie terapeutyczne tematyki poruszonej w części teoretycznej47
4.2.	Wpływ obecności 5',8-cyklo-2'-deoksyadenozyny i 5',8-cyklo-2'-
deoksy	zguanozyny w dsDNA na aktywność glikozylazy UDG i endonukleazy hAPE1
wobec	2'-deoksyurydyny
4.2.1	. Charakterystyka UDG
4.2.2.	. Charakterystyka hAPE150
4.2.3.	. Wyniki – wpływ obecności 5',8-cyklo-2'-deoksyadenozyny i 5',8-cyklo-2'-
deoks	syguanozyny w dsDNA na aktywność glikozylazy UDG i endonukleazy hAPE1
wobe	cc 2'-deoksyurydyny
4.2.	3.1. Aktywność UDG i hAPE1 wobec 2'-deoksyurydyny59
4.2.	3.2. Wpływ obecności (5'S)-5',8-cyklo-2'-deoksyadenozyny (ScdA) w dsDNA
na a	ktywność enzymów UDG i hAPE1 wobec 2'-deoksyurydyny
4.2.	3.3. Wpływ obecności (5'R)-5',8-cyklo-2'-deoksyadenozyny (RcdA) w dsDNA
na a	ktywność enzymów UDG i hAPE1 wobec 2'-deoksyurydyny59
4.2.	3.4. Wpływ obecności (5'S)-5',8-cyklo-2'-deoksyguanozyny (ScdG) w dsDNA
na a	ktywność enzymów UDG i hAPE1 wobec 2'-deoksyurydyny64
4.2. na a	3.5. Wpływ obecności (5'R)-5',8-cyklo-2'-deoksyguanozyny (RcdG) w dsDNA ktywność enzymów UDG i hAPE1 wobec 2'-deoksyurydyny67
4.2.4	. Wnioski – wpływ obecności 5',8-cyklo-2'-deoksyadenozyny i 5',8-cyklo-2'-
deoks	syguanozyny w dsDNA na aktywność glikozylazy UDG i endonukleazy hAPE1
wobe	cc 2'-deoksyurydyny
4.3.	Wpływ obecności 5',8-cyklo-2'-deoksyguanozyny w dsDNA na aktywność
glikozy	ylaz OGG1 i FPG wobec 7,8-dihydro-8-oksoguaniny69
4.3.1	. Charakterystyka OGG169
4.3.2	Charakterystyka FGP
4.3.3. aktyv	. Wyniki – wpływ obecności 5',8-cyklo-2'-deoksyguanozyny w dsDNA na vność glikozylaz OGG1 i FPG wobec 7,8-dihydro-8-oksoguaniny
4.3.	3.1. Wpływ obecności 5',8-cyklo-2'-deoksyguanozyny (cdG) w dsDNA na
akty	zwność enzymu OGG1 wobec 7,8-dihydro-8-oksoguaniny
4.3.	3.2. Wpływ obecności 5',8-cyklo-2'-deoksyguanozyny (cdG) w dsDNA na
akty	wność enzymu FPG wobec 7,8-dihydro-8-oksoguaniny77
4.3.4 aktyv	. Wnioski – wpływ obecności 5',8-cyklo-2'-deoksyguanozyny w dsDNA na vność glikozylaz OGG1 i FPG wobec 7,8-dihydro-8-oksoguaniny
4.4.	Wpływ obecności 5',8-cyklo-2'-deoksyadenozyny i 5',8-cyklo-2'-
deoksy	zguanozyny w dsDNA na aktywność endonukleaz restrykcyjnych SspI i BsmAI 80

1.4.1 Charaktarystyka andonyklaazy rastrykavinai SanI	80
4.4.2. Characteristicke en de melele erre restructure i Dem AL	
4.4.2. Charakterystyka endonukleazy restrykcyjnej BsmAI	
4.4.3. Wyniki – wpływ obecności 5',8-cyklo-2'-deoksyadenozyny deoksyguanozyny w dsDNA na aktywność endonukleaz restrykcyji	i 5',8-cyklo-2'- nych SspI i BsmAI
4.4.3.1. Wpływ obecności 5'R i 5'S cyklodeoksypuryn w dsDNA endonykleazy restrykcyjnej SspI	na aktywność 86
4.4.3.2. Wpływ obecności 5'R-cdA i 5'S-cdA w dsDNA na aktyw restrykcyjnej BsmAI	vność endonukleazy 88
4.4.3.3. Wpływ obecności 5'R-cdG i 5'S-cdG w dsDNA na aktyw restrykcyjnej BsmAI	vność endonukleazy 89
4.4.4. Wnioski – wpływ obecności 5',8-cyklo-2'-deoksyadenozyny deoksyguanozyny w dsDNA na aktywność endonukleaz restrykcyjn	y i 5',8-cyklo-2'- 1ych SspI i BsmAI 91
4.5. Podsumowanie wyników	
5. Część doświadczalna	
5.1. Materiały i metody	
5.1.1. Sprzet i odczynniki	
5.2. Materiał badawczy	
5.3. Znakowanie izotopowe oligonukleotydów	
5.4. Hybrydyzacja oligonukleotydów	
5.5. Reakcie enzymatyczne	
5.5.1. Badanie aktywności enzymów UDG i APE1	
5.5.2. Badanie aktywności enzymów SspI i BsmAI	
5.5.3. Badanie aktywności enzymów OGG1 i FPG	
5.6. Elektroforeza w żelu poliakrylamidowym	
5.7. Autoradiografia	
5.8. Analiza wyników – kwantyfikacia w programie Quantity One	
5.9. Walidacia metod badawczych	119
6. Dane tabelarvczne	
<ol> <li>7. Wykaz skrótów</li> </ol>	
8 Wykaz rysunków	145
9. Wykaz tabel	

10.	Bibliografia	15	2
-----	--------------	----	---

## 1. Cel i założenia pracy

Materiał genetyczny stanowi biologiczna podstawe funkcjonowania wszystkich organizmów żywych. U człowieka jest on przechowywany wewnątrz komórek pod postacią kwasu 2'-deoksyrybonukleinowego (DNA). Jego struktura jest narażona na działanie niekorzystnych czynników zewnętrznych, takich jak promieniowanie jonizujące czy wolne rodniki. Efektem takiego oddziaływania może być powstawanie potencjalnie mutagennych uszkodzeń DNA. Według różnych źródeł, w obrębie każdej komórki ludzkiego ciała dochodzi dziennie do 10000-1000000 takich uszkodzeń [1]-[4]. Pojedyncze uszkodzenia DNA (uszkodzenia izolowane) są eliminowane przede wszystkim przez system wycinania zasady (BER). W przypadku bardziej skomplikowanych uszkodzeń, na przykład uszkodzeń tandemowych lub zespolonych, za ich naprawe odpowiedzialny jest miedzy innymi system wycinania nukleotydu (NER) [5]-[7]. Dysfunkcje mechanizmów naprawczych mogą prowadzić do akumulacji uszkodzeń i rozwoju chorób, w tym nowotworowych [8], [9]. Z tego względu istotne jest poznanie wpływu poszczególnych rodzajów uszkodzeń DNA, w szczególności uszkodzeń zespolonych, na zdolność do ich eliminacji z genomu. Dotyczy to zarówno organizmów eukariotycznych (w tym ludzi), jak i prokariotycznych, takich jak bakterie. Podjęcie próby rozwiązania powyższego problemu badawczego stanowiło podstawowy cel niniejszej pracy.

W trakcie prowadzonych przeze mnie badań, pracując na specjalnie zaprojektowanych oligonukleotydach, podjąłem próbę oceny wpływu obecności 5',8-cyklo-2'-deoksypuryn (cdPus, ang. 5',8-cyclo-2'-deoxypurines) w strukturze DNA na aktywność enzymów naprawczych związanych ze szlakiem BER. Dodatkowo dokonałem oceny wpływu obecności cdPus w strukturze DNA na aktywność enzymów restrykcyjnych (endonukleaz) odpowiedzialnych za prawidłowe funkcjonowanie mechanizmu "restrykcji-modyfikacji" w komórkach bakterii. W literaturze naukowej istnieje niewiele doniesień eksperymentalnych podkreślających negatywny wpływ cdPus na stabilność genomu. Tematyka mutacji oraz schorzeń genetycznych indukowanych wskutek kumulacji uszkodzeń DNA nadal wykazuje duży potencjał do dalszych badań [6], [8], [10], [11]. Szczególnie niewiele informacji dostępnych jest na temat uszkodzeń zawierających 5',8-cyklo-2'-deoksyguanozynę (cdG). Jednym z powodów takiego stanu rzeczy jest bardzo

trudna i czasochłonna synteza oligonukleotydów zawierających takie uszkodzenie. Ze względu na powyższe, zagadnienie związane z cdPus zostały szeroko i szczegółowo opisane w niniejszej pracy. Praca ta stanowi jednocześnie kontynuację wcześniejszych badań dotyczących wpływu cdPus na system BER [12], [13].

Celem realizacji przedstawionego powyżej problemu badawczego wykonałem następujące zadania badawcze:

- Określenie wpływu 5',8-cyklo-2'-deoksyadenozyny i 5',8-cyklo-2'-deoksyguanozyny na aktywność glikozylaz UDG i hAPE1 wobec 2'-deoksyurydyny (dU). Oligonukleotydy stanowiące materiał badawczy zaprojektowano w taki sposób, aby 2'deoksyurydyna występowała w tej samej nici co cdPus, tworząc jednoniciowe uszkodzenia zespolone w dwuniciowej strukturze modelowego DNA.
- Określenie wpływu 5,8-cyklo-2'-deoksyguanozyny na aktywność glikozylaz OGG1 i FPG wobec 7,8-dihydro-8-okso-2'-deoksyguanozyny (8-oxodG). Oligonukleotydy stanowiące materiał badawczy zaprojektowano w taki sposób, aby 8-oxodG występowała w tej samej nici co cdPus, tworząc jednoniciowe uszkodzenia zespolone w dwuniciowej strukturze modelowego DNA.
- Określenie wpływu 5',8-cyklo-2'-deoksyadenozyny i 5',8-cyklo-2'-deoksyguanozyny na aktywność endonukleaza restrykcyjnych BsmAI i SspI. Oligonukleotydy stanowiące materiał badawczy zaprojektowano w taki sposób, aby modelowe dwuniciowe fragmenty DNA zawierały jedną lub dwie cząsteczki cdPus występujące w tej samej lub w przeciwległych niciach podwójnej helisy DNA. Uzyskano w ten sposób jednoniciowe lub dwuniciowe uszkodzenia zespolone w strukturze modelowego DNA.

# 2. Dorobek naukowy

## 2.1. Publikacje naukowe stanowiące podstawę rozprawy doktorskiej

- Szewczuk M., Karwowski B. T.; The influence of cdG on 8-oxodG excision by OGG1 and FPG glycosylases; Acta Biochimica Polonica; 2022; 69 (1); 227-232
- Szewczuk M., Boguszewska K., Kaźmierczak-Barańska J., Karwowski B. T.; When UDG and hAPE1 meet cyclopurines. How (5'*R*) and (5'*S*) 5',8-cyclo-2'deoxyadenosine and 5',8-cyclo-2'-deoxyguanosine affect UDG and hAPE1 activity?; Molecules; 2021; 26 (17); 5177
- Szewczuk M., Boguszewska K., Kaźmierczak-Barańska J., Karwowski B. T.; The influence of 5'R and 5'S cdA and cdG on the activity of BsmAI and SspI restriction enzymes; Molecules; 2021; 26 (12); 3750

## 2.2. Pozostałe publikacje naukowe, które współtworzyłem jako pierwszy autor

- Szewczuk M., Boguszewska K., Kaźmierczak-Barańska J., Karwowski B. T.; The role of AMPK in metabolism and its influence on DNA damage repair; Molecular Biology Reports; 2020; 47; 9075-9086
- Szewczuk M., Boguszewska K., Żebrowska M., Balcerczak E., Stasiak M., Świątkowska M., Błaszczak-Świątkiewicz K.; Virus-directed enzyme prodrug therapy and the assessment of the cytotoxic impact of some benzimidazole derivatives; Tumor Biology; 2017; 39; 1-10
- Szewczuk M., Boguszewska K., Karwowski B. T.; Rola OGG1 w przebiegu procesu naprawy DNA przez system BER; Wybrane zagadnienia z zakresu nauk biologicznych i weterynaryjnych; Wydawnictwo Naukowe Tygiel; 2019; 19-27
- Szewczuk M., Boguszewska K.; Wpływ AMPK na naprawę uszkodzeń DNA; Nauka i wiedza kluczem do poznania świata cz. 3; Wydawnictwo Naukowe Intellect; 2019; 100-118
- 5. Szewczuk M., Boguszewska K., Błaszczak-Świątkiewicz K.; Biologiczna ocena toksyczności wybranych pochodnych benzimidazolu oraz ich wpływu

na przebieg cyklu komórkowego, Doniesienia naukowe z zakresu medycyny i nauk pokrewnych, Wydawnictwo Naukowe Tygiel, 2017, 7-24

#### 2.3. Pozostałe publikacje naukowe

- Kaźmierczak-Barańska J., Boguszewska K., Szewczuk M., Karwowski B. T.; Effects of 5',8-cyclo-2'-deoxypurines on the base excision repair of clustered DNA lesions in nuclear extracts of the XPC cell line; Cells; 2021; 10 (11); 3254
- Boguszewska K., Szewczuk M., Kaźmierczak-Barańska J., Karwowski B. T.; How (5'S) and (5'R) 5',8-cyclo-2'-deoxypurines affect base excision repair of clustered DNA damage in nuclear extracts of xrs5 cells? A biochemical study; Cells; 2021; 10 (4); 725
- Halczuk K. M., Boguszewska K., Urbaniak S. K., Szewczuk M., Karwowski B. T.; 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine (8-oxodG) and 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG) as a cause of autoimmune thyroid diseases (AITD) during pregnancy?; Yale Journal of Biology and Medicine; 2020; 93 (4); 501-515
- Boguszewska K., Szewczuk M., Kaźmierczak-Barańska J., Karwowski B. T.; The similarities between human mitochondria and bacteria in the context of structure, genome, and base excision repair system; Molecules; 2020; 25 (12); 2857
- Urbaniak S. K., Boguszewska K., Szewczuk M., Kaźmierczak-Barańska J., Karwowski B. T.; 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine (8-oxodG) and 8hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG) as a potential biomarker for gestational diabetes mellitus (GDM) development; Molecules; 2020; 25 (1); 202
- Boguszewska K., Szewczuk M., Karwowski B. T.; Naprawa uszkodzeń DNA w mitochondriach poprzez wycinanie zasady – system BER; Wybrane zagadnienia z zakresu nauk biologicznych i weterynaryjnych; Wydawnictwo Naukowe Tygiel; 2019; 7-18

- Boguszewska K., Szewczuk M., Urbaniak S. K., Karwowski B. T.; Review: immunoassays in DNA damage and instability detection; Cellular and Molecular Life Sciences; 2019; 76; 4689-4704
- Boguszewska K., Szewczuk M.; Nowe trendy w rozwoju metod immunometrycznych w kontekście badań nad uszkodzeniami DNA; Nauka i wiedza kluczem do poznania świata cz. 3; Wydawnictwo Naukowe Intellect; 2019; 79-99

#### 2.4. Wystąpienia naukowe i plakaty

- Boguszewska K., Szewczuk M., Karwowski B. T.; plakat na IV Studenckiej Konferencji Biologii Medycznej "Biofuzje" 2019 pod tytułem "BER w akcji – naprawa uszkodzeń zespolonych w mitochondrialnym DNA", Warszawa, 24-26.05.2019
- Szewczuk M., Boguszewska K., Karwowski B. T.; plakat na III Konferencji Naukowo-Szkoleniowej Studentów Farmacji pod tytułem "Wpływ kinazy AMPK na mechanizmy naprawcze DNA", Łódź, 12-13.04.2019
- Boguszewska K., Szewczuk M., Urbaniak S., Karwowski B. T.; plakat na III Konferencji Naukowo-Szkoleniowej Studentów Farmacji pod tytułem "Powierzchniowy rezonans plazmowy – zastosowanie w wykrywaniu uszkodzeń DNA", Lublin, Łódź, 12-13.04.2019
- Szewczuk M., Boguszewska K., Karwowski B. T.; plakat na XI Interdyscyplinarnej Konferencji Naukowej TYGIEL 2019 "Interdyscyplinarność kluczem do rozwoju" pod tytułem "Wpływ kinazy AMPK na mechanizmy naprawcze DNA", Lublin, 23-24.03.2019
- Boguszewska K., Szewczuk M., Karwowski B. T.; plakat na XI Interdyscyplinarnej Konferencji Naukowej TYGIEL 2019 "Interdyscyplinarność kluczem do rozwoju" pod tytułem "Powierzchniowy rezonans plazmowy – zastosowanie w wykrywaniu uszkodzeń DNA", Lublin, 23-24.03.2019
- Boguszewska K., Szewczuk M., Błaszczak-Świątkiewicz K.; plakat na VII Międzyuczelnianym Sympozjum Biotechnologicznym "Symbioza" pod

tytułem "How to kill the killer? New approach in the selective anti-cancer therapy of solid tumors", Warszawa, 11-13.05.2018

- Boguszewska K., Szewczuk M., Błaszczak-Świątkiewicz K.; plakat na VII Konferencji Biologii Molekularnej pod tytułem "Nowe podejście w selektywnej terapii przeciwnowotworowej guzów litych", Łódź, 12-14.04.2018
- Boguszewska K., Szewczuk M., Błaszczak-Świątkiewicz K.; plakat na VI Konferencji Biologii Molekularnej pod tytułem "Wpływ pochodnych benzimidazolu na przebieg cyklu komórkowego ludzkich komórek raka płuc A549", Łódź, 06-08.04.2017
- Szewczuk M., Boguszewska K., Błaszczak-Świątkiewicz K.; plakat na III Ogólnopolskim Sympozjum Biomedycznym ESKULAP 2016 pod tytułem "Biologiczna ocena toksyczności wybranych pochodnych benzimidazolu oraz ich wpływu na przebieg cyklu komórkowego", Lublin, 03.12.2016

# 3. Część teoretyczna

#### 3.1. Uszkodzenia materiału genetycznego organizmów żywych

Funkcjonowanie wszystkich znanych organizmów żywych jest możliwe dzięki istnieniu informacji genetycznej. Informacja ta jest zapisana w nośniku – materiale genetycznym, którym jest kwas deoksyrybonukleinowy (DNA, ang. deoxyribonucleic acid). Całokształt materiału genentycznego danego organizmu, znajdującego się we wszystkich jego komórkach, określa się mianem genomu. Podstawa cyklu życiowego komórek są procesy replikacji DNA i biosyntezy białek. Replikacja pełni kluczową rolę w prawidłowym przebiegu cyklu komórkowego i polega na powieleniu materiału genetycznego celem przekazania go z komórek macierzystych do komórek potomnych. Enzymami odpowiedzialnym za syntezę nowej nici DNA są polimerazy DNA. Biosynteza białek to proces dwuetapowy. Pierwszy etap to transkrypcja, czyli synteza cząsteczek kwasu rybonukleinowego (RNA, ang. ribonucleic acid) na matrycy DNA. Informacja genetyczna zapisana w DNA jest wówczas odczytywana i tłumaczona na sekwencję zasad azotowych w RNA, a cały proces jest zależny od polimerazy RNA. Drugim etapem jest translacja, czyli synteza właściwego białka na matrycy RNA – sekwencja zasad azotowych w RNA jest tłumaczona na sekwencję aminokwasów w białku. W celu zapewnienia niezmienności materiału genetycznego informacja genetyczna jest przepisywana zawsze w identyczny sposób, według reguł zapisanych w kodzie genetycznym. Najważniejszą cechą kodu genetycznego jest jego uniwersalność – kod genetyczny u wszystkich organizmów żywych działa dokładnie w ten sam sposób. Dzięki temu, po wprowadzeniu fragmentu ludzkiego genomu do genomu bakterii metodami inżynierii genetycznej, jesteśmy w stanie zaprogramować komórkę bakteryjną do biosyntezy takich samych białek, jakie są wytwarzane przez komórki ludzkie. Najważniejszym przykładem takiego procesu jest przemysłowa biosynteza ludzkiej insuliny z wykorzystaniem bakterii z gatunku Escherichia coli [14].

DNA jest liniowym, zwykle dwuniciowym, nierozgałęzionym biopolimerem, składającym się z czterech rodzajów podjednostek – 2'-deoksyrybonukleotydów, w skrócie – nukleotydów. Każdy z nich zawiera w swoim składzie pięciowęglową cząsteczkę cukru (deoksyrybozę), resztę kwasu fosforowego oraz jedną z czterech zasad azotowych. Wśród

zasad azotowych wyróżnia się dwie puryny – adeninę (A) i guaninę (G), oraz dwie pirymidyny – cytozynę (C) i tyminę (T). Cząsteczka deoksyrybozy jest połączona z resztą kwasu fosforowego poprzez atom węgla 5' (wiązanie estrowe), natomiast z zasadą azotową poprzez atom węgla 1' (wiązanie β-N-glikozydowe).

Pojedyncza nić DNA powstaje dzięki łączeniu się ze sobą cząsteczek deoksyrybozy z sąsiednich nukleotydów. Wówczas reszta kwasu fosforowego przy atomie węgla 5' deoksyrybozy z jednego nukleotydu łączy się z cząsteczką deoksyrybozy drugiego nukleotydu poprzez atom węgla 3'. Takie połączenie nazywa się wiązaniem fosfodiestrowym. Natomiast istnienie podwójnej nici DNA jest możliwe dzięki wiązaniom wodorowym pomiędzy zasadami azotowymi budującymi przeciwbieżne pojedyncze łańcuchy DNA. Zgodnie z regułą komplementarności, puryny łączą się z pirymidynami, przy czym adenina tworzy dwa wiązania wodorowe z tyminą (para zasad A-T), a guanina trzy wiązania wodorowe z cytozyną (para zasad G-C). Takie połączenia noszą nazwę par zasad Watsona-Cricka. Amerykanin Jamer Dewey Watson i anglik Francis Crick, razem ze swoimi współpracownikami, opracowali w 1953 roku model przestrzennej struktury helisy DNA. Za to odkrycie, wraz z Mauricem Wilkinsem, otrzymali w 1962 roku nagrodę Nobla w dziedzinie fizjologii lub medycyny. Odstępstwem od reguły Watsona-Cricka jest model Hoogsteena, który zakłada rotację adeniny lub cytozyny o 180 stopni względem osi wiązania N-glikozydowego w nukleotydzie. W tym przypadku zasady azotowe w obydwu parach są połaczone dwoma wiązaniami wodorowymi, a takie połaczenia oznacza się jako A·T i G·C. Pary zasad Hoogsteena występują na przykład w strukturze niektórych kompleksów DNA-białko. Rysunek 1 przedstawia struktury chemiczne zasad azotowych DNA. Rysunek 2 przedstawia różnice w strukturze chemicznej par zasad Watsona-Cricka i Hoogsteena.

Nukleotyd, jako podstawowa jednostka strukturalna DNA, przyjmuje swoją nazwę od zasady azotowej wchodzącej w jego skład. Wyróżniamy więc 5'-monofosforan 2'deoksyadenozyny (dAMP, ang. 2'-deoxyadenosine 5'-monophosphate), 5'-monofosforan 2'-deoksytymidyny (dTMP, ang. 2'-deoxythymidine 5'-monophosphate), 5'-monofosforan 2'-deoksyguanozyny (dGMP, ang. 2'-deoxyguanosine 5'-monophosphate) oraz 5'monofosforan 2'-deoksycytydyny (dCMP, ang. 2'-deoxycytidine 5'-monophosphate). Nukleotyd pozbawiony reszty kwasu fosforowego nosi nazwę nukleozydu i wyróżnia się





Rysunek 1. Struktura chemiczna zasad azotowych DNA.

Sekwencja zasad azotowych w materiale genetycznym determinuje treść zapisanej w nim informacji genetycznej. Taka informacja jest niezbędna do utrzymania funkcji życiowych komórek organizmu. Zmiany informacji genetycznej zapisanej w DNA mogą prowadzić do zakłócenia procesów transkrypcji i translacji. W efekcie, syntezowane łańcuchy aminokwasów mogą ulec nieprawidłowemu pofałdowaniu tworząc niefunkcjonalne cząsteczki białek. W następstwie powyższego może dochodzić do zaburzenia procesów komórkowych, co objawia się uszkodzeniem tkanek, a dalej dysfunkcją narządów wewnętrznych organizmu.



**Rysunek 2.** Porównanie struktury chemicznej par zasad Watsona-Cricka (po lewej) i Hoogsteena (po prawej). Pary A-T i A·T znajdują się na górze, pary G-C i G·C na dole.

Każda nagła i niekontrolowana zmiana informacji genetycznej w genomie nazywa się mutacją. Mutacje są indukowane spontanicznie, jak również wskutek działania czynników mutagennych (mutagenów). Klasyfikacja mutacji może obejmować wiele kryteriów, m. in. podział ze względu na ich rozległość (np. mutacje punktowe lub zmiany całych fragmentów chromosomów), czy też konsekwencje występowania (np. mutacje powodujące lub niepowodujące zmian w strukturze białek). Istotna klasyfikacja obejmuje również podział na mutacje somatyczne i germinalne (dziedziczne). Pierwsze z nich powstają w ciągu życia organizmu i nie dotyczą komórek rozrodczych (gamet), a więc nie mogą być przekazywane z pokolenia na pokolenie. Występują tylko w miejscu indukcji i są przekazywane komórkom potomnym – wskutek podziałów komórkowych – w obrębie danej tkanki. Mutacje germinalne natomiast powstają w materiale genetycznym komórek rozrodczych i wskutek zapłodnienia są przekazywane do wszystkich komórek potomstwa. Większość mutacji punktowych somatycznych nie stanowi zagrożenia dla zdrowia organizmu – są usuwane z genomu, bądź dotyczą niekodujących fragmentów DNA. Część z nich może jednak wpływać na ekspresję genów kluczowych dla poprawnego funkcjonowania

komórek. Przykładem są geny supresji nowotworowej – zmiany w ich sekwencjach prowadzą do osłabienia mechanizmów ochrony tkanek przed procesem nowotworzenia. W przypadku mutacji, uszkodzona informacja genetyczna może podlegać procesom replikacji, transkrypcji i translacji, prowadząc do syntezy niefunkcjonalnych białek. Z drugiej strony, wystąpienie mutacji germinalnych zazwyczaj wiąże się z rozwojem chorób genetycznych, dziedziczonych z pokolenia na pokolenie [15].

Pojęciem odmiennym od mutacji jest uszkodzenie DNA (ang. *DNA lesion*) i dotyczy ono zmian struktury chemicznej i przestrzennej DNA. Podobnie jak w przypadku mutacji, uszkodzenia DNA mogą powstawać w wyniku działania czynników środowiskowych. W odróżnieniu od mutacji, uszkodzenia DNA podlegają detekcji oraz naprawie przez specyficzne mechanizmy komórkowe, które odpowiadają za zachowanie niezmienności informacji genetycznej. W specyficznych warunkach, obecność uszkodzeń, które nie uległy naprawie, może prowadzić do powstawania mutacji – na przykład jako efekt błedów w procesie replikacji uszkodzonego fragmentu DNA. Podobnie jak w przypadku mutacji, klasyfikacja uszkodzeń DNA jest różnorodna. Podziały uwzględniają m. in. strukturę molekularną uszkodzeń, źródło ich występowania lub wpływ na strukturę genomu. Najbardziej podstawowy podział obejmuje uszkodzenia izolowane, uszkodzenia tandemowe i uszkodzenia zespolone. Ich charakterystyka została przedstawiona w dalszej części pracy.

#### 3.2. Czynniki ryzyka w uszkodzeniach DNA

Komórki organizmów żywych w sposób ciągły są narażone na działanie czynników wywołujących uszkodzenia ich materiału genetycznego. Czynniki mutagenne można podzielić na endogenne lub egzogenne. Uszkodzenia endogenne wywoływane są przez produkty procesow metabolicznych komórki, np. reaktywne formy tlenu (ROS, ang. *reactive oxygen species*), reaktywne formy azotu (RNS, ang. *reactive nitrogen species*), czy też produkty peroksydacji lipidów oraz błędy w procesie replikacji [16]. Uszkodzenia egzogenne mogą być powodowane przez promieniowanie ultrafioletowe (UV lub UVR, ang. *ultraviolet radiation*) oraz promieniowanie jonizujące (IR, ang. *ionising radiation*) pochodzące na przykład z promieniowania kosmicznego (jony HZE), promieniowania rentgenowskiego (w następstwie działań medycznych) albo z promieniowania gamma. Do

innych czynników egzogennych indukcji uszkodzeń DNA należą również wysoka temperatura, substancje toksyczne pochodzenia roślinnego, substancje zawarte w dymie papierosowym, niektóre substancje czynne zawarte w produktach leczniczych lub ich metabolity, metabolity hormonów, mutageny pochodzące z zanieczyszczenia środowiska i żywności, fizjologiczny stres, bądź też są one efektem oddziaływania na organizm metod radioterapeutycznych i chemioterapeutycznych. Mechanizmy działania tych wszystkich czynników są bardzo różnorodne, ale bez względu na czynnik indukujący, wyróżnia się dwa mechanizmy powstawania uszkodzeń DNA – pośredni i bezpośredni, które odnosi się najczęściej do promieniowania jonizującego, ze względu na dobrze poznany jego charakter [17]. Rysunek 3 przedstawia spektrum fal elektromagnetycznych.

#### 3.2.1. Promieniowanie jonizujące

Promieniowanie jonizujące to każdy rodzaj promieniowania zdolny do wywołania zjawiska jonizacji danego materiału, czyli stworzenia jonu – kationu badź anionu – z obojętnego elektrycznie atomu lub cząsteczki. Jonizacja występuje najczęściej w wyniku zderzenia obojętnego atomu z cząstką o wysokiej energii – na przykład protonem, elektronem lub czastka alfa. Do jonizacji może zachodzić także podczas zerwania wiązań chemicznych, w następstwie czego jeden z atomów zachowuje obydwa elektrony tworzące wiązanie kowalencyjne. Dla procesów biologicznych przyjmuje się, że promieniowanie jonizujące to takie, które jest zdolne do jonizacji cząsteczek organicznych poprzez rozrywanie wiazań pomiędzy dwoma atomami węgla. Taka energia wynosi 33 eV [18]. Odpowiada to długości fali 38 nm i znajduje się bardzo blisko punktu granicznego pomiędzy promieniowaniem UV i rentgenowskim (10 nm). Jednakże wskazanie jednoznacznej granicy pomiędzy jonizującym i niejonizującym promieniowaniem UV jest trudne. Niektóre źródła naukowe przyjmują wartość graniczną 10 eV, co odpowiada długości fali około 124 nm [19]. Według powyższych założeń, promieniowanie rentgenowskie zawsze jest promieniowaniem jonizującym. Natomiast promieniowanie UV uznaje się za jonizujące jedynie w waskim zakresie od 10 do 38-124 nm.



**Rysunek 3.** Spektrum fal elektromagnetycznych. Wartości długości i częstotliwości fal są orientacyjne.

Promieniowanie jonizujące jest charakteryzowane przez liniowy współczynnik przenoszenia energii (LET, ang. *linear energy transfer*), którego wartość jest zależna od typu promieniowania i oznacza ilość energii oddawaną materii na określonej drodze. Wyróżnia się promieniowanie low-LET oraz high-LET, które można rozróżnić w kontekście penetracji tkanek biologicznych. Promieniowanie low-LET jest promieniowaniem głęboko penetrującym tkanki. Przykładem są kwanty promieniowania gamma lub rentgenowskiego, które oddają swoją energię na dłuższej drodze, a więc mniej gwałtownie, przez co powodują mniejsze uszkodzenia tkanek w przeliczeniu na jednostkę odległości. Promieniowanie high-LET penetruje tkanki na niewielkiej głębokości, przez co oddaje swoją energię gwałtowniej i powoduje znaczne uszkodzenia tkanek na mniejszej powierzchni. Przykładem promieniowania high-LET jest promieniowanie alfa [20], [21].

#### 3.2.2. Jonizacja pośrednia i bezpośrednia

Uszkodzenia DNA indukowane przez promieniowanie jonizujące mogą powstawać na dwa sposoby. Pierwszy z nich obejmuje bezpośrednią jonizację lub wzbudzenie konkretnych atomów w cząsteczce DNA. Prowadzi to do powstawania kationorodników wskutek wybijania elektronów z powłok walencyjnych. Drugi obejmuje interakcje w sąsiednich cząsteczkach, prowadzące do powstawania np. wolnych rodników, które następnie reagują z DNA. Bardzo często czynnikiem pośrednim w uszkodzeniu DNA przez promieniowanie jonizujące są cząsteczki wody i powstające w wyniku ich radiolizy rodniki hydroksylowe (•OH). Ze względu na krótki czas życia takich wolnych rodników, wynoszący 4-9x10<sup>-9</sup>

sekundy, są one w stanie pokonywać bardzo niewielki dystans. Dlatego też pośrednie uszkodzenia DNA powstają w bliskim sąsiedztwie oddziaływania promieniowania jonizującego na materiał genetyczny [22]. Pośrednia jonizacja, oprócz generowania ROS, może również zachodzić przy udziale RNS i stanowić efekt dysfunkcji mitochondriów [23]. Promieniowanie niejonizujące, np. UVA, indukuje uszkodzenia DNA wyłącznie w sposób pośredni [24].

#### 3.2.3. Promieniowanie niejonizujące

Promieniowanie słoneczne UV dzieli się na następujące rodzaje: UVA o długości fali 315-400 nm, UVB o długości fali 280-315 nm oraz UVC o długości fali 10-280 nm. Według przedstawionej wcześniej definicji, większość spektrum promieniowania UV nie uznaje się za promieniowanie jonizujące. Dodatkowo, promieniowanie o długości fali mniejszej niż 290 nm nie dociera do powierzchni Ziemi. Jest ono absorbowane przez atmosferę ziemską oraz rozpraszane przez ozon stratosferyczny. Z tego względu, w kontekście negatywnego wpływu promieniowania UV na organizm ludzki, opisuje się zakres UVA oraz UVB [19]. Długość fali promieniowania o największym potencjale do indukowania uszkodzeń DNA to około 260-265 nm, ze względu na najwyższa zdolność do absorpcji fotonów przez cząsteczki DNA. Dlatego też w badaniach laboratoryjnych nad wpływem promieniowania UV na tkanki stosuje się standardowe lampy emitujące promieniowanie UVC o długości fali 254 nm. [25], [26]. Świato słoneczne docierające do ziemi zawiera około 0,3% UVB (>290 nm), 4,7% UVA, 40% światła widzialnego (400-700 nm) i 55% podczerwieni (700-4000 nm). Wynika z tego, że UVA stanowi około 95% całego spektum UV docierającego do ziemi ze słońca. Większość uszkodzeń DNA powstających u ludzi i zwierząt jest indukowana przez niewielką ilość promieniowania UVB, charakteryzującego się wartościami długości fali bardziej zbliżonymi do UVC. Ponadto, uszkodzenia DNA mogą być indukowane również przez działanie światła niebieskiego, które charakteryzuje się długością fali od 450 do 495 nm [27]. Toksyczność promieniowania UVA wynika najczęściej ze skutków ubocznych stosowania niektórych leków, np. azatiopryny w transplantologii. Chromoforem dla promieniowania UVA jest 6-tioguanina (6TG, ang. 6-thioguanine), która może występować w materiale genetycznym jako uszkodzenie DNA. 6TG ulega aktywacji pod wpływem niewielkiej dawki pomieniowania UVA, prowadząc do generowania ROS w komórkach, głównie w postaci tlenu singletowego (<sup>1</sup>O<sub>2</sub>). Nadmierna synteza ROS może prowadzić do uszkodzeń materiału genetycznego oraz dysfunkcji białek systemów naprawy DNA. Przekłada się to na wzrost zachorowalności na nowotwory skóry u pacjentów leczonych azatiopryną [28].

#### 3.2.4. Stres oksydacyjny

Tlen jest pierwiastkiem niezbędnym do życia dla wszystkich organizmów eukariotycznych, a także dla większości organizmów prokariotycznych. Chociaż procesy oddychania tlenowego stanowią podstawę życia na Ziemi, tlen może w szczególnych okolicznościach prowadzić do uszkodzeń materiału genetycznego. Za indukcję uszkodzeń DNA bezpośrednio odpowiadają między innymi ROS, których synteza w komórkach następuje w sposób różnorodny. Oprócz wspomnianego wcześniej promieniowania UVA i UVB, należy wymienić takie czynniki jak reakcje łańcucha oddechowego, reakcje redoks, reakcje Fentona, ekspozycja na promieniowanie jonizujące i chemioterapię, ekspozycja na ozon, zanieczyszczenia żywności i środowiska, metale, pestycydy, substancje czynne niektórych leków, a także okresy fizycznego stresu organizmu [29]. ROS stanowią również narzędzie w "walce" makrofagów i neutrofili z patogenami w miejscach powstawania stanów zapalnych w tkankach [29].

Z tego względu podwyższenie poziomu ROS następuje po uruchomieniu odpowiedzi immunologicznej na infekcje. Reaktywne formy tlenu mogą reagować bezpośrednio z DNA, bądź też z innymi cząsteczkami, np. lipidami, powodując ich peroksydację. W jej wyniku powstają pochodne lipidów, na przykład aldehydy, które mogą wykazywać działanie cytotoksyczne i genotoksyczne, a także mogą wpływać na proliferację komórek, ich różnicowanie się oraz na ekspresję genów [30]. Ze względu na ciągłość procesu generacji ROS wewnątrz komórek, wykształciły one szereg enzymatycznych i nieenzymatycznych przeciwutleniaczy, które "wychwytują" wolne rodniki tlenu. Niestety, po przekroczeniu swojej "pojemności wychwytującej", komórki przechodzą w stan stresu oksydacyjnego. Wówczas nadmiar ROS wchodzi w reakcję z takimi grupami cząsteczek jak lipidy, białka, RNA i DNA, prowadząc do ich uszkodzenia. O ile w przypadku pierwszych trzech, komórka posiada mechanizmy pozwalające na ich resyntezę, o tyle nie jest to możliwe w przypadku DNA [29]. Mitochondria, które są odpowiedzialne za wytwarzanie energii dla komórek, przekształcają około 2% zużywanego tlenu w anionorodnik ponadtlenkowy ( $O_2^{-}$ ), który może być prekursorem innych form ROS. Rodnik ponadtlenkowy może reagować z tlenkiem azotu i generować rodnik w postaci nadtlenoazotynu (ONOO<sup>-</sup>), który stanowi przykład RNS. ONOO<sup>-</sup> może utleniać zasady azotowe w DNA i prowadzić do wytworzenia np. 8-nitroguaniny. Może również prowadzić do fragmentacji pierścieni cukrowych deoksyrybozy z dalszą indukcją uszkodzeń podwójnej helisy. Z punktu widzenia wpływu na strukturę cząsteczek DNA, najbardziej destrukcyjnym rodzajem RNS jest tritlenek diazotu (N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>). Powstaje on w wyniku utlenienia tlenku azotu przez tlen cząsteczkowy i jest zdolny do deaminacji adenozyny, cytozyny i 5-metylocytozyny do odpowiednio hipoksantyny, uracylu i ksantyny [31].

#### 3.3. Charakterystyka uszkodzeń DNA

#### 3.3.1. Uszkodzenia izolowane

Każde uszkodzenie materiału genetycznego jest potencjalnie mutagenne. Izolowane uszkodzenia DNA, ze względu na mechanizm ich powstawania, występuja w genomie najczęściej. Uzkodzenia DNA, które nie uległy naprawie, lub ich naprawa nie została przeprowadzona prawidłowo, mogą prowadzić do powstania mutacji. Najczęściej spotykane mutacje polegają na tranzycji jednej puryny w inną (tranzycja  $A \rightarrow G$ ), bądź też jednej pirymidyny w inną (tranzycja  $C \rightarrow T$ ). Ich źródłem są pomyłki w działaniu polimeraz DNA, bądź też spontaniczne deaminacje cytozyny do uracylu [32] lub 5-metylocytozyny (5mC) do tyminy [33]. Ten drugi proces może skutkować utworzeniem niekomplementarnej pary zasad T:G w sekwencji DNA, a dalej do tranzycji C→T. Jednym z przykładów endogennego czynnika ryzyka w powstawaniu uszkodzeń i mutacji DNA jest niedobór kwasu foliowego. Jego metabolity są niezbędne do przemiany homocysteiny w metionine, której aktywna postać (S-adenozylometionina) bierze udział w metylacji DNA. Metabolity kwasu foliowego biorą również udział w syntezie tymidyny, której niedobór obniża poziom dTTP (ang. 2'-deoxythymidine 5'-triphosphate) względem dUTP (ang. 2'-deoxyuridine 5'-triphosphate). Może to prowadzić do wbudowywania cząsteczek uracylu w miejsce tyminy w DNA. U bakterii niski poziom S-adenozylometioniny prowadzi do deaminacji cytozyny do urazylu, prowadząc do zamiany par zasad C:G do T:A [34]. Wystąpienie tranzycji C→T we fragmentach DNA oznaczanych jako wyspy CpG skutkuje powstaniem dinukleotydów TpG, które stanowią najczęściej spotykaną mutację w komórkach nowotworowych [35]–[37]. Istnieją również transwersje CpG do ApG lub GpG, ale mechanizm ich powstawania i skutki ich występowania są mniej znane [33]. Rysunek 4 przedstawia różnice pomiędzy tranzycją a transwersją.



**Rysunek 4.** Schematyczne przedstawienie różnicy pomiędzy tranzycją a transwersją. Tranzycja polega na zastąpieniu w sekwencji DNA jednej puryny przez inną lub jednej pirymidyny przez inną. W przypadku tranzycji puryna ulega zamianie na pirymidynę lub odwrotnie.

Wyspy CpG to specyficzne fragmenty genomu, w których występuje podwyższona zawartość dinukleotydów CpG, stanowiąca około 50-60% wszystkich dinukleotydów [38]. W ich obrębie szczególnie często zachodzi spontaniczny proces odwracalnej metylacji cząsteczek cytozyny do 5mC – przykład pozytywnej modyfikacji DNA. 5mC stanowi około

4% wszystkich cytozyn w genomie człowieka, a ponad 80% w obrębie wysp CpG [33], [38]. 5mC powstaje wskutek działania metylotransferaz DNA, przenoszących grupy metylowe z S-adenozylometioniny na węgiel w pozycji 5' cząsteczki cytozyny. W obrębie wysp CpG 5mC odpowiada za wyciszanie ekspresji określonych genów, kontrolę embriogenezy i różnicowania się komórek oraz zachowanie integralności genomu. Jednakże nadmierna ilość 5mC w takich fragmentach DNA może powodować mutacje -5mC jest podatna na deaminację do tyminy poprzez wieloetapowy proces z wytworzeniem produktów przejściowych w postaci fotohydratów [35], [39], [40]. O istocie kontroli ilości 5mC w genomie świadczy fakt, że 5mC może być usuwana przez system BER. Istnieje jednak mechanizm utleniania 5mC przez enzymy z rodziny TET (ang. ten-eleven translocation) do 5hmC, która przez system BER nie jest usuwana i w zależności od miejsca w organizmie występuje około 4-krotnie rzadziej niż 5mC [33], [41]. Przypuszcza się, że w ten sposób enzymy z rodziny TET biorą udział w regulacji odpowiedzi zapalnej organizmu [42]. Z drugiej strony istnieje mechanizm dalszego utleniania 5hmC do 5formylocytozyny (5fC) i 5-karboksylcytozyny (5caC), z których obie mogą być usuwane przez system BER wskutek działania enzymów TDG (ang. thymine-DNA glycosylase) lub SMUG1 (ang. specific monofunctional uracil-DNA glucosylase 1) [43]. Zaburzenie procesu poziomu metylacji DNA może stanowić podłoże licznych chorób – np. podczas infekcji HIV (ang. human immunodeficiency virus) dochodzi do hipermetylacji DNA i nadeksprecji genów kodujących enzymy odpowiedzialne za metylację DNA [44]. Rysunek 5 przedstawia wzory strukturalne cytozyny oraz jej pochodnych: 5mC, 5fC i 5caC.

Innymi częstymi uszkodzeniami są 7-metyloguanina (7-meG), 3-metyloadenina (3-meA) i 3-metyloguanina (3-meG), charakteryzujące się cytotoksycznością. Powstają one poprzez alkilację puryn i stanowią substrat dla glikozylazy 3-metyloadeninowej (AAG, ang. *3-alkyladenine DNA glycosylase*). AAG bierze udział w usuwaniu tych uszkodzeń w ramach systemu BER [45].

#### 3.3.2. Uszkodzenia tandemowe i zespolone

Oprócz uszkodzeń izolowanych wyróżniamy uszkodzenia zespolone (CDL, ang. *clustered DNA lesions*), które definiuje się jako dwa lub więcej uszkodzeń przypadające na 1-2 skręty helisy DNA. CDL dzielą się na jednoniciowe oraz dwuniciowe – pojedyncze uszkodzenia

tworzące CDL mogą występować na jedej lub na obu niciach podwójnej helisy DNA. CDL powstają wskutek wielokrotnych procesów jonizacji w obrębie pojedynczego incydentu radiacyjnego [46]. Oznacza to, że pojedynczy czynnik jonizujący (np. wolny rodnik), w obrębie pojedynczego oddziaływania z cząsteczką DNA, może indukować kilka reakcji jonizacji w różnych miejscach tej cząsteczki. W ten sposób dochodzi do powstania wielu oddzielnych uszkodzeń w obrębie bardzo krótkiego fragmentu DNA [47]. CDL są więc szczególnie trudne do usunięcia z genomu i prowadzą do podwyższenia ryzyka wystąpienia mutagenezy w komórkach. W szczególności dotyczy to dwuniciowych CDL, które charakteryzują się wysokim potencjałem do konwersji w pęknięcia obu nici DNA (DSB, ang. *double strand break*) [48], [49].



**Rysunek 5.** Wzory strukturalne cytozyny, 5-metylocytozyny, 5-formylocytozyny i 5-karboksylcytozyny.

Specyficznym rodzajem CDL są uszkodzenia tandemowe. Powstają one w wyniku uszkodzenia dwóch sąsiednich nukleotydów w następstwie pojedynczego incydentu radiacyjnego. Uszkodzenie tandemowe to również takie, w którym pojedynczy nukleotyd

ulegnie uszkodzeniu w więcej niż jednym miejscu w obrębie cząsteczki. Najlepiej poznanymi przykładami takich uszkodzeń tandemowych są 5',8-cyklo-2'-deoksypuryny (cdPus, ang. 5',8-cyclo-2'-deoxypurines), które wykazują potencjał mutagenny. Dodatkowo, wraz ze wzrostem ilości pojedynczych uszkodzeń skumulowanych na niewielkim fragmencie DNA wzrasta stopień trudności ich naprawy [50]. Poznanie natury uszkodzeń zespolonych oraz efektów ich występowania w genomie jest szczególnie istotne dla powodzenia badań nad nowoczesnymi metodami terapeutycznymi.

Ilość uszkodzeń DNA powstających w ludzkich komórkach wskutek pochłoniecia 1 Gy promieniowania jonizującego jest znacząco niższa niż ilość uszkodzeń indukowanych przez czynniki endogenne w następstwie normalnych procesów komórkowych (około 50 tys. uszkodzeń na komórkę dziennie, w tym około 3600 SSB) [51]. Jednakże uszkodzenia powstające spontanicznie w komórkach są z dużą efektywnością usuwane przez komórkowe mechanizmy naprawy DNA. W przypadku powstania dużej ilości uszkodzeń CDL, w następstwie działania czynników mutagennych, ich skuteczna naprawa zostaje ograniczona. Dla przykładu, promieniowanie rentgenowskie jest zdolne do indukowania non-DSB CDL od 4 do 8 razy częściej niż DSB [22]. Stosunek ilości CDL do uszkodzeń pojedynczych wzrasta wraz ze wzrostem wartości LET [20]. Promieniowanie high-LET może powodować powstanie CDL zawierających nawet do 25 uszkodzeń w obrębie 1-2 skrętów helisy [52]. U ssaków około 70% DSB to składniki CDL indukowane przez high-LET, podczas gdy low-LET powoduje tylko 30% DSB w CDL [53]. Przyjmuje się, że występowanie nowotworów jest zależne liniowo od porcji promieniowania jonizującego w przedziale 0,15-1,5 Gy [54]. Dla przykładu, pojedyncza dawka promieniowania jonizującego przyjmowana przez pacjenta w następstwie radioterapii wynosi 1,5-2,5 Gy, podczas gdy wykonanie pojedynczego zdjęcia rentgenowskiego naraża pacjenta na dawkę około 0,1-2,5 mGy.

Ogólna liczba uszkodzeń materiału genetycznego w komórkach organizmów żywych jest trudna do określenia. Szacuje się, że w każdej komórce ludzkiego ciała indukowanych jest od 10000 do 1000000 uszkodzeń DNA dziennie [1]–[4], z czego 9000 mogą stanowić miejsca AP [55]. Interesujące dane eksperymentalne zebrano podczas pracy z komórkami różnych narządów u szczurów oraz z ludzkimi komórkami wątroby. Wykazano, że w każdym momencie w genomie pojedynczej komórki znajduje się od 50000 to 200000

miejsc AP, w zależności od rodzaju badanej tkanki [55]. Wiadomo również, że w komórkach powstaje spontanicznie ponad 10000 SSB dziennie, natomiast uszkodzenia w postaci DSB występują relatywnie rzadko. Szacuje się, że w komórkach ssaczych powstaje około 50 DSB na jeden cykl komórkowy, co daje stanowi około 1% wszystkich uszkodzeń pojedynczej nici [56]. Taka ilość SSB odpowiada destrukcyjnemu działaniu dawki 1,5-2 Gy promieniowania jonizującego [57]. Inne dane wskazują, że w następstwie endogennych i egzogennych czynników stresowych każdego dnia w każdej komórce ludzkiego ciała powstaje około 70000 uszkodzeń DNA, z czego 75% stanowią SSB [32]. Dodatkowo, dochodzi do około 20000 pojedynczych uszkodzeń dziennie w każdej komórce, pojawiających się bez żadnego wpływu czynników stresowych, a więc w następstwie naturalnych procesów utleniania, hydrolizy czy metylacji zachodzących w zdrowych komórkach [29]. Najczęściej pojawiającą się zmianą materiału genetycznego, która może prowadzić do indukcji miejsc AP, jest deaminacja cytozyny do uracylu. Częstość występowania takiego zjawiska deaminacji oszacowano na 60-500 przypadków dziennie w genomie każdej komórki [58].

#### 3.3.3. Uszkodzenia DNA badane w niniejszej pracy

#### 3.3.3.1. 7,8-dihydro-8-oksoguanina

Dobrze znanym przykładem uszkodzenia powodowanego przez ROS jest utlenianie guaniny do 7,8-dihydro-8-oksoguaniny (8-oxoG, ang. *7,8-dihydro-8-oxoguanine*). Guanina jest niezwykle podatna na utlenianie ze względu na swoją niską energię jonizacji. Obecność 8-oxodG (ang. *7,8-dihydro-8-oxo-2'-deoxyguanosine*) (nukleotydu w postaci 7,8-dihydro-8-okso-2'-deoksyguanozyny) w nici DNA może prowadzić do potencjalnie mutagennych transwersji par zasad G-C do T-A, powodujących niestabilność genomu [58]. W badaniach wykazano, że tkanki nowotworowe wykazują podwyższony poziom 8-oksodG, proporcjonalny do rozmiaru guza [3].

Uszkodzenie to zidentyfikowano w 1984 roku, natomiast pierwsze informacje dotyczące usuwania 8-oxoG z nici DNA pojawiły się w badaniach na komórkach *Escherichia coli* w 1990 roku. Udowodniono wówczas istnienie enzymu glikozylazy DNA formamidopirymidyny (MutM lub FPG, ang. *formamidopyrimidine DNA glycosylase*)

zdolnej do usuwania uszkodzeń takich jak 8-oxoG, 2,6-diamino-4-hydroksy-5formamidoguanozyny (FapyG lub FapyGua) oraz 4,6-diamino-5- formamidoadenozyny (FapyA lub FapyAde). Odkrycie OGG1 (glikozylazy 8-oksoguaninowej 1, ang. *oxoguanine glycosylase 1*) miało miejsce w 1996 roku. Wówczas wykazano istnienie homologu FPG w komórkach drożdży z gatunku *Saccharomyces cerevisiae* i oznaczono go jako yOGG1 (ang. *yeast OGG1*). Rok później enzym ten zidentyfikowano u człowieka i oznaczono jako hOGG1 (ang. *human OGG1*) [59], [60].

Rodnik hydroksylowy może atakować atomy węgla C4, C5 i C8 w guaninie, co prowadzi do powstania rodników odpowiednio 4OHdG<sup>•</sup>, 5OHdG<sup>•</sup> i 8OHdG<sup>•</sup> [30]. Pierwsze dwa, w wyniku eliminacji cząsteczek wody, przechodzą w formę G(-H)<sup>•</sup> i dalej dołączają elektron przechodząc z powrotem w niemodyfikowaną formę guaniny. W przypadku 8OHdG<sup>•</sup> może zachodzić redukcja rodnika, co prowadzi do otwarcia pierścienia imidazolowego i powstania FapyG. Może również dojść do utlenienia rodnika, a następnie do utraty protonu, co skutkuje utworzeniem 8-oxoG. Sytuacja wygląda analogicznie w przypadku ataku rodnika hydroksylowego na adeninę – atakowane są atomy węgla w pozycjach C4 lub C8, co prowadzi do powstania 4OHdA<sup>•</sup> i powrotu do niemodyfikowanej formy adeniny, bądź też do powstania 8OHdA<sup>•</sup>, a w konsekwencji do FapyA lub 8-oxoA (7,8-dihydro-8-oksoadeniny) [30]. W każdej zdrowej komórce, w warunkach bezstresowych, powstaje dziennie około 1000 cząsteczek nukleozydu 8-oxodG, a wartość ta może wzrastać do ponad 100000 uszkodzeń na dobę w przypadku komórek nowotworowych [29]. Rysunek 6 przedstawia struktury chemiczne 2'-deoksyguanozyny, 2'-deoksyadenozyny oraz substratów FPG i OGG1, w tym 8-oksodG.



**Rysunek 6.** Wzory strukturalne 2'-deoksyadenozyny (dA), 2'-deoksyguanozyny (dG), ich pochodnych, a także substratów FPG i OGG1. Oznaczenia: ScdG – (5'S)-5',8-cyklo-2'-deoksyguanozyna; RcdG – (5'R)-5',8-cyklo-2'-deoksyguanozyna; 8-oxodG - 7,8-dihydro-8-oksodeoksyguanozyna; 8-oxodA - 7,8-dihydro-8-oksodeoksyadenozyna.

#### *3.3.3.2. 5'*,8-*cyklo-2'-deoksypuryny*

CdPus powstają w wyniku utraty atomu wodoru z grupy 5'-metylenowej 2'-deoksyrybozy w wyniku aktywności rodnika hydroksylowego (•OH). Cząsteczki 5',8-cyklo-2'deoksyadenozyny (cdA) oraz 5',8-cyklo-2'-deoksyguanozyny (cdG) występują w dwóch formach diastereoizomerycznych: 5'*R* oraz 5'*S*. Formy te są oznaczane w następujący sposób: diastereoizomery cdA jako 5'*R*-cdA (*R*cdA) i 5'*S*-cdA (*S*cdA), a diastereoizomery cdG jako 5'*R*-cdG (*R*cdG) i 5'*S*-cdG (*S*cdG). W przypadku cdG badania wskazują, że jej diastereomer 5'*R* występuje z mniejszą częstotliwością i jest łatwiejszy do usunięcia z genomu w porównaniu z 5'*S*. Podobny wniosek wyciągnięto dla cdA: diastereoizomer 5'*R*-cdA wykazuje większą podatność na działanie szlaku NER i jego usuwanie z genomu następuje szybciej niż w przypadku 5'*S*-cdA. CdPus są słabymi substratami dla szlaku naprawy przez system NER i nie są naprawiane przez system wycinania zasady (BER, ang. *base excision repair*) [6]. Dzieje się tak za sprawą dodatkowego wiązania kowalencyjnego C5'-C8, które nadaje sztywności strukturze nukleotydu. Dzięki temu wiązaniu, w przypadku izomeru *5'S*-cdA, wiązanie N-glikozydowe w nukleozydzie jest 40 razy mniej podatne na kwaśną hydrolizę w warunkach laboratoryjnych, niż w przypadku 2'-deoksyadenozyny [50]. Dlatego też, jednoi dwufunkcyjne glikozylazy, specyficzne dla szlaku BER, nie są w stanie wykonać wycięcia pojedynczej zasady z późniejszym utworzeniem miejsc AP lub SSB.

Usuwanie 5'R-cdA i 5'S-cdA jest odpowiednio 40 i 150 razy wolniejsze niż adduktu cysplatyny Pt-1,3-d(GpTpG) [5]. Cisplatyna jest chemioterapeutykiem stosowanym w terapii nowotworów w celu powodowania specyficznych uszkodzeń nici DNA w komórkach nowotworowych, na które oddziałuje [61]. Skutkuje to zahamowaniem cyklu komórkowego i apoptozę komórek. Cisplatyna w komórkach łączy się z atomem N7 w purynach tworząc addukty, z których 65% stanowi addukt Pt-1,2-GpG, 25% stanowi addukt Pt-1,2-ApG oraz około 5-10% stanowi adukt Pt-1,3-GpNpG (addukty pojedynczej nici DNA) [62], [63]. Cisplatyna indukuje również powstawanie niewielkiej ilości adduktów podwójnej nici DNA. Cisplatyna jest usuwana z genomu przez system wycinania nukleotydu, zarówno TC-NER (ang. transcription-coupled nucleotide excision repair) jak i GG-NER (ang. global genomic nucleotide excision repair) [64]. Addukty cisplatynowe osłabiaja stabilność helisy i jej sztywność, a także zaburzają procesy naprawy uszkodzeń powodowanych przez promieniowanie UV. Jednym z komórkowych mechanizmów ochrony przed negatywnym wpływem cisplatyny na stabilność genomu jest szlak naprawczy TLS (ang. translesion synthesis). Pozwala on na przeprowadzenie procesu replikacji DNA z pominięciem adduków cisplatynowych, w szczególności dzięki działaniu polimerazy kappa [62]. Rysunek 7 przedstawia porównanie struktury chemicznej 2'deoksypuryn i 5',8-cyklo-2'-deoksypuryn. Rysunek 8 przedstawia schemat miejsca AP, SSB oraz DSB.



Rysunek 7. Struktury chemiczne 2'-deoksypuryn i 5',8-cyklo-2'-deoksypuryn.



**Rysunek 8.** Schematyczne przedstawienie dwuniciowego DNA oraz podstawowych rodzajów jego uszkodzeń: miejsca AP (na górze po lewej), pęknięcia jednej nici (SSB) (na górze po prawej) oraz pęknięć obu nici (DSB) (na dole po lewej i na dole po prawej).

#### 3.4. Mechanizmy naprawcze uszkodzeń DNA

DNA zawierające błędnie sparowane zasady azotowe może zostać powielone w procesie replikacji i przekazane komórom potomnym w następstwie podziału jądra komórkowego. Aby temu zapobiec komórka posiada wyspecjalizowane systemy naprawy DNA, wśród których wyróżnia się sześć głównych mechanizmów. Pierwszym z nich jest bezpośrednia naprawa uszkodzeń przez specyficzne enzymy, które nie potrzebują matrycy w postaci komplementarnej nici DNA. Przykładami mogą być procesy usuwania dimerów pirymidynowych przez fotoliazy lub reakcje demetylacji zasad azotowych. Trzy kolejne mechanizmy dotyczą uszkodzeń pojedynczej nici – wyróżnia się system BER, system NER oraz system naprawy niesparowanych zasad (MMR, ang. *mismatch repair*). Najpoważniejsze uszkodzenia w postaci pęknięć obu nici (DSB) są naprawiane poprzez mechanizm łączenia niehomologicznych końców (NHEJ, ang. *non-homologous end joining*) lub rekombinację homologiczną (HRR, ang. *homologous recombination repair*).

#### 3.4.1. System naprawy poprzez wycięcie zasady – base excision repair

System BER jest najlepiej poznanym i opisanym mechanizmem naprawy uszkodzeń DNA. Celem działania tego systemu jest usunięcie pojedynczej uszkodzonej zasady azotowej z nici DNA i zastąpienie jej prawidłową. Proces jest inicjowany przez jedno- lub dwufunkcyjne glikozylazy DNA (Rysunek 9). Ich zadaniem jest hydroliza wiązania β-Nglikozydowego pomiędzy uszkodzoną zasadą (1) i resztą cukrową określonego 2'deoksyrybonukleozydu (wiązanie C1'-N9), co powoduje uwolnienie tej zasady z nici DNA (2). Jest to etap odróżniający system BER od innych systemów naprawczych, w których usunieciu ulega cały nukleotyd lub fragment oligonukleotydowy. Po usunieciu zasady azotowej powstaje miejsce AP. Enzymem odpowiedzialnym za poprawne wstawienie nieuszkodzonej zasady azotowej w to miejsce jest polimeraza DNA. Polimeryzacja polega jednak na dołączaniu całych nukleotydów do istniejącej nici i wymaga wolnego końca 3'-OH do inicjacji procesu. Istniejące wiązania fosfodiestrowe po obu stronach miejsca AP uniemożliwiają inicjację, dlatego też w kolejnym etapie dochodzi do ich hydrolizy (3). Proces zależy od rodzaju organizmu oraz typów i aktywności enzymów biorących w nim udział. AP endonukleaza hydrolizuje wiązanie fosfodiestrowe po stronie 5' od miejsca AP z wytworzeniem wolnego końca 3'-OH oraz reszty 5'-fosforanowej. AP liaza natomiast katalizuje β-eliminację reszty fosforanowej z wytworzeniem nienasyconego cukru na końcu 3' oraz reszty 5'-fosforanowej. Dodatkowo, możliwa jest jednoczesna β/δ-eliminacja, która powoduje usunięcie deoksyrybozy i pozostawienie dwóch reszt fosforanowych przyłączonych do sąsiednich deoksyrybonukleozydów (4). W tym przypadku 3'-fosforan jest usuwany – powstaje wolny koniec 3'-OH dla polimerazy DNA.

W przebiegu mechanizmu BER wyróżnia się szlak krótki (SP-BER, ang. short-patch BER) oraz długi (LP-BER, ang. long-patch BER), które różnią się między sobą wersjami białek oraz długością nowo syntezowanego fragmentu nici. W przypadku SP-BER, polimeraza  $\beta$  (beta) lub  $\lambda$  (lambda) wbudowuje pojedynczy nukleotyd w miejsce uszkodzonego. Odtworzenie wiązania fosfodiestrowego pomiędzy nukleotydami, a więc połączenie fragmentów nici, katalizuje ligaza III. Kofaktorem ligazy III jest białko XRCC1, przy czym podejrzewa się, że wchodzi ono w interakcję również z innymi białkami BER, między innymi z glikozylazami [65]. W przypadku LP-BER, syntezowany jest fragment 2-10 nukleotydów, a proces katalizuja polimerazy  $\delta$  (delta) lub  $\varepsilon$  (epsilon), które uczestniczą również w replikacji DNA. Jednocześnie polimerazy te wypierają istniejące nieuszkodzone nukleotydy z nici na rzecz powstającego fragmentu. Wypierany fragment jest odcinany od helisy przez endonukleazę FEN1 na drodze hydrolizy wiązania fosfodiestrowego (ang. *flap* endonuclease 1) (4, 5). Utworzenie nowego wiązania fosfodiestrowego, łączącego koniec powstającego fragmentu oligonukleotydowego z nicią DNA katalizuje ligaza I (6). Za rekrutacje FEN1 i Ligazy 1 do miejsca uszkodzenia odpowiada białko PCNA (ang. proliferating cell nuclear antigen). Pełni ono funkcję białka szkieletowego i pozwala na utworzenie kompleksu białkowego w pobliżu miejca uszkodzenia nici [66].

Mechanizmy zamiany fragmentu oligonukleotydowego na nowy, jak również kryteria wyboru pomiędzy SP-BER i LP-BER nie zostały jeszcze do końca poznane. Sugeruje się, że jednymi z kryteriów są stężenie ATP (ang. *adenosine 5'-triphosphate*) oraz kofaktorów enzymów w środowisku reakcji, a także struktura szczeliny powstałej w miejscu AP [67].

#### 3.4.2. System naprawy poprzez wycięcie nukleotydu – nucleotide excision repair

System NER jest odpowiedzialny za usuwanie uszkodzeń materiału genetycznego w postaci zniekształceń podwójnej helisy DNA, między innymi cdPus oraz dużych adduktów [68]. W przebiegu NER wyróżnia się schemat genomowy (GG-NER) oraz

sprzężony z transkrypcją DNA (TC-NER). W pierwszym przypadku naprawa uszkodzeń dotyczy całego genomu i może zachodzić zarówno w obrębie fragmentów DNA kodujących konkretne geny, jak również w obrębie fragmentów niekodujących (tzw. wyciszonych). Wówczas do rozpoznania uszkodzenia oraz inicjacji naprawy konieczna jest obecność specyficznych białek. W przypadku TC-NER, naprawa uszkodzeń dotyczy takich fragmentów DNA, w obrębie których doszło do blokady transkrypcji, a czynnikiem dającym sygnał o wystąpieniu uszkodzenia jest polimeraza RNA [69]. Różnice pomiędzy GG-NER i TC-NER dotyczą wyłącznie rozpoznania uszkodzenia i inicjacji naprawy, dalsza część procesu przebiega identycznie w obu przypadkach [70].

Najważniejszym białkiem biorącym udział w naprawie rozpoznanego uszkodzenia jest czynnik transkrypcyjny TFIIH (ang. transcription factor II human), który składa się z siedmiu podjednostek. Najważniejsze z nich to białka XPB (ERCC3) oraz XPD (ERCC2), które wykazują aktywność odpowiednio 3'-5' oraz 5'-3' helikazy. Głównym zadaniem TFIIH jest więc rozplecenie podwójnej helisy DNA poprzez zrywanie wiązań wodorowych pomiędzy parami zasad azotowych, wykorzystując do tego energię pochodzącą z hydrolizy ATP. Tworzy się pęcherzyk transkrypcyjny, czyli fragment helisy DNA, w obrębie którego komplementarne nici sa rozplecone i może dojść do wycięcia fragmentu zawierającego uszkodzenie. Białkiem stabilizującym kompleks TFIIH jest XPG (ERCC5), posiadające aktywność endonukleazy, które hydrolizuje więzanie fosfodiestrowe w kierunku 3' od uszkodzenia nici [69]. Jednocześnie, wiazanie fosfodiestrowe w kierunku 5' od uszkodzenia jest hydrolizowane przez heterodimer złożony z białek XPF (ERCC4) i ERCC1. W ten sposób z rozpleconego fragmentu helisy odcinany jest fragment jednoniciowego DNA (ssDNA, ang. single-stranded DNA) o długości około 25-30 nukleotydów. Fragment ten pozostaje połączony z kompleksem TFIIH poprzez białka RPA (ang. *replication protein A*) i XPA. Następnie do miejsca uszkodzenia rekrutowane są białka RFC (ang. replication *factor C*) oraz PCNA, które umożliwiają dołączenie się polimerazy  $\delta$  (delta),  $\varepsilon$  (epsilon) lub κ (kappa) do nici DNA. Odtwarzają one pojedynczą nić DNA w miejscy usuniętego fragmentu. Naprawa uszkodzenia kończy się przy udziale białek stanowiących podstawę szlaku BER – endonukleaza FEN1 odcina ssDNA od kompleksu białek NER, a wiązania fosfodiestrowe są odtwarzane przez Ligazę I. W niektórych przypadkach ostatni etap NER katalizuje kompleks XRCC1-Ligaza III.



Rysunek 9. Schemat SP-BER i LP-BER.

#### 3.4.3. Pozostałe systemy naprawy DNA

System MMR odpowiada za rozpoznawanie i usuwanie z helisy DNA nieprawidłowo sparowanych zasad azotowych. Ich obecność może być skutkiem błędów w replikacji lub zaburzonej naprawy uszkodzeń DNA. Ponieważ mutacje w obrębie replikowanych sekwencji stanowią bezpośrednie zagrożenie równowagi życiowej komórek, MMR uznaje

się za najważniejszy element komórkowej ochrony informacji genetycznej. Mimo tego szczegółowy mechanizm działania MMR u ludzi nie został dotąd poznany. Szacuje się, że proces ten jest bardziej precyzyjny i skomplikowany niż replikacja DNA, gdyż samo rozpoznanie mutacji wymaga obecności 7 białek: MLH1, MLH3, MSH2, MSH3, MSH6, PMS1 i PMS2. Ponadto, fragment uszkodzonej nici, który jest wycinany i syntezowany od nowa, może mieć długość kilku tysięcy nukleotydów [71]. W odbudowie helisy DNA u ludzi biorą udział między innymi Polimeraza  $\delta$  (delta), białko PCNA oraz Ligaza I. Ze względu na istotność tego mechanizmu, mutacje w obrębie genów kodujących białka MMR stanowią bezpśrednią przyczynę rozwoju nowotworów [72]. U pacjentów posiadających nieprawidłowo funkcjonujący mechanizm MMR bardzo często diagnozuje się mutacje upośledzające pracę również innych systemów naprawczych, np. NER [73].

Podstawą naprawy DSB w komórkach eukariotycznych jest system NHEJ [74]. Polega on na łączeniu końców nici pękniętej helisy DNA bez obecności homologicznych fragmentów jako matryc. Najdokładniejsza naprawa DSB zachodzi w przypadku, gdy pęknięcie helisy skutkuje powstaniem lepkich końców. Wówczas dłuższa nić stanowi matrycę do odbudowy przeciwległej nici i ryzyko pominięcia par nukleotydów jest niewielkie. W przypadku tepych końców, nici łączone są bezpośrednio ze sobą, co może skutkować delecjami w sekwencjach genów istotnych dla funkcjonowania komórek. Najważniejszym elementem systemu NHEJ jest białko Ku – heterodimer zbudowany z podjednostek Ku70 (XRCC6) i Ku80 (XRCC5). W momencie rozpoznania uszkodzenia białko Ku łączy się z podjedjostką katalityczną kinazy białkowej zależnej od DNA (DNA-PKcs, ang. DNAdependent protein kinase catalytic subunit), tworząc funkcjonalny enzym DNA-PK (ang. DNA-dependent protein kinase). Dobudowanie fragmentów oligonukleotydowych następuje przy udziale polimeraz  $\lambda$  (lambda) oraz  $\mu$  (mi), a ligację katalizuje ligaza IV, której kofaktorem jest białko XRCC4. System NHEJ występuje również u organizmów prokariotycznych, ale jest dużo mniej skomplikowany. Białko Ku występuje tam w formie homodimeru i do pełnej naprawy uszkodzeń wymaga wyłacznie obecności enzymu LigD, wykazującego aktywność nukleazy, polimerazy i ligazy [75].

System naprawy poprzez rekombinację homologiczną (HRR, ang. *homologous recombination repair*) stanowi w rzeczywistości najbardziej popularny mechanizm naprawy homologicznej, określanej ogólnie jako HDR (ang. *homology-directed repair*).
Podstawa naprawy homologiczej jest pojęcie rekombinacji homologicznej, czyli wymiany informacji genetycznej pomiędzy dwoma homologicznymi (podobnymi) fragmentami DNA. Rekombnacja homologiczna najczęściej dotyczy wymiany dużych fragmentów chromosomów homologicznych w przebiegu podziałów komórkowych. Odpowiada za nadawanie zmienności genetycznej i stanowi podstawę ewolucji gatunków. Oprócz HRR, w ramach homologicznej naprawy DSB wyróżnia się mechanizmy DSBR (ang. double strand break repair), SDSA (ang. synthesis-dependent strand annealing), SSA (ang. singlestrand annealing) i BIR (ang. break-induced replication). Ogólna podstawa systemów naprawy opartych o rekombinacje homologiczna jest "wspópraca" dwóch identycznych fragmentów DNA, z których jeden posiada pęknięcia w obu niciach. Dochodzi do syntezy wstawek dla uszkodzonego fragmentu DNA na matrycy nici nieuszkodzonych z drugiego fragmentu DNA. Efektem takiej "współpracy" są dwa identyczne i nieuszkodzone fragmenty DNA, które mogą posiadać wymienione między sobą sekwencje nukleotydów. Obecność lub brak takiej wymiany, a także jej wymiar, zależa od wybranego mechanizmu naprawy. Mechanizmy oparte o rekombinację homologiczną są preferowane w naprawie DSB u organizmów prokariotycznych. Tabela 1 przedstawia podsumowanie informacji dotyczących najważniejszych systemów naprawy DNA.

## 3.4.4. Organizmy eukariotyczne

Jedną z najważniejszych teorii naukowych w dziedzinie biologii jest teoria endosymbiozy sformułowana w 1905 roku [76]. Zakłada ona, że niektóre organelle komórek eukariotycznych wyewoluowały z pojedynczych organizmów prokariotycznych. Zgodnie z tą teorią, wolno żyjące bakterie dostały się do wnętrza innych jednokomórkowych mikroorganizmów i żyły w ich wnętrzu na zasadzie endosymbiozy. W toku ewolucji nastąpiła integracja genomu bakterii z genomem gospodarza, dzięki czemu bakterie mogły zacząć pełnić specyficzne funkcje. Uważa się, że endosymbioza archeonów z bakteriami dała początek znanym dzisiaj komórkom eukariotycznym zawierającym mitochondria. Archeony są bliżej spokrewnione z komórkami eukariotycznymi, aniżeli z bakteriami. Stanowi to potwierdzenie tezy, że eukarionty wyewoluowały z archeonów, a mitochondria z bakterii. Analogicznym założeniem teorii endosymbiozy jest ewolucja roślinnych

chloroplastów z sinic (cyjanobakterii) [77]–[80]. Nowe chloroplasty i mitochondria tworzą się w procesie przypominający podział bakteryjny.

	Naprawa 1	ıszkodzeń	Występowanie										
System	i tupiuttu t		Prokarvota	Eukaryota									
	SSB	DSB	Tionaryou	Jądro	Mitochondrium								
SP-BER	+		+	+	+								
LP-BER	+		+	+	+								
GG-NER	+			+									
TC-NER	+		+	+									
MMR	+		+	+									
NHEJ		+	+	+									
HRR		+	+	+	+								

**Tabela 1.** Podsumowanie informacji na temat najważniejszych systemów naprawy DNA w organizmach prokariotycznych i eukariotycznych.

Teoria o integracji genomu bakterii z genomem gospodarza ma swoje poparcie w tym, że obecnie większość białek mitochondrialnych nie jest kodowana przez DNA mitochondrialne (mtDNA, ang. *mitochondrial DNA*), tylko przez DNA jądrowe (nDNA, ang. *nuclear DNA*). Taka integracja była możliwa na drodze inkorporacji cząsteczek bakteryjnego DNA w takie miejsca genomu gospodarza, w których występowały DSB, a więc przerwy w ciągłości nici oligonukleotydowych [77].

Informacja genetyczna u organizmów eukariotycznych jest przechowywana w dwóch miejscach – w jądrach komórkowych oraz w mitochondriach. Jądrowe DNA człowieka składa się z ponad 3 miliardów par zasad i jest bardzo ściśle upakowane. Najwyższą formą upakowania materiału genetycznego są chromosomy, których w każdym jądrze komórkowym mamy 46 – 23 męskie i 23 żeńskie. Mitochondrialne DNA u ludzi posiada 16 569 par zasad i istnieje w formie kolistej, nieupakowanej. W każdej komórce znajduje się od kilku do nawet 1500 mitochondriów, zawierających łącznie od kilkuset do kilku tysięcy kopii genomu.

W przypadku nDNA, 93% sekwencji nie zawiera żadnych genów, jednakże pozostałe 3% wciąż zawiera ich ponad 30 tysięcy, kodując około 20-25 tysięcy białek. Jednocześnie mtDNA koduje 2 cząsteczki rRNA, 22 cząsteczki tRNA oraz 13 białek, które stanowią podjednostki kompleksów łańcucha oddechowego. Białka te są niezbędne mitochondriom do pełnienia ich podstawowej funkcji – generowania energii dla komórek. Pozostałe z ponad 1500 genów kodujących białka mitochondrium wchodzi w skład nDNA [78], [79]. Ze względu na brak upakowania mtDNA, częstość występowania uszkodzeń w nim jest około 10 razy większa niż w przypadku nDNA [81]. Białka niezbędne do funkcjonowania mitochondriów, kodowane przez nDNA, są transportowane do ich wnętrza. Wiele schorzeń u ludzi, takich jak otyłość, nowotwory oraz choroby neurodegeneracyjne (w szczególności choroby Parkinsona i Alzheimera) są kojarzone z dysfunkcjami mitochondriów wynikającymi albo z uszkodzenia mtDNA, albo fragmentów nDNA kodujących białka mitochondrialne [82].

Mitochondria są organellami komórkowymi odpowiedzialnymi za oddychanie komórkowe w warunkach tlenowych. Oddychanie komórkowe stanowi szereg procesów biochemicznych stojących u podstawy życia, których głównym celem jest rozkład (utlenienie) substancji organicznych z wytworzeniem użytecznej metabolicznie energii w postaci ATP. Proces ten zachodzi przy użyciu tlenu i jest prowadzony przez wszystkie organizmy tlenowe. Alternatywne oddychanie beztlenowe, które jest prowadzone przez niektóre komórki zwierzęce, komórki roślin oraz wiele mikroorganizmów. Końcowymi etapami oddychania tlenowego są łańcuch oddechowy i fosforylacja oksydacyjna. Procesy oddychania tlenowego u organizmów eukariotycznych zachodzą w mitochondriach, a białka łańcucha oddechowego ulokowane są w wewnętrznej błonie mitochondrialnej. U organizmów prokariotycznych ulokowane są one w błonie komórkowej.

Mitochondria wyższych kręgowców nie posiadają naturalnego mechanizmu usuwania CPD ze względu na brak fotoliazy CPD [83]. Posiadają one homologi fotoliaz – represory transkrypcji Kryptochrom 1 i Kryptochrom 2 (CRY1 i CRY2), które należą do tej samej grupy flawoprotein posiadających FAD. Niestety, pomimo dużych podobieństw do fotoliaz w sekwencji, mitochondrialne enzymy CRY nie posiadają zdolności do usuwania fotouszkodzeń DNA [84]. Ponadto, mitochondria nie posiadają homologu głównego enzymu odpowiedzialnego za usuwanie uszkodzeń DNA w sposób bezpośredni –

metylotransferazy DNA O<sup>6</sup>-metyloguaniny (MGMT, ang. O<sup>6</sup>-methylguanine DNA methyltransferase), która usuwa z genomu cząsteczki z grupy O<sup>6</sup>-alkiloguanin. Nie posiadają również systemu NER, który mógłby naprawiać poważne uszkodzenia materiału genetycznego. Do tej pory nie udało się rozstrzygnąć obecności systemu MMR w mitochondriach. Jądrowe MMR jest oparte o działanie białek MLH1, MSH2, MSH3 i MSH6, z których tylko MLH1 odkryto w mitochondriach [81]. Aktualne badania potwierdzają istnienie systemu MMR odrębnego od tego, który działa w jądrach komórek ssaków [31], [82]. Naprawa SSB w mitochondriach przebiega za pomocą szlaku bardzo podobnego do BER i opisywanego często jako "wariant BER", natomiast naprawa DSB przebiega w mitochondriach za pomocą MMEJ. Obecność systemów naprawczych HRR i NHEJ w mitochondriach nie została do końca potwierdzona. HRR funkcjonuje jedynie w mitochondriach niektórych gatunków drożdży i roślin, natomiast łączenie tępych i lepkich końców w ekstraktach mitochondrialnych jest niedokładne i często powoduje zmiany w łączonych sekwencjach. BER funkcjonuje w mitochondriach w formie SP i LP z wykorzystaniem zarówno mono- jak i bifunkcyjnych glikozylaz i jego odkrycie przypisuje się odkryciu mitochondrialnej glikozylazy uracylu. Ze względu na obecność bardzo wielu kopii mitochondrialnego DNA, uszkodzone DNA jest degradowane i w większości przypadków nie przynosi negatywnego wpłwu na właściwości fizjologiczne komórek. Jest to mechanizm daleko inny od działającego w jądrze, gdzie nawet pojedyncze pekniecie nici DNA w jednym chromosomie może doprowadzić do apoptozy całej komórki [81].

Do głównych mechanizmów ochrony mitochondriów przed wolnymi rodnikami należą enzym dysmutaza ponadtlenkowa, peroksydaza glutationowa, a także szlaki tioredoksyn i peroksyredoksyn. Dla przykładu, dysmutaza ponadtlenkowa przekształca rodnik nadtlenkowy w nadtlenek wodoru, który może być następnie przekształcony w cząsteczkę wody przez pedoksydazę glutationową. Jeżeli nadtlenek wodoru nie zostanie zneutralizowany do wody, może ulec konwersji w rodnik hydroksylowy w następstwie szeregu reakcji Habera-Weissa, katalizowanych przez kationy żelaza. Mitochondria odpowiadają za homeostazę żelaza w komórkach, a białka łańcucha oddechowego posiadają centra żelazowo-siarkowe. W związku z tym dostępność kationów żelaza wewnątrz mitochondrów jest wysoka, co tłumaczy destrukcyjny wpływ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> na komórki [85]. W przypadku przekroczenia potencjału antyoksydacyjnego w mitochondriach, rozpoczyna się biosynteza i aktywacja czynników transkrypcyjnych – NF-κB, HIF-1α, p53 i NRF2, które stanowią silniejszą odpowiedź komórek na stres oksydacyjny [82].

#### 3.4.5. Organizmy prokariotyczne

Genom organizmów prokariotycznych swoją strukturą przypomina mtDNA, z czego bezpośrednio wynikają założenia teorii endosymbiozy. Każda komórka prokariotyczna posiada jedną kopię kolistego, dwuniciowego, nieupakowanego DNA, zawieszonego w cytoplazmie w formie nukleoidu. Prokariotyczny nukleoid często jest nazywany "pojedynczym chromosomem" i ze względu na brak ścisłej struktury przestrzennej jest narażony na uszkodzenia, działanie czynników zewnętrznych i wirusów [86]. Wirusy infekujące bakterie (bakteriofagi) replikują się wykorzystując mechanizmy bakteryjne do powielania własnego materiału genetycznego wewnątrz komórki gospodarza. Mogą na przykład prowadzić do wbudowywania własnych cząsteczek DNA w genom bakterii, dzięki czemu dochodzi do biosyntezy wirusowych białek i syntezy całych cząsteczek wirusowych. Następnie prowadzą do zniszczenia "własnych" komórek bakteryjnych i wydostają się na zewnątrz, zdolne do infekcji kolejnych [87], [88]. Podobny mechanizm działania mogą wykazywać wirusy komórek eukariotycznych, jednakże nie dochodzi w ich przypadku do wbudowywania materiału genetycznego w genom gospodarza. Nie mniej jednak, cykl życia wirusów zależy w całości od procesów zachodzących w komórkach, które są przez nie infekowane. Dlatego też każdy wirus może infekować i namnażać się tylko w takich komórkach, których składniki sa kompatybilne z budowa samego wirusa. Szacuje się, że na świecie istnieje około  $10^{31}$  różnych bakteriofagów, które łącznie odpowiadają za 20-40% śmiertelności wszystkich znanych bakterii. Mają one więc ogromny wpływ na kształtowanie się życia na Ziemi [87].

Oprócz posiadania licznych, niezależnie działających systemów naprawy uszkodzeń DNA, bakterie wykształciły swoisty mechanizm obronny przed infekcjami wirusowymi. Mechanizm restrykcji-modyfikacji wykorzystuje istnienie wewnątrzkomórkowych endonukleaz restrykcyjnych, które rozpoznają specyficzne sekwencje par zasad w obrębie "obcych" cząsteczek DNA (restrykcja). Po rozpoznaniu sekwencji endonukleazy hydrolizują wiązania fosfodiestrowe prowadząc do powstania DSB i degradacji wirusowego DNA. Ze względu na konieczność występowania podobieństwa pomiędzy składnikami komórek gospodarza (w tym sekwencji genomu) oraz infekujących je wirusów, bakteryjne DNA również zawiera sekwencje występujące w genomie wirusa. Aby uniknąć degradacji własnego materiału genetycznego przez endonukleazy, bakterie wykorzystują obecność enzymów z klasy metylotransferaz DNA, które katalizują reakcje metylacji zasad azotowych w obrębie sekwencji rozpoznawanych przez endonukleazy (modyfikacja). Wówczas endonukleazy restrykcyjne nie są w stanie rozpoznawać danej sekwencji w obrębie genomu gospodarza. Mechanizm ten ulega aktywacji jedynie w przypadku infekcji wirusowej [87], [89]–[91]. System restrykcji-modyfikacji występuje u ponad 74% znanych organizmów prokariotycznych [92].

Obecnie techniki badawcze pozwalają na izolację białek enzymatycznych z różnych organizmów, a także na ich późniejszą przemysłową biosyntezę. Dzięki temu endonukleazy restrykcyjne znalazły zastosowanie w badaniach wykorzystujących techniki inżynierii genetycznej [93]. Zdolność enzymów restrykcyjnych do rozpoznawania i hydrolizy cząsteczek DNA w obrębie konkretnych sekwencji stanowi obecnie bardzo ważne narzędzie do badań naukowych. Jednakże w literaturze znajduje się niewiele informacji dotyczących funkcjonowania endonukleaz restrykcyjnych w ich naturalnym środowisku. Materiał genetyczny organizmów prokariotycznych i wirusów może ulegach podobnym uszkodzeniom jak genom człowieka. Bakterie nie dysponują systemem naprawy uszkodzeń DNA o strukturze zbliżonej do NER. Niejasna jest zatem ich zdolność do usuwania uszkodzeń zespolonych. Tym samym nieznany jest ewentualny wpływ uszkodzeń zespolonych w wirusowym DNA na funkcjonowanie mechanizmu restrykcji-modyfikacji u bakterii.

### 3.5. Charakterystyka jednostek chorobowych

Jeżeli uszkodzenia DNA nie są usuwane w sposób efektywny, mogą prowadzić do powstawania mutacji. Mutacje, wskutek procesu replikacji, przenoszone są na materiał genetyczny komórek potomnych, upośledzając w nich biosyntezę białek. Niefunkcjonalne białka, niezdolne do pełnienia swoich funkcji w komórkach, przyczyniają się do ich uszkodzenia i dalej do rozwoju stanów patologicznych w tkankach. Jednym z najbardziej istotnych wyzwań współczesnej medycyny jest prawidłowa ochrona skóry przed

szkodliwymi składnikami promieniowania słonecznego. Dysfunkcje systemów naprawy DNA w komórkach mogą prowadzić do akumulacji uszkodzeń indukowanych przez to promieniowanie, dając początek rozwoju trudnych w leczeniu lub nieuleczalnych chorób skóry. Przykładami schorzeń, których etiopatogeneza dotyczy dysfunkcji białek szlaku NER są skóra pergaminowa, syndrom Cockayne'a oraz trichotiodystrofia. W tym miejscu należy zwrócić szczególną uwagę na złożoność problemu. Z jednej strony, mutacje indukowane przez trudne do naprawy udzkodzenia zespolone, mogą prowadzić do zahamowania biosyntezy funkcjonalnych białek systemu NER. Z drugiej strony, dysfunkcja białek NER upośledza naprawę uszkodzeń zespolonych. W efekcie, rokowania u pacjentów cierpiących na schorzenia z tej grupy ocenia się jako złe, a zgon następuje najczęściej przez osiągnięciem 20 roku życia.

## 3.5.1. Skóra pergaminowa

Skóra pergaminowa (XP, łac. *xeroderma pigmentosum*) jest rzadkim schorzeniem dziedziczonym autosomalnie recesywnie, którego przyczyną jest dysfunkcja białek biorących udział w szlaku NER. Wskutek tego zaburzony zostaje mechanizm naprawy uszkodzeń DNA powodowanych przez promieniowanie UV. Kumulacja uszkodzeń prowadzi do mutacji w genach supresorowych i protoonkogenach, dlatego też u pacjentów z XP występuje znacznie podwyższone ryzyko rozwoju nowotworów skóry. Chorobę w 1874 roku po raz pierwszy opisał Moritz Kaposi. W 1872 roku zasłynął on opisując jako pierwszy mięsaka Kaposiego – rodzaj nowotworu skóry kojarzonego główne z późnym stadium objawowym zespołu nabytego braku odporności (AIDS, ang. *acquired immunodeficiency syndrome*).

XP obejmuje 8 wariantów, a ich etiopatogeneza zależy od miejsca wystąpienia mutacji (Tabela 2). W wariantach A-G mutacje dotyczą genów kodujących białka szlaku NER. Natomiast w wariancie XPV (wariant XP, wariant V) przyczyna choroby jest odmienna. Mutacja wrodzona znajduje się w obrębie genu kodującego polimerazę η (eta), a więc białko spoza szlaku NER. Enzym ten jest niezbędny komórce w momencie wejścia w fazę S cyklu komórkowego i odgrywa zasadniczą funkcję w mechanizmie syntezy nici DNA ponad miejscem uszkodzenia (TLS, ang. *translesion synthesis*). TLS odpowiada za ograniczanie skutków błędów w replikacji DNA. Zapobiega również terminacji replikacji

w obliczu uszkodzeń nici, takich jak dimery TT, miejsca AP czy wiązania kowalencyjne tworzące się pomiędzy cząsteczkami guaniny i tyminy w obrębie tej samej nici DNA (ang. guanine-thymine intrastrand crosslinks). Mechanizm molekularny TLS polega na aktywacji specyficznych polimeraz, np. polimerazy  $\eta$  (eta) lub  $\zeta$  (zeta), po rozpoznaniu uszkodzenia w trakcie procesu replikacji. Polimerazy te są w stanie dobudować właściwy nukleotyd w nić DNA pomimo istnienia uszkodzenia w nici matrycowej. Głównym czynnikiem umożliwiającym aktywację specyficznych polimeraz jest białko PCNA. Pełni ono funkcję białka szkieletowego – rdzenia kompleksu białowego tworzonego wokół nici matrycowej. W ten sposób PCNA odpowiada za rekrutację innych białek do miejsca replikacji [94]. W badaniach *in vivo* na drożdżach z gatunku *Saccharomyces cerevisiae* udowodniono, że możliwa jest prawidłowa synteza nici DNA podczas replikacji nomimo istnienia

możliwa jest prawidłowa synteza nici DNA podczas replikacji pomimo istnienia uszkodzenia nici matrycowej w formie 8-oxodG. Zastosowanie polimetazy η pozwoliło na prawidłowe wbudowanie cytozyny na przeciwko 8-oxodG ze skutecznością 94%, podczas gdy w próbie bez polimerazy η skuteczność wynosiła poniżej 40% [95].

Wariant	Mutacje genów	Kodowane białko
A (I, XPA)	XPA	ХРА
B (II, XPB)	ХРВ	XPB (ERCC3)
C (III, XPC)	XPC	XPC
D (IV, XPD)	XPD	XPD (ERCC2)
	ERCC6	ERCC6 (CSB)
E (V, XPE)	DDB2	DDB2
F (VI, XPF)	ERCC4	ERCC4
G (VII. XPG)	RAD2	FEN1
	ERCC5	ERCC5
V (XPV)	POLH	Polimeraza η

Tabela 2. Charakterystyka wariantów Xeroderma Pigmentosum.

Przebieg XP charakteryzuje się występowaniem silnych oparzeń słonecznych już po kilku minutach przebywania na słońcu, piegów w miejscach narażonych na słońce, suchości skóry oraz zmian w pigmentacji skóry. Mogą również wystąpić problemy z układem

nerwowym, takie jak utrata słuchu, słaba koordynacja, utrata funkcji intelektualnych i drgawki [96]. Powikłania obejmują rozwój nowotworów skóry, przy czym w około połowie przypadków choroba rozwija przed 10 rokiem życia bez podjętych działań zapobiegawczych. Może wystąpić większe ryzyko innych nowotworów, takich jak rak mózgu [97]. Ze względu na charakter schorzenia, jego leczenie ogranicza się do leczenia objawowego i prewencyjnego, polegającego między innymi na unikaniu ekspozycji na promieniowanie słoneczne, wczesnym stosowaniu terapii w kierunku nowotworów skóry oraz leczeniu dermatologicznym. Rokowania są złe i choroba prowadzi do śmierci najczęściej przed ukończeniem 20 roku życia [98], [99].

### 3.5.2. Zespół Cockayne'a

Zespół Cockayne'a (CS, ang. Cockayne syndrome) jest rzadkim zaburzeniem neurodegeneracyjnym, dziedziczonym autosomalnie recesywnie. Objawia się on zaburzeniami wzrostu, upośledzeniem rozwoju układu nerwowego, nadmierną wrażliwością na światło, zaburzeniami funkcjonowania narządu wzroku oraz przedwczesnym starzeniem się. Brak rozwoju i zaburzenia neurologiczne są podstawowymi kryteriami rozpoznania choroby, podczas gdy nadwrażliwość na światło, utrata słuchu, nieprawidłowości oczu i ubytki są innymi bardzo powszechnymi cechami. Ponadto wystąpienie dysfunkcji wielonarządowych może być związane z grupą zaburzeń zwanych leukodystrofiami, które są stanami charakteryzującymi się degradacją istoty białej w komórkach nerwowych. Chorobę po raz pierwszy opisał angielski lekarz i entomolog Edward Alfred Cockayne w 1936 roku. W 1950 roku Mary M. Dingwall i Catherine A. Neill opublikowali artykuł poświęcony rodzeństwu cierpiącemu na CS. W swojej pracy porównywali oni CS do zespół progerii Hutchinsona-Gilforda (HGPS, ang. Hutchinson-Gilford progeria syndrome), ze względu na szereg podobnych objawów, w tym przedwczesne starzenie się organizmu. Z tego względu zespół Cockayne'a jest nazywany również zespołem Neilla-Dingwalla.

W przebiegu CS wyróżniamy 4 podstawowe warianty: klasyczny wariant CSI (typ A), CSII (typ B), CSIII (typ C) i XP-CS. Ten ostatni jest opisywany u pacjentów z równocześnie zdiagnozowanym XP [100]. Podstawą molekularną CS są mutacje w obrębie genów kodujących białka ERCC6 i ERCC8, znanych również jako CSA i CSB, które biorą udział

w transkrypcji DNA oraz w przebiegu szlaku TC-NER. W przeciwieństwie do XP, pacjenci z CS nie są narażeni na zwiększone ryzyko rozwoju nowotworów i infekcji [100].

Ze względu na brak skutecznej terapii, u pacjentów cierpiących na CS stosuje się leczenie objawowe, w tym zabiegi okulistyczne, dietę oraz ochronę skóry przed światłem słonecznym. Prewencja choroby ogranicza się wykonywania badań genetycznych rodzicom pacjentów, w tym badań prenatalnych płodów, gdyż przeżywalność zwykle nie przekracza 7 roku życia w przypadku CSII lub 12 roku życia w przypadku CSI. Jedynie pacjenci cierpiący na CSIII dożywają dorosłości (40-50 lat) [100].

## 3.5.3. Trichotiodystrofia

Trichotiodystrofia (TTD, ang. *trichothiodystrophy*) jest chorobą dziedziczoną autosomalnie recesywnie, która charakteryzuje się występowaniem łamliwości włosów i paznokci, upośledzenia umysłowego, rybiej łuski, obniżonej płodnością i niskiego wzrostu pacjentów [96]. Cechą szczególną jest wzór prążkowania "tygrysiego ogona" we włosach, widoczny pod mikroskopem w świetle spolaryzowanym. Dodatkowo, około połowa osób cierpiących na TTD wykazuje objaw nadmiernej wrażliwości na promieniowanie UV. W związku z tym istnieje podział na cztery warianty choroby: dwa obejmujące nadwrażliwość na światło (BIDS i PBIDS) oraz dwa nieobejmujące tej nadwrażliwości (IBIDS i PIBIDS). Współczesna nomenklatura ogranicza się jedynie do TTD-P (wariant u pacjentów cierpiących na nadwrażliwość na światło) i TTD [101].

Fenotyp TTD jest powodowany przez mutacje występujące w obrębie genów kodujących 4 białka: TTDN1, XPB, XPD i TTDA [101]. Białka XPB, XPD i TTDA są niezbędne do prawidłowego przebiegu szlaku NER. Stanowią one podjednostki czynnika transkrypcyjnego TFIIH, który wykazuje aktywność helikazy DNA w przebiegu rozpoznania uszkodzenia DNA i inicjacji NER. Dysfunkcja tych białek objawia się fenotypem TTD obejmującym nadwrażliwość pacjentów na światło. W przypadku białka TTDN1 taka nadwrażliwość niewystępuje, a białko to nie jest zaangażowane w żaden mechanizm naprawy uszkodzeń DNA.

## 4. Dyskusja

### 4.1. Zastosowanie terapeutyczne tematyki poruszonej w części teoretycznej

Zainteresowanie środowiska naukowego tematem uszkodzeń zespolonych, w tym cdPus, wynika przede wszystkim z ich negatywnego wpływu na ludzki genom. Jednocześnie, liczne badania niosa ze soba szereg odkryć o potencjalnie szerokich zastosowaniach we współczesnej medycynie. Badania przeprowadzone na komórkach wątroby i szkrzeli ryb pozyskanych z regionów o różnym stopniu zanieczyszczenia wód wskazują na znaczne różnice w zawartości ScdA i ScdG w próbach [10], [102]. Podobne rezultaty uzyskano w badaniach tkanek małży wyłowionych z akwenów wodnych o różnym stopniu zanieczyszczenia [103]. Takie wyniki sugerują możliwość stosowania cdPus jako biomarkerów zanieczyszczenia środowiska w prewencji rozwoju nowotworów u mieszkańców różnych regionów świata [104]. Ochrona ludzi przed negatywnym wpływem czynników środowiskowych na genom, mogącym prowadzić do indukcji cdPus, nabiera szczególnego znaczenia odkąd wiadomo, że uszkodzenia te akumulują się w komórkach wraz z upływem czasu [105]. Świadczy to o tym, że z wiekiem maleje zdolność naturalnych systemów naprawy DNA do skutecznego usuwania potencjalnie mutagennych uszkodzeń [105]. Szczególną cechą cdPus jest to, że są to cząsteczki relatywnie niewielkie, w odniesieniu do innych przykładów uszkodzeń DNA [106]. Fakt ten wpływa na ich wysoką stabilność – są odporne na dalszy wpływ wolnych rodników i innych czynników stresowych [105]. Taka właściwość, w połączeniu z niewielką efektywnością ich usuwania z genomu przez system NER, sprzyja ich akumulacji [107]. Promieniowanie jonizujące high-LET posiada większy potencjał do indukcji uszkodzeń DNA w komórkach, takich jak CDL [52]. Obecność halogenowych pochodnych pirymidyny (HP, ang. halogenated pyrimidines), np. bromodeoksyurydyny w DNA, może oddziaływać jako czynnik "wychwytujący" promieniowanie typu low-LET i powodować powstawanie DSB. Jednocześnie HP są mniej efektywne w przypadku oddziaływania promieniowania high-LET [108]. Tę właściwość HP wykorzystuje się obecnie w terapiach przeciwnowotworowych inkorporując ich cząsteczki w DNA komórek guza, a także

w terapiach przeciwwirusowych [109]. W nowoczesnej medycynie powoli zastępuje się

radioterapię nowotworów z użyciem promieniowania rentgenowskiego [21] metodami

terapii z udziałem protonów lub jonów węgla, które charakteryzują się wyższymi wartościami współczynnika LET oraz wyższymi wartościami współczynnika względnej skuteczności biologicznej (RBE, ang. *relative biological effectiveness*) [20], [22]. Współczynnik RBE służy do określania skuteczności oddziaływania danego promieniowania na obiekt w odniesieniu do skuteczności promieniowania rentgenowskiego [22].

## 4.2. Wpływ obecności 5',8-cyklo-2'-deoksyadenozyny i 5',8-cyklo-2'deoksyguanozyny w dsDNA na aktywność glikozylazy UDG i endonukleazy hAPE1 wobec 2'-deoksyurydyny

## 4.2.1. Charakterystyka UDG

Glikozylaza DNA uracylowa (UDG, ang. *uracil-DNA glycosylase*) – glikozylaza monofunkcyjna, posiadająca tylko jedną aktywność, polegającą na hydrolizowaniu wiązania N-glikozydowego pomiędzy resztą deoksyrybozy a cząsteczką puryny lub pirymidyny w DNA. W przypadku UDG, wycinaniu z helisy DNA ulega cząsteczka uracylu, która została wcześniej nieprawidłowo włączona w strukturę nici DNA (nić uszkodzona) i sparowana z cząsteczką adeniny w nici komplementarnej. Obecność dU w sekwencji DNA może wynikać również z konwersji cytozyny do uracylu.

Mechanizm reakcji UDG wobec dU jest następujący. UDG wiąże się z podwójną helisą DNA i rozpoczyna ruch wzdłuż jej mniejszej szczeliny w poszukiwaniu cząsteczek uracylu, delikatnie kompresując i zginając nić. Za detekcję uracylu odpowiadają konserwatywne reszty aminokwasowe Tyr275 i Arg276, które tworzą wiązania wodorowe z atomami N3 kolejnych puryn. Po zlokalizowaniu uszkodzenia, enzym powoduje mocniejsze zgięcie podwójnej helisy DNA poziomu kąta 45°, wykorzystując do tego celu trzy pętle serynowo-prolinowe (Ser-Pro loops). Takie wygięcie jest możliwe dzięki skróceniu dystansu pomiędzy resztami fosforanowymi a zlokalizowaną cząsteczką uracylu z 12 Å do 8 Å. Następnie cząsteczka dU ulega przekręceniu na zewnątrz helisy, co wiąże się z uprzednim zerwaniem wiązań wodorowych w parze U:A lub błędnie sparowanej parze U:G. Za prawidłowe umiejscowienie cząsteczki uracylu w kieszeni katalitycznej enzymu odpowiadają reszty seryny w pętlach Ser-Pro. Kontakt enzymu z helisą DNA jest możliwy

za pośrednictwem pętli pomiędzy  $\beta$ 3 a  $\alpha$ 7 – w szczególności dzięki obecności atomu węgla C- $\alpha$  w Gly246 i wiązania amidowego w Ser247. Powrót cząsteczki uracylu w jej pierwotne położenie blokuje wprowadzany w jej miejsce hydrofobowy łańcuch boczny Leu272 (Leu191 u *E. coli*). Funkcję katalityczną pełni Asp145. Po związaniu się cząsteczki uracylu z UDG następuje przeniesienie elektronu z atomu tlenu O4' deoksyrybozy na atom tlenu O2 uracylu, układ ten jest stabilizowany przez His268 (His 187 u *E. coli*). Za zakończenie hydrolizy wiązania N-glikozydowego odpowiada słabo nukleofilowa cząsteczka wody. Cząsteczka uracylu zostaje uwolniona, pozostawiając miejsce AP w podwójnej helisie DNA [110], [111]. Rysunek 10 przedstawia schemat mechanizmu reakcji hydrolizy katalizowanej przez UDG. Rysunek 11 przedstawia strukturę chemiczną miejsca aktywnego UDG.

Materiał badawczy stanowiła izoforma enzymu katalizująca reakcję zarówno w obecności DNA jednoniciowego, jak i dwuniciowego. Enzym został zakupiony w firmie New England Biolabs. Produkt komercyjny został wytworzony i wyizolowany metodami inżynierii genetycznej z bakterii *Escherichia coli*, u kórych jest kodowany przez gen *UNG*. Ludzka izoforma UDG1 występuje w mitochondrium, UDG2 w jądrze komórkowym. Tabela 3 przedstawia najważniejsze informacje dotyczące klasyfikacji i budowy enzymu.



**Rysunek 10.** Mechanizm reakcji enzymatycznej katalizowanej przez UDG. W pierwszym etapie widać hyrdolizę wiązania C1'-N9 w cząsteczce dU, co skutkuje uwolnieniem cząsteczki uracylu. Widoczne połączenia w postaci wiązań wodorowych pomiędzy DNA a resztami aminokwasowymi w strukturze białka: Cys157, Asn204, Gln144, Asp145, Pro146, His148 i His268. Rusynek zaadoptowałem wg. Schormann N. 2014 [112].



**Rysunek 11.** Struktura połączenia miejsca aktywnego ludzkiej cząsteczki UDG (kolor purpurowy) z fragmentem dsDNA zawierającym miejsce AP. Nici dsDNA zaznaczono kolorem ciemnozielonym (nić uszkodzona) oraz brązowym (nić komplementarna). Kolorem pomarańczowym zaznaczono atomy fosforu wchodzące w skład kolejnych nukleotydów. W centralnej części rysunku zaznaczono cząsteczkę 2'-deoksyrybozy, pozostałą po hydrolizie wiązania C1'-N9 w cząsteczce dU. Jest ona zwrócona w kierunku wnętrza miejsca aktywnego UDG, w przeciwieństwie do dwóch nieuszkodzonych sąsiednich nukleozydów: 2'-dA (powyżej) oraz 2'-dT (poniżej). Reszty aminokwasowe Leu272, Tyr275 i Arg276 są wskazano bez widocznych struktur ze względu na większą odległość od centrum rysunku. Rysunek wykonałem na podstawie pozycji w bibliotece Protein Data Bank o numerze 2SSP.

## 4.2.2. Charakterystyka hAPE1

Apurynowa/apirymidynowa (AP) endonukleaza 1 (APE1, ang. *apurynic/apyrimidinic (AP)* endonuclease 1), EC 4.2.99.18. W organizmie człowieka występują dwie endonukleazy AP – APE1 i APE2. APE1 odpowiada za około 95% aktywności w komórkach. Ludzka AP endonukleaza 1, oznaczana jako hAPE1 (ang. *human apurynic/apyrimidinic (AP)*  *endonuclease 1*) posiada swój analog w komórkach drożdży (m. in. *S. cerevisiae* i *S. pombe*) oznaczany jako APN1 (analogicznie APE2 posiada analog o nazwie APN2). APE1 i APE2 należą do klasy I endonukleaz AP, które hydrolizują wiązanie fosfodiestrowe po stronie 3' od miejsca AP za pomocą mechanizmu beta-liazy, pozostawiając 5'-fosforan i nienasyconą resztę aldehydową na końcu 3' nici. Endonukleazy klasy II hydrolizują wiązanie fosfodiestowe po stronie 5' od miejsca AP, pozostawiając koniec 3'-hydroksylowy oraz 5'-deoksyrybozofosforan. Endonukleazy klasy III i IV pozostawiają wolne końce w postaci 3'-fosforanu i 5'-OH.

Informacje podstawowe															
Nazwa	Nazwa Glikozylaza DNA uracylowa														
Numer EC	3.2.2.27 (subs	strat: dsDN	NA), 3.2.2.28 (su	bstraty: ssDN	IA i dsDNA)										
Klasa	3 – hydrolazy														
Podklasa	3.2 - glikozylazy														
Podpodklasa3.2.2. – glikozylazy hydrolizujące wiązanie N-glikozydowe															
Informacje dodatkowe															
Organizm	Oznaczenie	Gen	Długość [aa]	Masa [Da]	Kod										
Człowiek	UDG1	UDG1	304	33924	P13051-2										
(Homo sapiens)	UDG2	UDG2	313	34645	P13051-1										
Mysz domowa	UDG	UNG	306	33926	P97931										
(Mus musculus)	000	end	500	33720	F77751										
Drożdże Saccharomyces	UDG	UNG1	359	40471	P12887										
cerevisiae ATCC 204508	000	enter	557	10171	112007										
Bakterie	UDG	UNG	229	25693	P12295										
Escherichia coli K12				20070	1122/5										
Danio pręgowany	UDG	UNG	291	32345	07ZVD1										
(Brachydanio rerio)				02010	X, 2, 01										

**Tabela 3.** Charakterystyka UDG.

Chociaż enzym ten przede wszystkim występuje w jądrze komórkowym, jest to białko jądrowo-cytoplazmatyczne. W zależności od aktualnego statnu fizjologicznego komórki może być obecne w różnych jej elementach, np. w mitochondriach, a nawet w przestrzeni międzykomórkowej. Za lokalizację APE1 odpowiada między innymi biako nukleofosmina 1 (NPM1, ang. *nucleophosmin 1*), z którym APE1 łączy się za pośrednictwem swojego N-końca. Koniec ten odpowiada równeż za interakcje z białkiem XRCC1 w przbiegu szlaku naprawy BER. N-koniec APE1 stanowi sekwencja 61 aminokwasów, z których pierwsze 35 (patrząc od strony N-końca) jest fragmentem konserwatywnym dla ssaków, bogatym w reszty lizyny. Uznaje się, że fragment N-końcowy APE1 odpowiada za regulację lokalizacji i aktywności enzymu, a także za jego obróbkę postranslacyjną [65], [113].

APE1 należy do klasy enzymów wykorzystujących pojedynczy atom metalu IIwartościowego jako kofaktora katalizowanej reakcji enzymatycznej. Zazwyczaj jest nim magnez w postaci kationu Mg<sup>2+</sup>. Enzym hydrolizuje wiązanie fosfodiestrowe po stronie 5' względem miejsca AP, pozostawiając SSB zawierające koniec 3'-OH oraz 5'-fosforan deoksyrybozy. W przypadku hAPE1, reszty aminokwasowe biorące udział w mechanizmie reakcji to Tyr171, Asp210, Asn212 i His309. Dodatkowo, w stabilizacji kofaktora biora udział Asp70 i Glu96. Za specyficzność substratowa odpowiadaja Phe266 i Trp280. W celu detekcji uszkodzenia, enzym ustawia się w taki sposób, aby wprowadzić pętle swojej struktury w mniejszą i większą szczelinę podwójnej helisy DNA, a następnie "porusza się" wzdłuż niej. Związanie enzymu z substratem jest możliwe dzięki atakowi nukleofilowemu atomu tlenu z cząsteczki wody stabilizowanej przez Asp210 i Asn212, na atom fosforu końca 5' miejsca AP. Jeden atom Mg<sup>2+</sup>, koordynowany przez Asp70 i Glu96, oraz jedna cząsteczka wody są niezbędne do katalizy reakcji i pomagają stabilizować produkty przejściowe reakcji [65], [114]-[118]. Rysunek 12 przedstawia schemat mechanizmu reakcji hydrolizy katalizowanej przez hAPE1. Rysunek 13 przedstawia strukturę chemiczną miejsca aktywnego hAPE1.

APE1 jest enzymem odpowiedzialnym za hydrolizę miejsc AP w komórkach, przez co stanowi on główny enzym systemu BER. Niestety wysoka naturalna aktywność tego enzymu często prowadzi do powstawania SSB i DSB w następstwie naprawy uszkodzeń izolowanych przez BER w bliskiej odległości od innych uszkodzeń. Stwierdzono, że w przypadku zwiększonej ekspresji genu kodującego APE1 dochodzi do niestabilności genomu ze względu na wysoką częstość powstawania SSB i DSB. Nadekspresja APE1 stwierdzona jest również w przypadku komórek nowotworowych [29]. APE1 jest jedynym znanym białkiem mechanizmów naprawy DNA zdolnym do regulacji innych białek przez reakcje redoks. Udowodniono, że reszty cysteiny 65, 93 i 99 odpowiadają za działanie redoks tego enzymu. Białkami regulowanymi przez APE1 mogą być wszystkie główne białka odpowiedzi na stres oksydacyjny mitochondriów, czyli NF-κB, HIF-1α, p53 i NRF2 [116]. APE1 jest zdolne do translokacji do wnętrza mitochondriów w stanach wymagających odpowiedzi antyoksydacyjnej, co potwierdza rolę tego białka w regulacji naprawy DNA, transkrypcji ważnych genów i utrzymania integralności mtDNA [82]. Dowiedziono również, że APE1 może odpowiadać za regulację wiązania się czynników transkrypcyjnych z DNA – na przykład NF-κB i AP-1 (ang. *activation protein 1*). Mechanizm ten polega na przyłączaniu się dużej ilości cząsteczek APE1 do nici DNA, co skutkuje zmianami struktury przestrzennej podwójnej helisy DNA [113].



**Rysunek 12.** Mechanizm hydrolizy miejsca AP przez enzym hAPE1 przedstawiony z uwzględnieniem fragmentu nici uszkodzonej. Zaznaczono obecność reszty aminokwasowej Asp210, zaangażowanej w atak nukleofilowy atomu tlenu z cząsteczki wody (kolor pomarańczowy) na atom fosforu końca 5' miejsca AP (lewa strona rysunku). Produkt reakcji stanowi SSB z wolnymi końcami 3'-OH oraz 5'-fosforanu, widoczne po prawej stronie rysunku. Rysunek zaadoptowałem wg. Aboelnga M. M. 2019 [114].



**Rysunek 13.** Struktura miejsca aktywnego hAPE1 (kolor ciemnozielony) związanego z miejscem AP w dsDNA. Koniec 5' miejsca AP zaznaczono kolorem czerwonym z widocznym atomem fosforu (kolor pomarańczowy). Koniec 3' miejsca AP zaznaczono kolorem jasnozielonym z widocznym pierścieniem 2'-dC. Nić komplementarną zaznaczono kolorem brązowym. W centrum rysunku znajdują się zaznaczone kolorem jasnozielonym kationy Mg<sup>2+</sup>, stabilizowane przez reszty aminokwasowe Asn68, Asp70 i Glu96. Rysunek wykonałem na podstawie pozycji w bibliotece Protein Data Bank o numerze 4IEM. Kolor czerwony: 5'-fosforan, kolor zielony: 3'-OH w 2'-deoksycytydynie. Kolor jasnozielony: jony magnezu.

Materiał badawczy został zakupiony w firmie New England Biolabs. Produkt komercyjny został wytworzony oraz wyizolowany metodami inżynierii genetycznej z bakterii *Escherichia coli*, u których jest kodowany przez gen *APE1*. Tabela 4 przedstawia najważniejsze informacje dotyczące klasyfikacji i budowy enzymu.

Tabela 4. Charakterystyka hAPE1.

Informacje podstawowe															
Nazwa	azwa Apurynowa/apirymidynowa (AP) endonukleaza 1														
Numer EC	4.2.99.18														
Klasa	4 – liazy														
Podklasa	4.2 – liazy węgiel-tlen														
Podpodklasa 4.2.99 – inne liazy węgiel-tlen															
Informacje dodatkowe															
Organizm	Oznaczenie	Gen	Długość [aa]	Masa [Da]	Kod										
Człowiek	hAPE1	APEX1	318	35555	P27695										
(Homo sapiens)	hAPE2	APEX2	518	57401	Q9UBZ4										
Mysz domowa	APE1	APEX1	317	35490	P28352										
(Mus musculus) APE2 APEX2 516 57340 Qe															
Drożdże Saccharomyces	Drożdże Saccharomyces APN1 APN1 367 41439 P2293														
cerevisiae ATCC 204508	APN2	APN2	520	59445	P38207										

## 4.2.3. Wyniki – wpływ obecności 5',8-cyklo-2'-deoksyadenozyny i 5',8-cyklo-2'deoksyguanozyny w dsDNA na aktywność glikozylazy UDG i endonukleazy hAPE1 wobec 2'-deoksyurydyny

W pierwszej części swojej pracy badawczej określałem wpływ cdPus na aktywność enzymów UDG i hAPE1. Do tego celu wykorzystałem substraty w postaci dwuniciowych oligonukleotydów o długości 40 par zasad. Substraty zostały zaprojektowane w taki sposób, że uszkodzenia znajdowały się tylko w obrębie jednej nici, a nić komplementarna była zbudowana prawidłowo (Rysunek 14, Tabela 5). Oprócz uszkodzeń w formie cdPus, nici uzkodzone posiadały w swojej sekwencji cząsteczki 2'-deoksyurydyny (dU). Stanowią one dobrze opisany i szeroko stosowany w pracach badawczych substrat dla UDG oraz prekursor do tworzenia miejsc AP i SSB [67]. Postęp reakcji określałem poprzez analizę wyników elektroforezy w denaturującym żelu poliakrylamidowym (PAGE) o stężeniu 15% lub 20%, utrwalanych na kliszach rentgenowskich metodą autoradiografii. Wyniki PAGE miały postać ciemnych prążków, których położenie na kliszy zależało od rozmiarów odpowiadających im produktu reakcji enzymatycznej. Szczegółowe informacje dotyczące

rozdziału elektroforetycznego mieszaniny produktów reakcji enzymatycznych znajdują się w części doświadczalnej niniejszej pracy (Punkt 5.6).

Badając aktywność enzymów UDG i hAPE1 uzyskiwałem trzy rodzaje produktów. Nici nienaruszone posiadały długość 40 nukleotydów, nici rozcięte w miejscu dU(+5) posiadały długość 28 nukleotydów, a nici rozcięte w miejscu dU(-5) posiadały długość 18 nukleotydów. W przypadku nici posiadających w swojej sekwencji dwie cząsteczki dU (oznaczanych jako dU(-5)(+5)) obserwowałem produkt pośredni reakcji o długości 28 nukleotydów, powstały w wyniku rozcięcia nici w miejscu dU(+5). Produkt pośredni zanikał wraz z postępem reakcji na korzyść fragmentu o długości 18 nukleotydów, stanowiącego efekt rozcięcia nici w miejscu dU(-5).

Zastosowanie mieszaniny enzymów UDG i APE1 pozwoliło pominąć etap oczyszczania produktów pośrednich, mogący wpłynąć na wyniki doświadczeń. W eksperymentach mających na celu określenie aktywności UDG stosowałem nadmiar hAPE1 (0.5 U hAPE1 oraz 0.02 U UDG). Dzięki temu miejca AP powstające w wyniku działania UDG były natychmiast degradowane do SSB przez hAPE1 i nie zakłócały obrazu wyników reakcji. W eksperymentach mających na celu określenie aktywności hAPE1 stosowałem nadmiar UDG (0.5 U UDG oraz 0.02 U hAPE1). Dzięki temu dochodziło do natychmiastowego tworzenia się miejsc AP i aktywność hAPE1 mogła być obserwowana bez opóźnienia. Natychmiastowe tworzenie się miejsc AP w próbach z nadmiarem UDG jest widoczne jako różnica w położeniu prążków odpowiadających czasom reakcji 0 minut oraz 1 minuta. Po wycięciu uracylu przez UDG ze struktury substratu, produkt charakteryzuje się niższą masą cząsteczkową i migruje w żelu poliakrylamidowym minimalnie szybciej niż nić nienaruszona, co przekłada się na obserwowaną różnicę w położeniu prążków odpowiadającym oligonukleotydom.

Oligonukleotyd	Wartość OD	Objętość [µl]	0,1 OD [μl]	0,12 OD [μl]
Matrix SA	27.2	1000		4,41
Matrix SA-A	12,6	1000		9,52
Matrix SG	30,0	1000		4,00
Matrix SG-A	13,6	1000		8,82
dU0	47,9	1000	2,09	
dU(-5)(+5)dA	28,2	1000	3,55	
dU(-5)ScdA	24,5	1000	4,08	
dU(+5)ScdA	22,6	1000	4,42	
dU(-5)(+5)ScdA	22,5	1000	4,44	
dU(-5)RcdA	22,0	1000	4,55	
dU(+5)RcdA	25,0	1000	4,00	
dU(-5)(+5)RcdA	26,2	1000	3,82	
dU(-5)ScdG	18,6	1000	5,38	
dU(+5)ScdG	11,0	1000	9,09	
dU(-5)(+5)ScdG	9,6	1000	10,42	
dU(-5)RcdG	2,0	100	5,00	
dU(+5)RcdG	1,3	100	7,69	
dU(-5)(+5)RcdG	2,2	100	4,55	

**Tabela 5.** Charakterystyka materiału badawczego w postaci oligonukleotydów stosowanych do określenia aktywności enzymów UDG i hAPE1.

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	
Matrix SA	3'	G	А	G	А	А	С	А	G	Т	С	С	Τ	Τ	А	Т	А	А	С	А	G	А	G	А	Τ	А	С	G	А	G	G	G	Т	G	G	Τ	Τ	Т	С	С	G	5'
Matrix SA-A	3'	G	А	G	А	А	С	А	G	Τ	С	С	Т	Т	А	Т	А	А	С	А	G	А	G	А	Τ	А	С	G	А	Α	G	G	Т	G	G	Τ	Τ	Т	С	С	G	5'
Matrix SG	3'	G	А	G	А	А	С	А	G	Τ	С	С	Т	Т	А	Τ	А	А	С	А	G	Α	G	Α	С	А	С	G	А	G	G	G	Τ	G	G	Τ	Τ	Т	С	С	G	5'
Matrix SG-A	3'	G	А	G	А	А	С	А	G	Τ	С	С	Т	Т	А	Τ	А	А	С	А	G	Α	G	Α	С	А	С	G	Α	Α	G	G	Т	G	G	Τ	Τ	Т	С	С	G	5'
dU0	5'	С	Τ	С	Т	Τ	G	Т	С	А	G	G	Α	А	Т	А	Τ	Τ	G	Τ	С	U	С	Т	A	Т	G	С	Т	С	С	С	А	С	С	А	Α	А	G	G	С	3'
dU(-5)(+5)dA	5'	С	Τ	С	Τ	Τ	G	Τ	С	А	G	G	А	А	Τ	А	Τ	Τ	G	U	С	Τ	С	Τ	A	Τ	G	С	Τ	U	С	С	А	С	С	А	А	А	G	G	С	3'
dU(-5)ScdA	5'	С	Τ	С	Τ	Τ	G	Τ	С	А	G	G	А	А	Τ	А	Τ	Τ	G	U	С	Τ	С	Τ	SA	Τ	G	С	Τ	С	С	С	А	С	С	А	А	А	G	G	С	3'
dU(+5)ScdA	5'	С	Τ	С	Τ	Τ	G	Τ	С	А	G	G	А	А	Τ	А	Τ	Τ	G	Τ	С	Τ	С	Τ	SA	Τ	G	С	Τ	U	С	С	А	С	С	А	А	А	G	G	С	3'
dU(-5)(+5)ScdA	5'	С	Τ	С	Τ	Τ	G	Τ	С	А	G	G	А	А	Τ	А	Τ	Τ	G	U	С	Τ	С	Τ	SA	Τ	G	С	Τ	U	С	С	А	С	С	А	А	А	G	G	С	3'
dU(-5)RcdA	5'	С	Τ	С	Τ	Τ	G	Τ	С	А	G	G	А	А	Τ	А	Τ	Τ	G	U	С	Τ	С	Τ	RA	Т	G	С	Τ	С	С	С	А	С	С	А	А	А	G	G	С	3'
dU(+5)RcdA	5'	С	Τ	С	Т	Τ	G	Τ	С	А	G	G	А	А	Τ	А	Τ	Τ	G	Τ	С	Τ	С	Τ	RA	Τ	G	С	Τ	U	С	С	А	С	С	А	А	А	G	G	С	3'
dU(-5)(+5)RcdA	5'	С	Τ	С	Τ	Τ	G	Τ	С	А	G	G	Α	А	Τ	А	Τ	Τ	G	U	С	Τ	С	Τ	RA	Τ	G	С	Τ	U	С	С	А	С	С	А	А	А	G	G	С	3'
dU(-5)ScdG	5'	С	Τ	С	Τ	Τ	G	Τ	С	А	G	G	А	А	Τ	А	Τ	Τ	G	U	С	Τ	С	Τ	SG	Τ	G	С	Τ	С	С	С	А	С	С	А	А	А	G	G	С	3'
dU(+5)ScdG	5'	С	Τ	С	Τ	Τ	G	Τ	С	А	G	G	А	А	Τ	А	Τ	Τ	G	Τ	С	Τ	С	Τ	SG	Τ	G	С	Τ	U	С	С	А	С	С	А	А	А	G	G	С	3'
dU(-5)(+5)ScdG	5'	С	Τ	С	Т	Τ	G	Τ	С	А	G	G	А	А	Τ	А	Τ	Τ	G	U	С	Τ	С	Τ	SG	Τ	G	С	Τ	U	С	С	А	С	С	Α	А	А	G	G	С	3'
dU(-5)RcdG	5'	С	Τ	С	Т	Τ	G	Τ	С	А	G	G	А	А	Τ	А	Τ	Τ	G	U	С	Τ	С	Τ	RG	Т	G	С	Τ	С	С	С	А	С	С	А	А	А	G	G	С	3'
dU(+5)RcdG	5'	С	Τ	С	Τ	Τ	G	Τ	С	А	G	G	А	А	Τ	А	Τ	Τ	G	Τ	С	Τ	С	Τ	RG	Τ	G	С	Τ	U	С	С	А	С	С	А	А	А	G	G	С	3'
dU(-5)(+5)RcdG	5'	С	Τ	С	Τ	Τ	G	Т	С	А	G	G	Α	А	Τ	А	Τ	Τ	G	U	С	Τ	С	Т	RG	Τ	G	С	Τ	U	С	С	А	С	С	А	А	А	G	G	С	3'

Rysunek 14. Sekwencje oligonukleotydów zaprojektowanych w celu określenia wpływu cdPus na aktywność enzymów UDG i hAPE1.

#### 4.2.3.1. Aktywność UDG i hAPE1 wobec 2'-deoksyurydyny

Punkt odniesienia do dalszych eksperymentów stanowiły próby kontrolne dla aktywności enzymów UDG i hAPE1, przeprwadzone z wykorzystaniem oligonukleotydów zawierających uszkodzenia dU0 oraz dU(-5)(+5)dA). Badając kontrolną aktywność enzymu UDG odnotowałem, że dla pojedynczej cząsteczki uracylu 50% wydajności reakcji następuje po 20 minutach, a 100% po 35 minutach reakcji. Obecność drugiej cząsteczki dU w nici nie wpłynęła na aktywność UDG. Chociaż w obu przypadkach efekt hydrolizy był widoczny już po 5 minutach, uzyskanie 100% wydajności reakcji wymagało 35 minut. Efektywność hydrolizy powstałych miejsc AP przez hAPE1 była wyższa w przypadku nici zawierającej dwie cząsteczki dU (50% substratu rozcięte po 30 minutach,100% po 90 minutach), niż w przypadku dU0 (50% po 60 minutach, 100% po 120 minutach).

# 4.2.3.2. Wpływ obecności (5'S)-5',8-cyklo-2'-deoksyadenozyny (ScdA) w dsDNA na aktywność enzymów UDG i hAPE1 wobec 2'-deoksyurydyny

Pojedyncza cząsteczka uracylu w nici dU(+5)ScdA była wycinana przez UDG szybciej niż w przypadku kontroli. Jednakże, wobec nici dU(-5)ScdA aktywność UDG była niższa. Podobne wyniki uzyskano dla hAPE1. Porównując ze sobą nić kontrolną oraz nić badaną zawierającą dwie cząsteczki dU, aktywność obu enzymów wzrosła dla nici dU(-5)(+5)ScdA o 10%. Wycięcie uracylu przez UDG nastąpiło na poziomie 50% substratu w podobnych czasach reakcji (10 minut dla dU(-5)(+5)dA oraz 15 minut dla dU(-5)(+5)ScdA), ale maksymalna aktywność UDG osiągnęła 90% po 50 minutach dla dU(-5)(+5)dA oraz 97% po 35 min dla dU(-5)(+5)ScdA. W przypadku hAPE1, hydroliza miejsc AP w substracie dU(-5)(+5)ScdA osiągnęła 50% wydajności po 15 minutach, a poziom maksymalny 95% po 60 minutach. W przypadku kontroli, podobną wydajność reakcji hydrolizy uzyskano po odpowiednio 30 i 90 minutach (Rysunek 15, 16).

# 4.2.3.3. Wpływ obecności (5'R)-5',8-cyklo-2'-deoksyadenozyny (RcdA) w dsDNA na aktywność enzymów UDG i hAPE1 wobec 2'-deoksyurydyny

W przypadku RcdA, obydwa enzymy wykazały wyższą aktywność w porównaniu do prób kontrolnych. Ponadto, dla substratów zawierających pojedynczą cząsteczkę dU (dU(-5)RcdA oraz dU(+5)RcdA), kinetyka reakcji wyglądała inaczej niż dla substratów

zawierających ScdA. Cząsteczka uracylu w pozycji -5 była wycinana szybciej niż w pozycji +5. 50% postępu reakcji uzyskano po około 10 minutach, osiągając 97% po 35 minutach dla dU(-5)RcdA, w porównaniu z 89% po 40 minutach dla dU(+5)RcdA (Rysunek 17, 18).



**Rysunek 15.** Kinetyka reakcji 0,02 U UDG i 0,5 U hAPE1 wobec dsDNA zawierających w swojej sekwencji dU i ScdA – dU(-5)ScdA (A, B), dU(+5)ScdA (C, D), dU(-5)(+5)ScdA (E, F). (A, C, E) autoradiogramy przedstawiające 14 torów każdy, odpowiadające czasom reakcji 0, 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55 i 60 minut, począwszy od lewej strony. (B, D, F) wykresy przedstawiające spadek ilości substratu (kolor niebieski), wzrost ilości produktu (kolor pomarańczowy) oraz zawartość produktu pośredniego (kolor szary).



**Rysunek 16.** Kinetyka reakcji 0,5 U UDG i 0,02 U hAPE1 wobec dsDNA zawierających w swojej sekwencji dU i ScdA – dU(-5)ScdA (A, B), dU(+5)ScdA (C, D), dU(-5)(+5)ScdA (E, F). (A, C, E) autoradiogramy przedstawiające 13 torów każdy, odpowiadające czasom reakcji 0, 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 60, 90, 120, 150 i 180 minut, począwszy od lewej strony. (B, D, F) wykresy przedstawiające spadek ilości substratu (kolor niebieski) oraz wzrost ilości produktu (kolor pomarańczowy).

Dla cząsteczek dU znajdujących się po stronie grupy 5'-hydroksylowej od cdPus, całkowite ich wycięcie przez UDG wymagało czasu 45 minut dla ScdA oraz 35 minut dla RcdA. Jeżeli dU znajdowało się po drugiej stronie uszkodzenia, 100% wydajności reakcji obserwowałem po 40 minutach dla obu diastereoizomerów. Podobne wyniki uzyskałem dla hAPE1. Wydajność reakcji hydrolizy miejsc AP na poziomie 50% uzyskałem w krótszym czasie

dla oligonukleotydów zawierających dU(-5)RcdA niż dU(-5)ScdA (odpowiednio po upływie 10 min. oraz 30 min.). Jednakże, dla substratów zawierających dU(+5) nie stwierdziłem różnicy w szybkości reakcji (Rysunek 17, 18).



**Rysunek 17.** Kinetyka reakcji 0,02 U UDG i 0,5 U hAPE1 wobec dsDNA zawierających w swojej sekwencji dU i RcdA – dU(-5)RcdA (A, B), dU(+5)RcdA (C, D), dU(-5)(+5)RcdA (E, F). (A, C, E) autoradiogramy przedstawiające 14 torów każdy, odpowiadające czasom reakcji 0, 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55 i 60 minut, począwszy od lewej strony. (B, D, F) wykresy przedstawiające spadek ilości substratu (kolor niebieski), wzrost ilości produktu (kolor pomarańczowy) oraz zawartość produktu pośredniego (kolor szary).

Ponadto, w przypadku dU(-5)(+5)RcdA, aktywność UDG i hAPE1 była niższa niż dla dU(-5)(+5)ScdA. Jednocześnie, substrat dU(-5)(+5)RcdA był jedynym, dla którego aktywność obu enzymów była niższa niż w przypadku próby kontrolnej (dU(-5)(+5)dA) (Rysunek 17, 18).



**Rysunek 18.** Kinetyka reakcji 0,5 U UDG i 0,02 U hAPE1 wobec dsDNA zawierających w swojej sekwencji dU i RcdA – dU(-5)RcdA (A, B), dU(+5)RcdA (C, D), dU(-5)(+5)RcdA (E, F). (A, C, E) autoradiogramy przedstawiające 13 torów każdy, odpowiadające czasom reakcji 0, 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 60, 90, 120, 150 i 180 minut, począwszy od lewej strony. (B, D, F) wykresy przedstawiające spadek ilości substratu (kolor niebieski) oraz wzrost ilości produktu (kolor pomarańczowy).



**Rysunek 19.** Kinetyka reakcji 0,02 U UDG i 0,5 U hAPE1 wobec dsDNA zawierających w swojej sekwencji dU i ScdG – dU(-5)ScdG (A, B), dU(+5)ScdG (C, D), dU(-5)(+5)ScdG (E, F). (A, C, E) autoradiogramy przedstawiające 14 torów każdy, odpowiadające czasom reakcji 0, 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55 i 60 minut, począwszy od lewej strony. (B, D, F) wykresy przedstawiające spadek ilości substratu (kolor niebieski), wzrost ilości produktu (kolor pomarańczowy) oraz zawartość produktu pośredniego (kolor szary).

# 4.2.3.4. Wpływ obecności (5'S)-5',8-cyklo-2'-deoksyguanozyny (ScdG) w dsDNA na aktywność enzymów UDG i hAPE1 wobec 2'-deoksyurydyny

Dla substratów zawierających uszkodzenia w postaci dU i ScdG, aktywność UDG oraz hAPE1 była podobna jak w przypadku substratów zawierających uszkodzenia dU i *R*cdA. Cząsteczki uracylu zlokalizowane po stronie końca 5' (pozycja +5) były usuwane szybciej,

co stwierdzono również wcześniej dla substratów zawierających w swojej sekwencji cząsteczki ScdA. Poziom 50% wydajności reakcji hydrolizy osiągnięto po 10 minutach dla dU(+5)ScdG oraz po 15 minutach dla dU(-5)ScdG (Rysunek 19, 20).



**Rysunek 20.** Kinetyka reakcji 0,5 U UDG i 0,02 U hAPE1 wobec dsDNA zawierających w swojej sekwencji dU i ScdG – dU(-5)ScdG (A, B), dU(+5)ScdG (C, D), dU(-5)(+5)ScdG (E, F). (A, C, E) autoradiogramy przedstawiające 13 torów każdy, odpowiadające czasom reakcji 0, 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 60, 90, 120, 150 i 180 minut, począwszy od lewej strony. (B, D, F) wykresy przedstawiające spadek ilości substratu (kolor niebieski) oraz wzrost ilości produktu (kolor pomarańczowy).

Ponadto, szybkość postępu tej reakcji dla dU(-5)(+5)ScdG była podobna do obserwowanej dla dU(-5)(+5)ScdA, ale nie dla dU(-5)(+5)RcdA, co było szczególnie widoczne porównując wyniki

aktywności UDG. Postęp reakcji dla oligonukleotydu dU(-5)(+5)ScdG osiągnął poziom 95% po 50 minutach (aktywność UDG) oraz 99% po 90 minutach (aktywność hAPE1), w porównaniu do substratu dU(-5)(+5)RcdA (odpowiednio 76% po 55 minutach oraz 96% po 150 minutach (Rysunek 19, 20).



**Rysunek 21.** Kinetyka reakcji 0,02 U UDG i 0,5 U hAPE1 wobec dsDNA zawierających w swojej sekwencji dU i RcdG – dU(-5)RcdG (A, B), dU(+5)RcdG (C, D), dU(-5)(+5)RcdG (E, F). (A, C, E) autoradiogramy przedstawiające 14 torów każdy, odpowiadające czasom reakcji 0, 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55 i 60 minut, począwszy od lewej strony. (B, D, F) wykresy przedstawiające spadek ilości substratu (kolor niebieski), wzrost ilości produktu (kolor pomarańczowy) oraz zawartość produktu pośredniego (kolor szary).



**Rysunek 22.** Kinetyka reakcji 0,5 U UDG i 0,02 U hAPE1 wobec dsDNA zawierających w swojej sekwencji dU i ScdA – dU(-5)RcdG (A, B), dU(+5)RcdG (C, D), dU(-5)(+5)RcdG (E, F). (A, C, E) autoradiogramy przedstawiające 13 torów każdy, odpowiadające czasom reakcji 0, 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 60, 90, 120, 150 i 180 minut, począwszy od lewej strony. (B, D, F) wykresy przedstawiające spadek ilości substratu (kolor niebieski) oraz wzrost ilości produktu (kolor pomarańczowy).

# 4.2.3.5. Wpływ obecności (5'R)-5',8-cyklo-2'-deoksyguanozyny (RcdG) w dsDNA na aktywność enzymów UDG i hAPE1 wobec 2'-deoksyurydyny

Obecność uszkodzenia w postaci RcdG wpłynęła na aktywność obu enzymów w innym stopniu niż obecność RcdA. Ponadto, aktywność obu enzymów wobec substratów zawierających pojedynczą cząsteczkę dU była niższa w przypadku obecności uszkodzenia

*R*cdG niż uszkodzenia ScdG. Jedyny wyjątek stanowił substrat w postaci dU(+5)RcdG – maksymalny postęp reakcji dla UDG uzyskano po 30 minutach, w porównaniu do 35 minut dla dU(+5)ScdG. 50% aktywności UDG wobec dU(-5)ScdG i dU(+5)ScdG zaobserwowałem odpowiednio po 15 minutach i 10 minutach, w porównaniu do odpowiednio 20 minut i 10 minut reakcji dla substratów zawierających *R*cdG. Aktywność hAPE1 również była różna dla poszczególnych diastreoizomerów cdPus w niciach zawierających pojedynczą cząseczkę dU. Hydroliza miejsc AP dla dU(-5)ScdG i dU(+5)ScdG osiągnęła po 20 minutach poziom opowiednio 42% oraz 62% wydajności reakcji. W przypadku substratów dU(-5)RcdG i dU(+5)RcdG, wartości te wynosiły po 20 minutach odpowiednio 30% i 40%. Wyniki te są odwrotne do uzyskanych dla uszkodzenia cdA, gdzie aktywność obu enzymów była wyższa wobec substratów zawierających ScdA i ScdG, polegający na szybszym wycinaniu cząsteczki uracylu zlokalizowanej w kierunku końca 5' nici podlegającej naprawie (pozycja +5) został utrzymany również dla *R*cdG (Rysunek 21, 22).

## 4.2.4. Wnioski – wpływ obecności 5',8-cyklo-2'-deoksyadenozyny i 5',8-cyklo-2'deoksyguanozyny w dsDNA na aktywność glikozylazy UDG i endonukleazy hAPE1 wobec 2'-deoksyurydyny

Wyniki uzyskane w ramach pierwszej części przeprowadzonych prac badawczych pozwoliły na sformułowanie następujących wniosków. Jeżeli substrat oligonukleotydowy zawiera w swojej sekwencji jedną lub dwie cząsteczki dU, znajdujące się w pozycjach -5 oraz/lub +5 nukleotydów względem cdPus, to:

- aktywność enzymów UDG i hAPE1 wobec cząsteczek dU jest wyższa niż w przypadku substratu oligonukleotydowego niezawierającego cdPus (próba kontrolna);
- wzrost aktywności enzymów UDG i hAPE1 wobec cząsteczek dU jest wyższy jeżeli cdPus występuje w postaci izomerów 5'S-cdG i 5'R-cdA niż w przypadku 5'R-cdG i 5'ScdA;
- aktywność enzymów UDG i hAPE1 jest wyższa wobec cząsteczek dU znajdujących się w pozycji +5 nukleotydów względem cdPus, a więc bliżej końca 3' nici uszkodzonej. Obreswację tę potwierdziłem dla oligonukleotydów zawierających cdPus w postaci 5'S-

cdA, 5'S-cdG i 5'R-cdG. Wyjątkiem jest dsDNA zawierające uszkodzenie w postaci 5'RcdA – w tym przypadku aktywność enzymów UDG i hAPE1 jest wyższa względem cząsteczki dU znajdującej się bliżej kośca 5' nici uszkodzonej.

# 4.3. Wpływ obecności 5',8-cyklo-2'-deoksyguanozyny w dsDNA na aktywność glikozylaz OGG1 i FPG wobec 7,8-dihydro-8-oksoguaniny

## 4.3.1. Charakterystyka OGG1

Glikozylaza 8-oksoguaninowa 1 (OGG1) jest to glikozylaza dwufunkcyjna o aktywności liazy-AP, działająca zgodnie z mechanizmem beta eliminacji. OGG1 odpowiada usuwanie 8-oxodG i FapyG z podwójnej helisy DNA, z dalszą hydrolizą miejsca AP i wytworzeniem SSB. Enzym ten występuje u organizmów eukariotycznych. Szczegóły dotyczące dwufunkcyjnej natury OGG1 nie zostały do końca poznane. Różnica między glikozylazą monofunkcyjną i dwufunkcyjną polega wykorzystywaniu innego substratu nukleofilowego do ataku na atom węgla C1' w wiązaniu N-glikozydowym. Glikozylazy monofunkcyjne używają cząsteczek wody, a dwufunkcyjne używają reszty aminowej z miejsca aktywnego (jest to Pro1 w przypadku FPG i Lys249 w przypadku OGG1).



**Rysunek 23.** Proponowany mechanizm reakcji enzymatycznej katalizowanej przez OGG1 zgodnie z zasadą beta-eliminacji. Etap pierwszy przedstawia hyrdolizę wiązania C1'-N9 w cząsteczce 8-oxodG, katalizowanej przy udziale reszt aminokwasowych Lys249 i Asp268. Następuje otwarcie pierścienia 2'-deoksyrybozy z utworzeniem produktu pośredniego (zasady Schiffa) (etap 1). Etapy 2 i 3 przedstawiają hydrolizę wiązania fosfodiestrowego z wytworzeniem SSB zawierającego wolne końce 5'-fosforanu oraz 3'-hydroksyaldehydu. Rysunek zaadoptowałem wg. Popov A. V. 2020 [113].



**Rysunek 24.** Struktura miejsca aktywnego cząsteczki OGG1 (kolor ciemnozielony) w połączeniu z substratem w postaci dsDNA. Nić uszkodzoną zaznaczono kolorem purpurowym, nić kmplementarną zaznaczono kolorem brązowym. W centralnej części rusynku widać cząsteczkę 8-oxodG, która jest ułożona w płaszczyźnie poziomej, przez co nie widać struktury pierścienia pirymidynowego. Cząsteczka 8-oxodG jest zwrócona do wnętrza miejsca aktywnego OGG1, w przeciwieństwie do nieuszkodzonych nukleozydów sąsiednich: 2'-dA (na górze), oraz 2'-dG (na dole). Widać połączenia cząsteczki 8-oxodG z czterema resztami aminokwasowymi: Phe319, Gln315, Asp368 i Pro266. Rysunek wykonałem na podstawie pozycji w bibliotece Protein Data Bank o numerze 3IH7.

Mechanizm reakcji OGG1 wobec 8-oxodG jest następujący. Pierwszy etap obejmuje atak nukleofilowy na atom węgla C1' przez resztę Lys249, co prowadzi do rozerwania wiązania N-glikozydowego C1'-N9 i uwolnieniu 8-oxoG. Następuje otwarcie pierścienia 2'- deoksyrybozy i powstanie produktu pośredniego w postaci zasady Shiffa, stabilizowanego przez resztę Asp268. Następnie, zgodnie z mechanizmem beta-eliminacji, rozerwaniu ulega wiązanie C3'-O3' i uwolnienie reszty fosforanu znajdującej się po stronie 3' od uszkodzenia.

Powstaje miejsce AP z wolnym końcem 5'-fosforanu. Po stronie 5' od uszkodzenia pozostałości zasady Shiffa tworzą wolny koniec 3'-hydroksyaldehydowy [113], [119]. Oprócz obecności atomu O8 zamiast H8 w 8-oxodG, kluczowa dla działania enzymu jest obecność protonu zamiast wolnej pary elektronowej przy atomie azotu N7. Utworzenie wiązania wodorowego pomiędzy N7 w 8-oxodG a resztą Gly42 enzymu determinuje rozpoznanie uszkodzenia. Istnieją jednak dowody na to, że OGG1 może wykazywać aktywność opartą o mechanizmy beta i delta eliminacji, co zaobserwowałem również w trakcie prowadzonych badań. Przypuszczalnie, ze względu na nietrwałość miejsca AP i jego właściwości zależne od środowiska reakcji, możliwe jest, że mechanizm rozcinania miejsca AP przez dany enzym również zależy od środowiska reakcji i innych czynników, np. pH lub temperatury.

Informacje podstawowe														
Nazwa Glikozylaza 8-oksoguaninowa 1														
Numer EC3.2.2.23 (aktywność glikozylazy DNA)4.2.99.18 (aktywność liazy DNA)														
4.2.99.18 (aktywność liazy DNA)														
Klasa	3 – hydrolazy	,												
	4 – liazy													
Podklasa	3.2 – glikozylazy													
	4.2 – liazy węgiel-tlen													
Podpodklasa	3.2.2 – glikozylazy hydrolizujące wiązanie N-glikozydowe													
loupouklusu	4.2.99 – inne liazy węgiel-tlen													
	Inform	nacje doda	tkowe											
Organizm	Oznaczenie	Gen	Długość [aa]	Masa [Da]	Kod									
Człowiek	hOGG1-α	OGG1	354	38782	O15527-1									
(Homo sapiens)	hOGG1-β	OGG1	424	47237	015527-4									
Mysz domowa	OGG1-a	OGG1	345	38883	008760									
(Mus musculus)	$(Mus musculus) \qquad \qquad \bigcirc $													
Drożdże Saccharomyces	vOGG1	OGG1	376	42781	P53397									
cerevisiae ATCC 204508	,,	0001			1 33371									

Tabela 6. Charakterystyka OGG1.

Rysunek 23 przedstawia schemat mechanizmu reakcji hydrolizy katalizowanej przez OGG1. Rysunek 24 przedstawia strukturę chemiczną miejsca aktywnego OGG1.

Materiał badawczy został zakupiony w firmie Trevigen. Produkt komercyjny stanowiła izoforma hOGG1-α, wytworzona oraz wyizolowana metodami inżynierii genetycznej z bakterii *Escherichia coli*. Tabela 6 przedstawia najważniejsze informacje dotyczące klasyfikacji i budowy enzymu.

### 4.3.2. Charakterystyka FGP

Glikozylaza DNA formamidopirymidynowa (FPG, ang. Formamidopyrimidine-DNA glycosylase). Enzym znany również jako MutM, odkryty przez Chirtophera J. Chetsanga w 1975 roku u *Escherichia coli* jako usuwający Fapy-G z DNA i opisany w 1979 przez Chetsanga i Lindahl [120]. W 1991 roku określono, że usuwa również uszkodzenia w formie utlenionych zasad azotowych, takie jak 8-oxodG. Jest to glikozylaza dwufunkcyjna, wykazująca aktywność liazy AP (EC 4.2.99.18) i zdolna do rozcinania łańcucha DNA po obu końcach miejsca AP na zasadzie beta i delta eliminacji. Sekwencje FPG z różnych organizmów posiadają podobieństwo między sobą na poziomie maksymalnie 35%. Jedynym znanym enzymem o sekwencji podobnej do FPG jest endonukleaza VIII z *Escherichia coli* – poziom podobieństwa ich sekwencji aminokwasowej wynosi tylko 12%. FPG odpowiada za wycięcie 8-oxodG, FapyG i FapyA z dalszym rozcięciem miejsca AP i wytworzeniem SSB. Enzym ten nie występuje w komórkach ludzkich, stanowi podstawę BER u prokationtów. Chociaż w organizmach eukariotycznych odkryto homologi enzymu, nie wykazują one zauważalnej aktywności jak w przypadku OGG1.

Mechanizm reakcji FPG wobec 8-oxodG jest następujący. Pierwszy etap obejmuje atak nukleofilowy na atom węgla C1' przez resztę Pro1, co prowadzi do rozerwania wiązania Nglikozydowego C1'-N9 i uwolnieniu 8-oxodG. Następuje otwarcie pierścienia 2'deoksyrybozy i powstanie produktu pośredniego w postaci zasady Shiffa. Następnie, na drodze beta i delta eliminacji, uwolnieniu ulega produkt pośredni w postaci 4-okso-2pentanalu. Podczas tego etapu cząsteczka enzymu pozostaje połączona poprzez resztę Pro1 z atomem węgla C1' stanowiącym pozostałość 2'-deoksyrybozy. Następnie, zgodnie z mechanizmem beta-eliminacji, rozerwaniu ulega wiązanie C3'-O3' i uwolnienie reszty
fosforanu znajdującej się po stronie 3' od uszkodzenia – powstaje wolny koniec 5'fosforanu. Następnie, zgodnie z mechanizmem beta-eliminacji, rozerwaniu ulega wiązanie C5'-O5' i uwolnienie reszty fosforanu znajdującej się po stronie 5' od uszkodzenia – powstaje wolny koniec 3'-fosforanu. Przed rozpoczęciem beta- i delta-eliminacji, w interakcję z resztą 3'-fosforanu zaangażowane są reszty Lys57 i Arg259, a przypadku 5'fosforanu są to Asn169, Arg259 i Tyr242, przy czym pozycje poszczególnych aminokwasów w sekwencji cząsteczki enzymu różnią się w zależności od organizmu [119], [121], [122]. Rysunek 25 przedstawia schemat mechanizmu reakcji hydrolizy katalizowanej przez FPG. Rysunek 26 przedstawia strukturę chemiczną miejsca aktywnego FPG.



**Rysunek 25.** Proponowany mechanizm reakcji katalizowanej przez enzym FPG zgodnie z zasadą beta- (etap 6) i delta-eliminacji (etap 8). Powstanie zasady Schiffa przedstawiono w etapie 1, gdzie widoczne jest otwarcie pierścienia 2'-deoksyrybozy w cząsteczce 8-oxodG. Odłączenie wolnej cząsteczki 8-oxoG przedstawiono w etapie 4. Produkt reakcji stanowi SSB z wolnymi końcami 3'-OH i 5'-OH, powstałymi po usuięciu produktu przejściowego (zasady Schiffa) w postaci 4-okso-2-pentanalu (etap 8). Widoczne reszty aminokwasowe cząsteczki FPG, które biorą udział w katalizie reakcji: Pro1 oraz Glu2. Rysunek zaadoptowałem wg. Boiteux S. 2017 [119].



**Rysunek 26.** Struktura miejsca aktywnego cząsteczki FPG z E. coli (kolor czerwony), związanego z substratem w postaci dsDNA. Nić uszkodzoną zaznaczono kolorem jasnozielonym, fragment nici komplementarnej zaznaczono kolorem ciemnozielonym. W centralnej części rysunku zaznaczono pięciowęglowy szkielet produktu pośredniego (zasady Schiffa), stabilizowany przez reszty aminokwasowe Arg258, Tyr236, Pro1 oraz Glu2. Po prawej stronie rysunku widać struktury sąsiednich nukleozydów: 2'-dG (na górze) oraz 2'-dA (na dole). Kolorem żółtym zaznaczono atom siarki w strukturze reszty aminokwasowej Met73, niebiorącej udziału w reakcji. Rysunek wykonałem na podstawie pozycji w bibliotece Protein Data Bank o numerze 1K82.

Materiał badawczy został zakupiony w firmie New England Biolabs. Produkt komercyjny został wytworzony oraz wyizolowany metodami inżynierii genetycznej z bakterii *Escherichia coli*, u których jest kodowany przez gen *FPG*. Tabela 7 przedstawia najważniejsze informacje dotyczące klasyfikacji i budowy enzymu.

**Tabela 7.** Charakterystyka FPG.

Informacje podstawowe												
Nazwa	Glikozylaza I	ONA form	amidopirymidyn	owa								
Numer EC	3.2.2.23											
Klasa	3 – hydrolazy	– hydrolazy										
Podklasa	3.2. – glikozy	3.2. – glikozylazy										
Podpodklasa	asa 3.2.2. – glikozylazy hydrolizujące wiązanie N-glikozydowe											
	Inform	nacje dodat	tkowe									
Organizm	Oznaczenie	Gen	Długość [aa]	Masa [Da]	Kod							
Bakterie Mycobacterium	FPG1	FPG1	289	31951	P9WNC3							
tuberculosis ATCC 25618												
Bakterie	FPG	FPG	269	30290	P05523							
Escherichia coli K12			-07	00220	1 000 20							
Bakterie	FPG	FPG	276	31002	034403							
Bacillus subtilis 168	168											
Rzodkiewnik pospolity	FPG1	FPG1	390	43194	O80358-1							
(Arabidopsis thaliana) FPG2 FPG2 274 30762 080358-2												

4.3.3. Wyniki – wpływ obecności 5',8-cyklo-2'-deoksyguanozyny w dsDNA na aktywność glikozylaz OGG1 i FPG wobec 7,8-dihydro-8-oksoguaniny

W celu zbadania wpływu obecności cdPus w dsDNA na aktywność enzymów OGG1 i FPG zaprojektowano substraty w postaci dwuniciowych oligonukleotydów o długości 40 par zasad (Rysunek 27, Tabela 8).

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	
Matrix H/A	5'	G	С	С	Τ	Τ	Т	G	G	Τ	G	С	G	А	G	С	А	Τ	А	G	А	G	А	С	А	А	Τ	А	Τ	Τ	С	С	Τ	G	А	С	А	Α	G	А	G	3'
Matrix H/G	5'	G	С	С	Τ	Τ	Τ	G	G	Т	G	С	G	А	G	С	А	С	А	G	А	G	А	С	А	А	Τ	А	Τ	Τ	С	С	Τ	G	А	С	А	Α	G	А	G	3'
-6/+6(H/dA)	3'	С	G	G	А	А	А	С	С	А	С	Η	С	Τ	С	G	Т	А	Τ	С	Τ	С	Т	Η	Τ	Т	А	Τ	А	А	G	G	А	С	Τ	G	Τ	Τ	С	Τ	С	5'
-6/+6(H/ScdG)	3'	С	G	G	А	А	А	С	С	А	С	Η	С	Т	С	G	Т	SG	Т	С	Т	С	Т	Η	Τ	Т	А	Τ	А	А	G	G	А	С	Т	G	Τ	Τ	С	Т	С	5'
-6/+6(H/RcdG)	3'	С	G	G	А	А	А	С	С	А	С	Η	С	Т	С	G	Т	RG	Т	С	Т	С	Т	Η	Τ	Т	А	Т	А	А	G	G	А	С	Т	G	Τ	Τ	С	Т	С	5'

Rysunek 27. Sekwencje oligonukleotydów zaprojektowanych w celu określenia wpływu cdPus na aktywność enzymów OGG1 i FPG.

Oligonukleotyd	Wartość OD	Objętość [µl]	0,1 OD [μl]	0,2 OD [μl]
Matrix H/A	40,7	1000		4,91
Matrix H/G	32,3	1000		6,19
-6/+6(H/dA)	24,4	1000	4,10	
-6/+6(H/ScdG)	18,0	1000	5,56	
-6/+6(H/RcdG)	2,7	100	3,70	

**Tabela 8.** Charakterystyka materiału badawczego w postaci oligonukleotydów stosowanych do określenia aktywności enzymów OGG1 i FPG.

## 4.3.3.1. Wpływ obecności 5',8-cyklo-2'-deoksyguanozyny (cdG) w dsDNA na aktywność enzymu OGG1 wobec 7,8-dihydro-8-oksoguaniny

Wpływ obecności obydwu diastereoizomerów cdG (5'S oraz 5'R) w strukturze dwuniciowych oligonukleotydów na aktywność OGG1 przedstawia Rysunek 28. Oligonukleotydy zawierające uszkodzenia zespolone w postaci -6/+6(H/ScdG) lub – 6/+6(H/RcdG) inkubowano z 0.5 U enzymu przez 5 godzin w celu uzyskania całkowitej hydrolizy substratu. Dla obu diastereoizomerów cdG aktywność enzymu OGG1 była wyższa niż w przypadku prób kontrolnych. Wydajność reakcji hydrolizy na poziomie 50% została osiągnięta po 140 minutach dla uszkodzenia w postaci ScdG oraz po 110 minutach dla uszkodzenia w postaci RcdG. W przypadku prób kontrolnych taka sama wydajność tej reakcji hydrolizy uzyskana została po upływie 180 minut. Po 240 minutach wydajność tej reakcji dla substratu -6/+6(H/RcdG) wyniosła 99,63%. W przypadku próby kontrolnej wynik ten wynósł 79,24%. Oprócz wzrostu aktywności OGG1, uzyskane wyniki wskazują, że wzrost aktywności OGG1 jest bardziej znaczący w przypadku substratów zawierających uszkodzenie cdG w postaci diastereoizomeru 5'R.

# 4.3.3.2. Wpływ obecności 5',8-cyklo-2'-deoksyguanozyny (cdG) w dsDNA na aktywność enzymu FPG wobec 7,8-dihydro-8-oksoguaniny

Wpływ obecności obydwu diastereoizomerów cdG (5'S oraz 5'R) w strukturze dwuniciowych oligonukleotydów na aktywność FPG przedstawia Rysunek 29. Oligonukleotydy zawierające uszkodzenia w postaci -6/+6(H/ScdG) lub -6/+6(H/RcdG)



**Rysunek 28.** Kinetyka reakcji hydrolizy dsDNA zawierającego 8-oxodG i cdG przez 0,5 U OGG1. Badane oligonukleotydy składają się z nici matrycowej (komplementarnej) Matrix H/G oraz nici badanej (wiodącej) -6/+6(H/ScdG) (A, B) lub -6/+6(H/RcdG) (C, D). (A, C) autoradiogramy przedstawiające 7 torów każdy, które odpowiadają czasom reakcji 0, 30, 60, 120, 180, 240 i 300 minut, począwszy od lewej strony. (B, D) wykresy przedstawiające spadek ilości substratu (kolor niebieski), wzrost ilości produktu (kolor pomarańczowy) oraz zawartość produktu pośredniego (kolor szary).

inkubowano z 0.5 U enzymu przez 2 godziny w celu uzyskania całkowitej hydrolizy substratu. Uzyskane wyniki są zbliżone do wyników eksperymentu z wykorzystaniem enzymu OGG1 i wskazują na wzrost aktywności enzymu jeżeli substrat zawiera uszkodzenie, w porównaniu do prób kontrolnych. Wydajność reakcji hydrolizy na poziomie 50% została osiągnięta po około 6 minutach dla uszkodzenia w postaci ScdG oraz po około 3 minutach dla uszkodzenia w postaci *R*cdG. W przypadku prób kontrolnych, niezawierających dodatkowych uszkodzeń, ten sam poziom wydajności reakcji hydrolizy uzyskany został po upływie około 9 minut. Po 30 minutach wydajność tej reakcji dla substratu –6/+6(H/ScdG) wyniosła 96,88%, a dla substratu –6/+6(H/RcdG) wyniosła 99,13%. W przypadku próby kontrolnej wynik ten wynósł 78,07%. Różnice we wpływie

obecności poszczególnych diastereozomerów są większe jeżeli porównane zostaną wyniki uzyskane po 15 minutach czasu trwania reakcji enzymatycznej. Wówczas wydajność reakcji dla substratu zawierającego uszkodzenie w postaci *R*cdG wyniosła 97,98%, dla uszkodzenia w postaci *S*cdG wyniosła 84,08%, a dla próby kontrolnej wyniosła57,24%. Powyższe wyniki są podobne do uzyskanych z wykorzystaniem enzymu OGG1. Wskazują one na to, że obecność w nici uszkodzenia cdG w postaci diastereoizomeru 5'*R* prowadzi do silniejszego wzrostu aktywności OGG1 względem próby kontrolnej niż obecność diastereoizomeru 5'*S*.



**Rysunek 29.** Kinetyka reakcji hydrolizy dsDNA zawierającego 8-oxodG i cdG przez 0,5 U FPG. Badane oligonukleotydy składają się z nici matrycowej (komplementarnej) Matrix H/G oraz nici badanej (wiodącej) -6/+6(H/ScdG) (A, B) lub -6/+6(H/RcdG) (C, D). (A, C) autoradiogramy przedstawiające 7 torów każdy, które odpowiadają czasom reakcji 0, 30, 60, 120, 180, 240 i 300 minut, począwszy od lewej strony. (B, D) wykresy przedstawiające spadek ilości substratu (kolor niebieski), wzrost ilości produktu (kolor pomarańczowy) oraz zawartość produktu pośredniego (kolor szary).

# 4.3.4. Wnioski – wpływ obecności 5',8-cyklo-2'-deoksyguanozyny w dsDNA na aktywność glikozylaz OGG1 i FPG wobec 7,8-dihydro-8-oksoguaniny

Wyniki uzyskane w ramach drugiej części przeprowadzonych prac badawczych pozwoliły na sformułowanie następujących wniosków. Jeżeli substrat oligonukleotydowy zawiera w swojej sekwencji dwie cząsteczki 8-oxodG znajdujące się w pozycjach -6 oraz +6 nukleotydów względem cdG, to:

- aktywność enzymów OGG1 i FPG wobec cząsteczek 8-oxodG jest wyższa niż w przypadku substratu oligonukleotydowego niezawierającego cdG (próba kontrolna);
- aktywność enzymów OGG1 i FPG wobec cząsteczek 8-oxodG wzrasta względem próby kontrolnej, przy czym w przypadku substratu zwierającego diastereoizomer 5'ScdG ten wzrost jest większy niż w przypadku substratu zawierającego diastereoizomer 5'R-cdG;
- aktywność enzymów OGG1 i FPG jest wyższa wobec cząsteczki 8-oxodG znajdującej się w pozycji +6 nukleotydów względem cdG, bliżej końca 5' nici uszkodzonej.

# 4.4. Wpływ obecności 5',8-cyklo-2'-deoksyadenozyny i 5',8-cyklo-2'deoksyguanozyny w dsDNA na aktywność endonukleaz restrykcyjnych SspI i BsmAI

### 4.4.1. Charakterystyka endonukleazy restrykcyjnej SspI

Deoksyrybonukleaza specyficzna typu II, enzym restrykcyjny typu II (ang. *type II site-specific deoxyribonuclease*). Pierwotnie został wyizolowany z gatunku bakterii *Sphaerotilus species* ATCC 13925, jest kodowany przez gen *SspI*, posiada sekwencję o długości 281 aminokwasów oraz masę cząsteczkową 32168 Da [A; B]. Materiał badawczy został zakupiony w firmie New England Biolabs. Produkt komercyjny stanowił enzym wytworzony oraz wyizolowany metodami inżynierii genetycznej z *Escherichia coli*. Według bazy UniProt, wersja enzymu pochodząca z *Stenotrophomonas sp.* posiada sekwencję o długość 330 aminokwasów oraz masę cząsteczkową wynoszącą 36399 Da (kod: A0A3Q8FDJ8) [C]. W literaturze nie są dostępne szczegółowe informacje charakteryzujące strukturę chemiczną oraz mechanizmy działania bakteryjnych endonukleaz restrykcyjnych. We wszystkich przeanalizowanych przeze mnie publikacjach

naukowych enzym SspI jest opisywany jako narzędzie stosowane w pracach badawczych z zakresu biologii molekularnej i służy do hydrolizy cząsteczek kwasów nukleinowych [123]–[127]. Według oficjalnej bazy REBASE (ang. *Restriction Enzyme Database*), wszystkie bakteryjne endonukleazy restrykcyjne posiadają przydzielony ten sam numer klasyfikacji enzymatycznej – EC 3.1.21.4 [128].

SspI należy do grupy endonukleaz restrykcyjnych typu IIP. Rozpoznają one krótkie sekwencje palindromowe (stąd typ "P"). Są to takie fragmenty DNA, w których sekwencje obu nici są identyczne, przy założeniu odczytu obu przeciwbieżnych łańcuchów DNA w jednakowym kierunku [129]. Miejsce cięcia dwuniciowego DNA przez enzym SspI znajduje się w obrębie zdefiniowanej sekwencji zasad azotowych, a hydroliza enzymatyczna kończy się wytworzeniem "tępych końców". Oznacza to, że hydrolizowane wązania fosfodiestrowe w obu niciach dsDNA znajdują się dokładnie naprzeciwko siebie (Rysunek 30).



**Rysunek 30.** Schematyczne przedstawienie sekwencji rozpoznawanych przez enzymy SspI (kolor zielony) i BsmAI (kolor niebieski). Strzałki wskazują miajsca hydrolizy wiązań fosfodiestrowych. Litera "N" oznacza dowolny nukleotyd.

#### 4.4.2. Charakterystyka endonukleazy restrykcyjnej BsmAI

Deoksyrybonukleaza specyficzna typu II, enzym restrykcyjny typu II (ang. *type II site-specific deoxyribonuclease*). Pierwotnie został wyizolowany z gatunku bakterii *Geobacillus stearothermophilus* A664, jest kodowany przez gen *BsmAI*, posiada sekwencję o długości 465 aminokwasów oraz masę cząsteczkową 54697 Da (UniProt, kod: Q6UQ64) [D] lub 54694 Da [E; F]. Materiał badawczy został zakupiony w firmie New England Biolabs. Produkt komercyjny stanowił enzym wytworzony oraz wyizolowany metodami inżynierii genetycznej z bakterii *Escherichia coli*. Podobnie jak w przypadku enzymu SspI, w literaturze nie są dostępne szczegółowe informacje charakteryzujące strukturę chemiczną oraz mechanizmu działania enzymu BsmAI. Służy on do hydrolizy oligonukleotydów

w ramach prac badawczych z zakresu biologii molekularnej i posiada przypisany numer klasyfikacji enzymatycznej EC 3.1.21.4 [128], [130].

BsmAI należy do grupy endonukleaz restrykcyjnych typu IIS. Hydrolizują one wiązanie fosfodiestrowe przynajmniej jednej nici DNA poza obrębem rozpoznawanej sekwencji [129], [131]. W przypadku BsmAI, dotyczy to obu łańcuchów dsDNA. Hydroliza nici wiodącej odbywa się w odległości +1 w kierunku końca 3', a nici komplementarnej w odległości +5 w kierunku końca 5', w odniesieniu do rozpoznawanej sekwencji [132]. W efekcie, reakcja kończy się wytworzeniem "lepkich końców" (Rysunek 30).

4.4.3. Wyniki – wpływ obecności 5',8-cyklo-2'-deoksyadenozyny i 5',8-cyklo-2'deoksyguanozyny w dsDNA na aktywność endonukleaz restrykcyjnych SspI i BsmAI

Trzecim etapem części doświadczalnej niniejszej pracy było zbadanie wpływu obecności jednoniciowych oraz dwuniciowych uszkodzeń zespolonych na aktywność endonukleaz restrykcyjnych BsmAI i SspI. Znakowane izotopowo dwuniociowe oligonukleotydy (dupleksy, fragmenty dsDNA), które wytypowano do eksperymentów w tej części, zawierały sekwencje rozpoznawane przez oba enzymy. Pomimo tego, ze względu na różne wartości temperatur inkubacji (37°C dla SspI oraz 55°C dla BsmAI), reakcje były prowadzone z każdym enzymem oddzielnie. Jednocześnie wyeliminowałem dzięki temu ewentualny wpływ dodatkowego składnika mieszanin reakcyjnych (drugiego enzymu) na wyniki doświadczeń. Szczegółowe informacje zaplanowanych dotyczące zaprojektowanych oligonukleotydów, wraz z zaznaczonymi sekwencjami rozpoznawanymi przez poszczególne enzymy, znajdują się poniżej (Rysunek 31, Tabela 9).

Dwuniciowe fragmenty oligonukleotydowe zaprojektowano w taki sposób, aby możliwa była ocena wpływu odległości uszkodzenia od miejsca restrykcyjnego danego enzymu na jego aktywność. Każde dsDNA poddawałem badaniu dwukrotnie, za każdym razem znakując izotopowo inną nić. Dzięki temu możliwa była obserwacja wyników reakcji enzymatycznej wobec każdej nici, nawet takiej, która nie posiadała uszkodzenia w swojej sekwencji. Badaniu poddałem 15 dwuniciowych fragmentów oligonukleotydowych, które oznaczonyłem literami od A do O. Następnie, nici wchodzące w skład kolejnych dsDNA oznaczyłem liczbami od 1 do 30. Nici, których sekwencje na Rysunku 31 rozpoczynają się od końca 5' otrzymały numery nieparzyste i na potrzeby niniejszej pracy są opisywane jako

"nici wiodące". Nici komplementarne do nich otrzymały numery parzyste i na potrzeby niniejszej pracy są opisywane jako "nici komplementarne". Na przykład, dsDNA A ze znakowaną nicią wiodącą posiada numer 1, a ten sam fragment dsDNA A ze znakowaną nicią komplementarną posiada numer 2 (Rysunek 31). Dupleks A stanowił próbę kontrolną dla wszystkich eksperymentów przeprowadzonych w tej części i nie posiadał on żadnych uszkodzeń w obrębie sekwencji obu nici (1 i 2).

Efektem przeprowadzonych reakcji enzymatycznych były prążki widoczne na kliszach rentgenowskich, utrwalone metodą autoradiografii. Prążki stanowiły wynik elektroforezy PAGE w denaturującym żelu poliakrylamidowym o stężeniu 15% lub 20%. Długość sekwencji oligonukleotydowych, uwidocznionych w formie prążków, zależała od rodzaju użytego enzymu. W przypadku SspI, z dwuniciowych substratów o długości 40 nukleotydów, uzyskiwałem jednoniciowe produkty o długości 14 oraz 26 nukleotydów. W przypadku enzymu BsmAI, produkty posiadały długość 13 lub 23 nukleotydów. Po zakończeniu każdego eksperymentu, na kliszy rentgenowskiej widoczne były prążki odpowiadające fragmentom oligonukleotydowym o dwóch długościach: substratowi o długości 40 nukleotydów oraz jednemu z produktów reakcji enzymatycznych. Jeżeli w dsDNA znakowana była nić wiodaca, widoczny był produkt o długości 14 (dla SspI) lub 23 (dla BsmAI) nukleotydów. Jeżeli w dsDNA znakowana była nić komplementarna, widoczny był produkt o długości 26 (dla SspI) lub 13 (dla BsmAI) nukleotydów. W przypadku prób kontrolnych z dsDNA A, postęp reakcji enzymatycznych dla BsmAI wyniósł 99% (nić 1) i 98% (nić 2) po 60 minutach, a dla SspI wyniósł 86% (nić 1) i 82% (nić 2) po 60 minutach.

			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	1
Δ	1	5'	С	Τ	С	Т	Τ	G	Τ	С	А	G	G	Α	А	Τ	А	Τ	Τ	G	Τ	С	Τ	С	Τ	А	Τ	G	С	Τ	С	С	С	А	С	С	А	А	А	G	G	С	3'
L_	2	3'	G	А	G	А	А	С	А	G	Т	С	С	Т	Т	А	Т	А	А	С	А	G	Α	G	A	Τ	A	С	G	А	G	G	G	Т	G	G	Т	Т	Т	С	С	G	5'
P	3	5'	С	Т	С	Т	Т	G	Т	С	А	G	G	Α	А	Τ	SA	Τ	Τ	G	Τ	С	Τ	С	Τ	А	Τ	G	С	Т	С	С	С	А	С	С	А	А	А	G	G	С	3'
	4	3'	G	А	G	А	А	С	А	G	Т	С	С	Τ	Т	А	Т	Α	А	С	А	G	А	G	A	Τ	A	С	G	А	G	G	G	Т	G	G	Т	Т	Т	С	С	G	5'
C	5	5'	С	Т	С	Т	Т	G	Т	С	А	G	G	А	А	Т	RA	Т	Τ	G	Τ	С	Τ	С	Τ	А	Τ	G	С	Т	С	С	С	А	С	С	А	А	А	G	G	С	3'
Ľ	6	3'	G	А	G	А	А	С	А	G	Τ	С	С	Τ	Τ	А	Т	Α	Α	С	А	G	Α	G	A	Τ	A	С	G	А	G	G	G	Τ	G	G	Τ	Τ	Т	С	С	G	5'
Б	7	5'	С	Т	С	Т	Т	G	Т	С	А	G	G	Α	Α	Τ	А	Τ	Τ	G	Τ	С	Τ	С	Τ	SA	Τ	G	С	Т	С	С	С	А	С	С	А	А	А	G	G	С	3'
Ľ	8	3'	G	А	G	А	А	С	А	G	Τ	С	С	Τ	Τ	А	Т	Α	Α	С	Α	G	Α	G	A	Τ	A	С	G	А	G	G	G	Т	G	G	Τ	Τ	Τ	С	С	G	5'
F	9	5'	С	Т	С	Т	Т	G	Т	С	А	G	G	Α	А	Τ	А	Τ	Τ	G	Τ	С	Τ	С	Τ	RA	Τ	G	С	Т	С	С	С	А	С	С	А	А	А	G	G	С	3'
Ľ	10	3'	G	А	G	А	А	С	А	G	Τ	С	С	Τ	Τ	А	Т	А	Α	С	А	G	Α	G	A	Τ	А	С	G	А	G	G	G	Τ	G	G	Τ	Τ	Τ	С	С	G	5'
F	11	5'	С	Т	С	Т	Т	G	Т	С	А	G	G	Α	А	Т	А	Т	Τ	G	Τ	С	Τ	С	Τ	А	Τ	G	С	Т	С	С	С	А	С	С	А	А	А	G	G	С	3'
1	12	3'	G	А	G	А	А	С	А	G	Τ	С	С	Τ	Τ	SA	Т	Α	А	С	А	G	Α	G	Α	Τ	A	С	G	А	G	G	G	Τ	G	G	Τ	Τ	Τ	С	С	G	5'
G	13	5'	С	Т	С	Т	Т	G	Т	С	А	G	G	А	А	Τ	А	Τ	Τ	G	Τ	С	Τ	С	Τ	А	Т	G	С	Т	С	С	С	А	С	С	А	А	А	G	G	С	3'
Ľ	14	3'	G	А	G	А	А	С	А	G	Т	С	С	Т	Т	RA	Т	А	А	С	А	G	А	G	A	Τ	A	С	G	А	G	G	G	Т	G	G	Т	Т	Т	С	С	G	5'
ш	15	5'	С	Т	С	Т	Т	G	Т	С	А	G	G	Α	Α	Τ	Α	Τ	Τ	G	Τ	С	Τ	С	Τ	А	Τ	G	С	Т	С	С	С	А	С	С	А	А	А	G	G	С	3'
	16	3'	G	А	G	А	А	С	А	G	Τ	С	С	Τ	Τ	А	Т	А	Α	С	А	G	Α	G	SA	Τ	А	С	G	А	G	G	G	Τ	G	G	Τ	Τ	Τ	С	С	G	5'
T	17	5'	С	Т	С	Т	Т	G	Т	С	А	G	G	Α	Α	Τ	А	Τ	Τ	G	Τ	С	Τ	С	Т	А	Т	G	С	Т	С	С	С	А	С	С	А	А	А	G	G	С	3'
L_	18	3'	G	А	G	А	А	С	А	G	Τ	С	С	Τ	Τ	А	Т	Α	Α	С	Α	G	Α	G	RA	Τ	A	С	G	А	G	G	G	Τ	G	G	Τ	Τ	Τ	С	С	G	5'
т	19	5'	С	Т	С	Т	Т	G	Т	С	А	G	G	А	А	Т	А	Т	Т	G	Τ	С	Τ	С	Т	А	Т	G	С	Т	С	С	С	А	С	С	А	А	А	G	G	С	3'
Ľ	20	3'	G	А	G	А	А	С	А	G	Т	С	С	Т	Т	А	Т	Α	А	С	Α	G	Α	G	A	Т	A	С	SG	А	G	G	G	Т	G	G	Τ	Τ	Τ	С	С	G	5'
K	21	5'	С	Т	С	Т	Т	G	Т	С	А	G	G	А	А	Т	А	Т	Τ	G	Τ	С	Τ	С	Т	А	Τ	G	С	Т	С	С	С	А	С	С	А	А	А	G	G	С	3'
	22	3'	G	А	G	А	A	С	А	G	Τ	С	С	Τ	Τ	А	Τ	А	А	С	А	G	А	G	A	Т	A	С	RG	А	G	G	G	Т	G	G	Т	Т	Τ	С	С	G	5'
T	23	5'	С	Т	С	Т	Т	G	Т	С	А	G	G	А	SA	Т	А	Т	Т	G	Т	С	Т	С	Т	А	Т	G	С	Т	С	С	С	А	С	С	А	А	А	G	G	С	3'
_	24	3'	G	А	G	А	A	С	А	G	Τ	С	С	Τ	Τ	А	Τ	Α	Α	С	А	G	А	SG	A	Т	A	С	G	А	G	G	G	Τ	G	G	Τ	Τ	Τ	С	С	G	5'
M	25	5'	С	Т	С	Т	Т	G	Т	С	А	G	G	Α	RA	Τ	А	Т	Т	G	Τ	С	Τ	С	Т	А	Τ	G	С	Т	С	С	С	А	С	С	А	А	А	G	G	С	3'
	26	3'	G	А	G	Α	A	С	А	G	Τ	С	С	Τ	Τ	А	Τ	Α	Α	С	А	G	А	RG	A	Т	A	С	G	Α	G	G	G	Τ	G	G	Τ	Τ	Τ	С	С	G	5'
N	27	5'	С	Т	С	Т	Т	G	Т	С	А	G	G	Α	RA	Τ	Α	Т	Τ	G	Τ	С	Τ	С	Т	Α	Τ	G	С	Т	С	С	С	Α	С	С	А	Α	А	G	G	С	3'
Ľ	28	3'	G	Α	G	Α	Α	С	А	G	Τ	С	С	Τ	Τ	Α	Τ	Α	Α	С	Α	G	Α	SG	A	Т	Α	С	G	Α	G	G	G	Т	G	G	Τ	Τ	Т	С	С	G	5'
0	29	5'	С	Т	С	Т	Т	G	Т	С	А	G	G	Α	SA	Τ	Α	Т	Т	G	Τ	С	Τ	С	Т	Α	Τ	G	С	Т	С	С	С	А	С	С	А	А	А	G	G	С	3'
ľ	30	3'	G	А	G	А	А	С	А	G	Τ	С	С	Τ	Τ	А	Τ	Α	Α	С	Α	G	Α	RG	Α	Τ	Α	С	G	А	G	G	G	Τ	G	G	Τ	Τ	Τ	С	С	G	5'

**Rysunek 31.** Sekwencje oligonukleotydów zaprojektowanych w celu określenia wpływu cdPus na aktywność enzymów restrykcyjnych. Pogrubione linie symbolizują miejsca cięcia oligonukleotydów przez enzymy, zaznaczono również sekwencje rozpoznawane przez SspI (kolor zielony) i BsmAI (kolor niebieski). Litery od A do O oznaczają kolejne dwuniciowe fragmenty oligonukleotydowe (dsDNA), liczby od 1 do 30 oznaczają kolejne pojedyńcze nici, które wchodzą w skład zaprojektowanych dsDNA. Kolorem czerwonym zaznaczone są uszkodzenia DNA w formie cdPus.

Oligonukleotyd	Wartość OD	Objętość [µl]	0,1 OD [μl]	0,12 OD [μl]
1	40,8	1103	2,70	3,24
2	42,0	1049	2,50	3,00
3	18,7	1000	5,35	6,42
4	42,0	1049	2,50	3,00
5	0,47	4,5	0,96	1,15
6	42,0	1049	2,50	3,00
7	21,0	1000	4,76	5,17
8	42,0	1049	2,50	3,00
9	0,33	3,4	1,03	1,24
10	42,0	1049	2,50	3,00
11	40,8	1103	2,70	3,24
12	25,4	1000	3,94	4,72
13	40,8	1103	2,70	3,24
14	0,35	3,5	1,00	1,20
15	40,8	1103	2,70	3,24
16	27,2	1000	3,68	4,41
17	40,8	1103	2,70	3,24
18	0,36	3,6	1,00	1,20
19	40,8	1103	2,70	3,24
20	16,5	549,5	3,33	4,00
21	40,8	1103	2,70	3,24
22	0,8	26,6	3,33	4,00
23	20,0	1000	5,00	6,00
24	16,2	1000	6,17	7,41
25	26,2	241	0,92	1,10
26	0,8	13,4	1,67	2,00
27	26,2	241	0,92	1,10
28	16,2	1000	6,17	7,41
29	20,0	1000	5,00	6,00
30	0,8	13,4	1,67	2,00

**Tabela 9.** Charakterystyka materiału badawczego w postaci oligonukleotydów stosowanych do określenia aktywności enzymów SspI i BsmAI.

## 4.4.3.1. Wpływ obecności 5'R i 5'S cyklodeoksypuryn w dsDNA na aktywność endonykleazy restrykcyjnej SspI

Ze względu na fakt, że miejsce hydrolizy zaprojektowanych fragmentów dsDNA przez SspI znajduje się w obrębie sekwencji rozpoznawanej przez enzym, dsDNA podzielono na te posiadające uszkodzenie w obrębie lub poza obrębem rozpoznawanej sekwencji. W pierwszej grupie znalazły się dsDNA B, C, F, G, L, M, N, O (Rysunek 31). W tych dsDNA uszkodzenie znajdowało się w następujących pozycjach względem miejsca cięcia: +1 w kierunku końca 3' na nici wiodącej (nici 3 i 5), -1 w kierunku końca 3' na nici komplementarnej (nici 12 i 14) oraz -2 w kierunku końca 5' na nici wiodądej (nici 23, 25, 27 i 29) (Rysunek 31). Dla wszystkich tych substratów zaobserwowano wyniki w postaci pojedynczych prążków na kliszach, które odpowiadały jednonciowym znakowanym substratom o długości 40 nukleotydów. Świadczy to o braku hydrolizy dsDNA przez enzym, a więc o jego inhibicji jeżeli badane uszkodzenie w postaci cdPus znajduje się w obrębie rozpoznawanej sekwencji (Rysunek 31).

Zbadałem również wpływ uszkodzeń znajdujących się poza obrębem rozpoznawanej sekwencji na aktywność enzymu. W tej grupie znalazły się dsDNA D, E, H, I, J, K (Rysunek 31). W tych dsDNA uszkodzenie znajdowało się w następujących pozycjach względem miejsca cięcia: +10 w kierunku końca 3' na nici wiodącej (nici 7 i 9), +9 w kierunku końca 5' na nici komplementarnej (nici 16 i 18) oraz +13 w kierunku końca 5' na nici komplementarnej (nici 20 i 22) (Rysunek 31). Dla wszystkich tych substratów zaobserwowano hydrolizę dsDNA, a aktywność enzymu była wyższa niż w przypadku próby kontrolnej (dsDNA A). Postęp reakcji enzymatycznej na poziomie 50% zaobserwowałem po około 20-30 minutach dla nici o numerach 7-10 oraz po około 30-35 minutach dla próby kontrolnej. Wyniki doświadczenia wskazują ponadto na brak wpływu rodzaju diastereoizomeru cdPus na aktywność enzymu SspI. Porównując między sobą wyniki uzyskane dla dsDNA D i H (zawierających uszkodzenie w postaci 5'S-cdA) oraz E i I (zawierających uszkodzenie w postaci 5'*R*-cdA), nie zauważyłem widocznych różnic. Postęp reakcji po upływie 60 minut wynosił 89-99% dla nici o numerach 7-10 oraz od 78-86% dla nici o numerach 15-18. Jedynym wyjątkiem był wynik uzyskany dla dsDNA K, w przypadku którego uszkodzenie dsDNA w postaci 5'R-cdG na nici komplementarnej (nić 22) spowodowało obniżenie aktywności enzymu. Wynik był o 38% niższy niż w przypadku dsDNA J zawierającego w analogicznej pozycji uszkodzenie w postaci 5'S-cdG (nić 20) (Rysunek 32).

Ponadto zbadałem wpływ zmiany pozycji uszkodzenia w oligonukleotydach na aktywność enzymu. Badane fragmenty dsDNA zawierające ScdA lub RcdA w pozycji 24 nici wiodącej (nici 7-10) uległy hydrolizie z maksymalną wydajnością 89-96% w porównaniu do 82-86% dla kontroli. Jednakże dla dsDNA zawierających ScdA/RcdA w pozycji 23 nici komplementarnej (nici 15-18) lub zawierających ScdG/RcdG w pozycji 27 nici komplementacnej (nici 19-22) aktywność enzymu była niższa niż w przypadku próby kontrolnej i wynosiła odpowiednio 78-86% oraz 46-84%. Uszkodzenie RcdG znajdujące się w pozycji +10 w kierunku końca 5' od sekwencji rozpoznawanej przez enzym obniżyło wydajność reakcji do 68% dla nici 21 oraz do 46% dla nici 22 (Rysunek 32).



**Rysunek 32.** Kinetyka reakcji hydrolizy dsDNA przez 1,5 U SspI. Substraty zawierają cdPus poza obrębem sekwencji rozpoznawanej przez enzym. (A) dsDNA zawierające cdA na nici wiodącej (7-10). (B) dsDNA zawierające cdA na nici komplementarnej (15-18). (C) dsDNA zawierające cdG na nici komplementarnej (19-22). (D) Przykładowy autoradiogram przedstawiający wynik reakcji dsDNA zawierającego znakowaną nić 8, która nie zawiera uszkodzenia w swojej sekwencji. Nić 8 jest komplementarna do nici 7, która zawiera ScdA w swojej sekwencji i razem tworzą dsDNA D.

# 4.4.3.2. Wpływ obecności 5'R-cdA i 5'S-cdA w dsDNA na aktywność endonukleazy restrykcyjnej BsmAI

Badając wpływ cdPus na aktywność BsmAI wziąłem pod uwagę fakt, że miejsce hydrolizy ds-DNA przez enzym znajduje się poza obrębem sekwencji rozpoznawanej przez enzym, a także fakt, że hydroliza obu nici odbywa się w innym miejscu. W przypadku dsDNA zawierających uszkodzenia w postaci diastereoizomerów cdA poza obrębem sekwencji rozpoznawanej oraz poza miejscem hydrolizy substratu, aktywność enzymu była zbliżona do wyników uzyskanych dla próby kontrolnej (50% produktu uzyskane w czasie poniżej 15 minut dla nici 3-6 i 11-14 oraz dla dsDNA A). Wyniki te były podobne dla ScdA i *R*cdA, co świadczy o tym, że cdA – bez względu na rodzaj izomeru – oddalone od sekwencji rozpoznawanej o 3-4 pary zasad nie wpływa na aktywność enzymu (Rysunek 33).

W przypadku uszkodzeń przylegających do miejsca hydrolizy dsDNA przez enzym (nici 7-10) zauważyłem znaczną inhibicję enzymu. W przypadku uszkodzenia w postaci ScdA doszło do całkowitej inhibicji enzymu (nici 7-8), a w przypadku RcdA aktywność enzymu spadła do poziomu 45% (nici 9-10). Przesunięcie uszkodzenia cdA o 1 parę zasad i przeniesienie go na nić komplementarną zniosło inhibicję enzymu (nici 15-18). Jednakże, w tym przypadku nici komplementarne zawierające uszkodzenie (nici 16 i 18) były hydrolizowane wolniej niż nici wiodące, które tego uszkodzenia nie zawierały (nici 15 i 17). Świadczy to zmianie struktury przestrzennej podwójnej helisy DNA, która jest wywołana przez uszkodzenie i jest na tyle niewielka, że nie doprowadza do całkowitej inhibicji enzymu. Prawdopodobne jest jednak, że modyfikacja ta zaburza proces przyłączania się enzymu do substratu obniżając jego aktywność. Dodatkowo, nić zawierająca uszkodzenie w postaci RcdA (nić 18) była hydrolizowana szybciej niż nić zawierająca uszkodzenie w postaci ScdA (nić 16). Maksymalna wydajność reakcji wyniosła 74% i została osiągnięta po 30 minutach dla nici 18 oraz po 45 minutach dla nici 16 (Rysunek 33). Potwierdza to mniejszy wpływ diastereoizomeru 5'R a aktywność enzymu, uzyskany dla substratów D i E.



**Rysunek 33.** Kinetyka reakcji hydrolizy dsDNA zawierającego ScdA i RcdA przez 0,5 U BsmAI. (A) Trawienie nici 3-6, które tworzą dupleksy B i C, zawierające cdA w obrębie sekwencji rozpoznawanej przez SspI. (B) Trawienie nici 7-18, które tworzą dupleksy D, E, H oraz I, zawierające cdA w obrębie miejsca cięcia dsDNA przez BsmAI.

# 4.4.3.3. Wpływ obecności 5'R-cdG i 5'S-cdG w dsDNA na aktywność endonukleazy restrykcyjnej BsmAI

Oligonukleotydy zaprojektowane do badania aktywności enzymów restrykcyjnych nie posiadały w swojej strukturze uszkodzeń w postaci izomerów cdG w obrębie sekwencji istotnych dla funkcjonowania enzym SspI. Powodem jest bardzo trudna i czasochłonna synteza oligonukleotygów zawierających takie uszkodzenia. Dlatego też wpływ obecności cdG w DNA na aktywność endonukleaz restrykcyjnych zbadano tylko przy użyciu enzymu BsmAI. W doświadczeniu zastosowano fragmenty dsDNA oznaczone jako J, K, L, M, N oraz O (Rysunek 31).



**Rysunek 34.** Kinetyka reakcji hydrolizy dsDNA zawierającego ScdG i RcdG przez 0,5 U BsmAI. (A) Trawienie nici 19-22, które tworzą dupleksy J i K, zawierające cdG w obrębie miejsca cięcia dsDNA przez BsmAI. (B) Trawienie nici 23-30, które tworzą dupleksy L-O, zawierające cdPus w obu niciach, w obrębie sekwencji rozpoznawanych przez oba enzymy.

Substraty J oraz K zawierały uszkodzenie cdG w bezpośrednim sąsiedztwie miejsca hydrolizy substratu przez enzym. W tym przypadku, obecność diastereoizomeru 5'S skutkowała bardziej zauważalną inhibicją enzymu, potwierdzając wcześniejsze wyniki uzyskane dla dsDNA zawierających uszkodzenia w postaci cdA. Pomimo tego, że dla nici wiodących (nieuszkodzonych) trend jest odwrotny (wyższa aktywność enzymu wobec nici 19 niż 21), to w przypadku nici komplementarnych, nić zawierająca uszkodzenie ScdG (nić 20) nie uległa hydrolizie. W przypadku nici zawierającej uszkodzenie w postaci *R*cdG (nić 22) hydroliza była widoczna. Obie nici dsDNA K (nici 21 i 22) uległy hydrolizie w podobnym tempie, chociaż o 76% wolniej niż w przypadku kontroli. Zdolność enzymu

do hydrolizy nici natywnej dsDNA J (nić 19) może wynikać z dużej odległości (5 nukleotydów) pomiędzy uszkodzeniem zawartym w nici, a sekwencją rozpoznawaną przez enzym. W przypadku dsDNA D zawierającego ScdA, ta odległość była mniejsza (2 nukleotydy) i enzym pozostał nieaktywny (Rysunek 34).

W przypadku dwuniciowych oligonukleotydów zawierających uszkodzenia w obu niciach, obecność ScdG i RcdG powodowała niższą zdolność do inhibicji enzymu BsmAI gdy znajdowały się w obrębie rozpoznawanej sekwencji (20-28% aktywności enzymu dla nici 24, 26, 28 i 30) niż w pobliżu miejsca hydrolizy (5-22% aktywności enzymu dla nici 20 i 22). Biorąc pod uwagę, że dsDNA J i K nie posiadały dodatkowego uszkodzenia w obrębie sekwencji dsDNA rozpoznawanej przez enzym, można wywnioskować, że istnienie takich dodatkowych uszkodzeń w dsDNA L-O nie miało wpływu na aktywność BsmAI. Ponadto, najwyższa obliczona róznica aktywności enzymu wobec nici 24, 26, 28 i 30 wyniosła 8% po 60 minutach reakcji. Tak niska wartość wskazuje na niewielki wpływu formy diastereoizomerycznej uszkodzenia znajdującego się w obrębie rozpoznawanej sekwencji na aktywność enzymu (Rysunek 34).

4.4.4. Wnioski – wpływ obecności 5',8-cyklo-2'-deoksyadenozyny i 5',8-cyklo-2'deoksyguanozyny w dsDNA na aktywność endonukleaz restrykcyjnych SspI i BsmAI
Wyniki uzyskane w ramach trzeciej części przeprowadzonych prac badawczych pozwoliły na sformułowanie następujących wniosków:

- aktywność enzymu SspI wobec dsDNA jest całkowicie hamowana jeżeli uszkodzenia cdPus znajdują się w obrębie sekwencji olgonukleotydowej rozpoznawanej przez ten enzym;
- inhibicja aktywności enzymu SspI przez uszkodzenia cdPus znajdujące się poza obrębem sekwencji nukleotydowej rozpoznawanej przez ten enzym jest odwrotnie proporcjonalna do dystansu pomiędzy uszkodzeniem a rozpoznawaną sekwencją;
- jeżeli uszkodzenie w postaci cdPus znajduje się poza obrębem rozpoznawanej sekwencji nukleotydowej oraz poza miejscem hydrolizy dsDNA przez enzym BsmAI, to jego inhibicja jest niewielka i nie zależy od rodzaju izomeru cdA lub cdG;
- jeżeli uszkodzenie w postaci cdA znajduje się w odległości +1 nukleotydu od miejsca hydrolizy dsDNA przez enzym BsmAI, aktywność enzymu jest hamowana, przy czym

w przypadku obecności diastereoizomeru 5'*R* inhibicja zachodzi w większym stopniu niż w przypadku obecności diastereoizomeru 5'*S*;

- obecność cdG w pobliżu miejsca hydrolizy dsDNA przez enzym BsmAI obniża jego aktywność w większym stopniu niż obecność cdA, przy czym obserwacja ta jest prawdziwa bez względu na formy diastereoizomeryczne badanych cdPus;
- inhibicja enzymu BsmAI przez cdG zachodzi w mniejszym stopniu jeżeli uszkodzenie znajduje się w obrębie sekwencji nukleotydowej rozpoznawanej przez enzym, niż jeżeli znajduje sę w odległości +1 nukleotydu do miejsca hydrolizy dsDNA przez ten enzym.

#### 4.5. Podsumowanie wyników

Prezentowana praca jest kontynuacją badań dotyczących wpływu cdPus na inicjację szlaku naprawy BER, w których wykazano wpływ obu diastereoizomerów cdA na wycinanie cząsteczek dU przez UDG i hAPE1 [13]. Do tej pory oba diastereoizomery cdG nie stanowiły podstawy badań ze względu ich trudny i czasochłonny proces syntezy oraz niską wydajność procesu włączania we fragmenty DNA. Jest to szczególnie widoczne w przypadku diastereoizomeru 5'*R*-cdG [133].

Na podstawie uzyskanych wyników badań prowadzonych w ramach rozprawy doktorskiej można stwierdzić, że aktywność enzumów szlaku BER (UDG, hAPE1, OGG1 i FPG) wobec substratów oligonukleotydowych zawierających cdPus była wyższa niż w przypadku prób kontrolnych, w których substraty nie zawierały cdPus. Wzrost aktywności enzymu wobec substratu zawierającego uszkodzenie można wyjaśnić w następujący sposób. Odległość 5 lub 6 par zasad pomiędzy cdPus a dU/8-oxodG może zapobiegać wystąpieniu interakcji pomiędzy cząsteczką enzymu a cdPus. Dodatkowo, zniekształcenie struktury przestrzennej podwójnej helisy DNA w miejscu występowania cdPus może być kompensowane przez strukturę przestrzenną dalszych fragmentów nici. W innych pracach badawczych wykazano, że bezpośrednia interakcja enzymu z cdPus obniża jego aktywność, ale efekt ten ulega "wygaszeniu" jeżeli odległość pomiędzy cząsteczką enzymu a cdPus wzrasta do 7 i więcej par zasad [12], [13]. Dzięki temu, jeżeli odległość pomiędzy naprawianym uszkodzeniem dU/8-oxodG a cdPus jest wystarczająco duża, dostęp enzymu do substratu może być ułatwiony.

W przypadku substratów oligonukleotydowych zawierających w swojej sekwencji pojedynczą cząsteczkę dU, obecność cdPus wpłynęła na aktywność hAPE1 w większym stopniu (wzrost do około 82% w stosunku do kontroli) niż na aktywność UDG (wzrost do około 66% w stosunku do kontroli). W przypadku cząsteczek dU znajdujących się po stronie końca 3' nici wydajność reakcji hydrolizy dsDNA przez UDG wzrastała wolniej niż wydajność reakcji hydrolizy miejsc AP przez hAPE1. Dla oligonukleotydów zawierających cząsteczki dU zlokalizowane w kierunku 5'-końca nici wydajność reakcji katalizowanej przez UDG była podwyższona tylko w obecności uszkodzeń 5'*R*-cdA i 5'*S*-cdG, podczas gdy wydajność reakcji katalizowanej przez hAPE1 wzrastała dla wszystkich badanych diastereomerów cdPus. Może to sugerować, że obecność cdPus wpływa na mechanizm hydrolizy miejsca AP przez hAPE1 bardziej niż na mechanizm usuwania cząsteczek uracylu przez UDG.

Przyjmuje się, że mechanizm naprawy obu diastereomerów cdA i cdG przez system NER może być różny, ze względu na różnice w stopniu zniekształcenia podwójnej helisy DNA [102]. W tego powodu inicjacja szlaku BER również może opierać się o różne mechanizmów rozpoznawania cząsteczek dU, w zależności od rodzaju cdPus znajdującego się w pobliżu. Diastereoizomer 5'R – zarówno cdA, jak i cdG – powoduje większe zniekształcenie i destabilizację podwójnej helisy DNA niż diastereoizomer 5'S. Może to prowadzić do wyższej skuteczności szlaku NER wobec izomerów 5'R niż 5'S [50]. Ponadto badania dotyczące ekstraktów komórkowych HeLa wykazały, że skuteczność działania szlaku NER zmienia się, gdy uszkodzenia w postaci 5'S-cdA i 5'S-cdG są sparowane z różnymi zasadami azotowymi [133]. Może to sugerować, że skuteczność naprawy CDL zależy od wielu czynników i w pewnym stopniu może uzasadniać uzyskane wyniki. Warto zauważyć, że dla oligonukleotydów zawierających kombinację dwóch cząsteczek dU i uszkodzenie w formie cdPus obserwowano mniejszy wzrost aktywności zarówno UDG, jak i hAPE1, w porównaniu z oligonukleotydami z zawierającymi jedną cząsteczkę dU. Aktywność UDG wzrosła dla oligonukleotydów zawierających uszkodzenie w postaci 5'RcdG, podczas gdy aktywność hAPE1 wzrosła dla oligonukleotydów zawierających uszkodzenia 5'S-cdA i 5'S-cdG. W przypadku obecności innych uszkodzeń cdPus nie odnotowano żadnych zauważalnych zmian w aktywności enzymów względem prób kontrolnych. Mogło to nastąpić z powodu jednoczesnego rozpoznania obu miejsc nacięcia przez cząsteczki białka. Zatem cząsteczka dsDNA może być mniej podatna na rozluźnienie skręcenia podwójnej helisy w dwóch miejscach jednocześnie. Dzięki temu "działanie" dwóch cząsteczek enzymu w bliskiej odległości od siebie może być utrudnione.

Dotychczas nie prowadzono badań naukowych dotyczących wpływu uszkodzeń jednoniciowego lub dwuniciowego DNA na aktywność bakteryjnych endonukleaz restrykcyjnych. Biorąc pod uwagę kluczową role tych enzymów w bakteryjnym mechanizmie restrykcji-modyfikacji [87], [90], wyniki uzyskane w niniejszej pracy stanowią krok w kierunku zrozumienia procesów biochemicznych zachodzących w komórkach bakterii. System restrykcji-modyfikacji służy komórkom bakteryjnym do obrony przed infekcjami wirusowymi [88], [90]. Mechanizm ten prowadzi do fragmentacji materiału genetycznego, który jest wprowadzany do wnętrza bakterii przez cząsteczki wirusa [87]. Zahamowanie aktywności endonukleaz restrykcyjnych, na przykład wskutek obecności uszkodzeń w obrębie DNA bakteriofagów, może uniemożliwić zatrzymanie infekcji wirusowej.

Na podstawie wyników uzyskanych w niniejszej pracy mogłem stwierdzić, że hamowanie aktywności endonukleaz restrykcyjnych zachodzi przede wszystkim w przypadku obecności uszkodzenia dsDNA w pobliżu miejsca hydrolizy substratu przez enzym. Jeżeli dany enzym hydrolizuje dsDNA w obrębie rozpoznawanej przez siebie sekwencji, to obecność uszkodzenia DNA w obrębie tej sekwencji prowadzi do całkowitej inhibicji enzymu. W przypadku enzymu SspI, rozpoznawana sekwencja posiada długość 6 par zasad, a miejsce hydrolizy wiązań fosfodiestrowych znajduje się w środku sekwencji. W związku z tym, obecność uszkodzenia DNA w obrębie tej sekwencji oznacza, że znajduje się ono maksymalnie w odległości 3 par zasad od miejsca hydrolizy dsDNA. Tak niewielki dystans powoduje całkowita inhibicję aktywności enzymu, co zaobserwowałem w przypadku dsDNA B, C, F i G (uszkodzenie 5'R/S-cdA przylegające do miejsca hydrolizy substratu przez enzym) oraz L, M, N i O (uszkodzenie 5'R/S-cdA w odległości 1 pary zasad od miejsca hydrolizy substratu przez enzym). Jeżeli uszkodzenie DNA znajduje się poza obrębem sekwencji rozpoznawanej przez enzym SspI, to jego wpływ na aktywność tego enzymu spada wraz ze wzrostem odległości uszkodzenia od miejsca hydrolizy dsDNA. Aktywność enzymu SspI wynosiła od 89 do 96% wobec nici wchodzących w skład dsDNA D i E (uszkodzenie 5'R/S-cdA w odległości 10 par zasad od miejsca hydrolizy substratu przez enzym) oraz od 78 do 86% wobec nici wchodzących w skad supleksów H oraz I (uszkodzenie 5'*R/S*-cdA w odległości 9 par zasad od miejsca hydrolizy substratu przez enzym).

Enzym BsmAI jest przedstawicielem endonukleaz restrykcyjnych, które hydrolizują dsDNA poza obrębem rozpoznawanej sekwencji. W takim przypadku, celem całkowitej inhibicji enzymu, uszkodzenie DNA musi znajdować się w pobliżu miejsca hydrolizy. Inhibicję enzymu zaobserwowano w przypadku dsDNA D i E, zawierających uszkodzenia przylegające do miejsca hydrolizy. Obecność uszkodzenia w postaci 5'S-cdA spowodowała całkowitą inhibicję aktywności enzymu (dsDNA D), a w postaci 5'R-cdA spowodowała spadek aktywności enzymu do poziomu 45% (dsDNA E). "Oddalenie" uszkodzeń cdA o 1 parę zasad oraz jednoczesne "przeniesienie" go na nić przeciwległą (dsDNA H, I) częściowo zniosło inhibicję enzymu, ale nadal była ona silniejsza dla diastereoizomeru 5'S niż dla 5'R. Obecność uszkodzeń DNA w obrębie sekwencji rozpoznawanej przez enzym wykazuje znaczący wpływ na aktywność enzymu, ale nie hamuje jej całkowicie. Dla dsDNA L, M, N i O, zawierających uszkodzenia w postaci 5'S-cdG i 5'R-cdG, aktywność enzymu wobec nici uszkodzonych wynosiła od 20 do 29% (nici 24 26, 28, 30), natomiast wobec nici nieuszkodzonych od 54 do 69% (nici 23 i 27). Różnice pomiędzy wpływem form diastereoizomerycznych cdG nie były tak widoczne jak w przypadku cdA. W przypadku endonukleaz restrykcyjnych hydrolizujących dsDNA z wytworzeniem lepkich końców, uszkodzenie znajduje się w innej odległości od miejsca hydrolizy nici uszkodzonej niż nici komplementarnej. Powyższe wyniki wskazują, że dla takich enzymów występują znaczne różnice w szybkości hydrolizy podwójnej helisy DNA jeżeli zawiera ona cdPus w swojej sekwencji.

Podsumowując wpływ cdPus na aktywność wszystkich enzymów badanych w przedstawionej pracy, nie jest możliwe jednoznaczne wskazanie różnic pomiędzy diastereoizomerami. Aktywność enzymów UDG i hAPE1 była niższa w przypadku obecności uszkodzeń w postaci 5'S-cdA i 5'R-cdG, niż w przypadku 5'R-cdA i 5'S-cdG. Aktywność enzymów OGG1 i FPG była niższa w przypadku obecności uszkodzenia w postaci 5'R-cdG, niż w przypadku 5'S-cdG.

W przypadku endonukleaz restrykcyjnych, korelację widać w odniesieniu do enzymu BsmAI i jest ona następująca: aktywność enzymu jest niższa w przypadku obecności uszkodzenia w postaci 5'S-cdA, niż w przypadku 5'*R*-cdA. Jednakże wniosek ten jest prawdziwy tylko dla uszkodzeń znajdujących się w bezpośredniej bliskości miejsca hydrolizy dsDNA przez enzym. W przypadku diastereoizomerów cdG, różnice pomiędzy wpływem 5'S-cdG i 5'*R*-cdG na aktywność BsmAI są nieznaczne.

Na podstawie przedstawionych wyników można stwierdzić, że uszkodzenie w postaci 5'*R*cdG prowadzi do silniejszej inhibicji enzymów szlaku BER niż obecność uszkodzenia w postaci 5'*S*-cdG. Natomiast w badaniach dotyczących uszkodzenia w postaci cdA, obecność diastereoizomeru 5'*S* powodowała silniejszą inhibicję enzymów UDG, hAPE1 oraz BsmAI. Wynik ten jest zgodny z wcześniejszymi badaniami określającymi wpływ diastereoizomerów cdA na aktywność UDG i hAPE1 [13] i jest najprawdopodobniej efektem występowania zawady sterycznej w przypadku obecności 5'*S*-cdA w sekwencji badanych fragmentów dsDNA. W przypadku diastereoizomeru 5'*R*, efekt ten wpływa na aktywność UDG i hAPE1 w mniejszym stopniu niż w przypadku 5'*S*-cdA. W odniesieniu do cdG, zależność jest odwrotna i może wynikać na przykład z różnic w budowie przestrzennej pomiędzy cdA i cdG.

Badając aktywność enzymów szlaku BER stosowałem dwuniciowe oligonukleotydy zawierające w swojej sekwencji po 2 cząsteczki dU lub 8-oxodG. Na podstawie wyników uzyskanych z wykorzystaniem takich substratów można przedstawić następującą zależność. Enzmy UDG i hAPE1 wykazują wyższą aktywność wobec cząsteczek dU zlokalizowanych bliżej końca 3' nici uszkodzonej (zawierającej cdPus). Jednocześnie, enzymy OGG1 i FPG w pierwszej kolejności usuwają cząsteczki 8-oxoG zlokalizowane bliżej końca 5' nici uszkodzonej. Taka obserwacja może mieć związek ze specyfiką działania konkretnych enzymów, co jest szczególnie widoczne w przypadku enzymów z klasy polimeraz. W przedstawionej pracy badawczej stosowałem substraty w postaci dsDNA o długości zaledwie 40 par zasad, co dodatkowo ułatwia rozpoznawanie wolnych końców nici przez enzymy. Możliwe jest, że w zależności od rodzaju enzymu, porusza się on wzdłuż cząsteczki dsDNA w konkretnym kierunku, napotykając na swojej drodze uszkodzenia położone bliżej końca 3' lub 5' nici.

Wyniki przeprowadzonych przeze mnie prac badawczych w ramach przedstawionej rozprawy doktorskiej mogą w przyszłości przyczynić się do zrozumienia mechanizmów

działania enzymów odpowiedzialnych za ochronę genomu przed negatywnym wpływem uszkodzeń zespolonych DNA zawierających cdPus.

## 5. Część doświadczalna

### 5.1. Materiały i metody

### 5.1.1. Sprzęt i odczynniki

W toku mojej pracy badawczej korzystałem z następującego sprzętu laboratoryjnego (Tabela 10) oraz odczynników chemicznych (Tabela 11). Składy jakościowo-ilościowe oraz numery serii odczynników do reakcji enzymatycznych znajdują się w Tabeli 12.

**Tabela 10.** Wykaz sprzętu stosowanego w kolejnych etapach prac badawczych. Etap 1 – synteza materiału badawczego, etap 2 – znakowanie izotopowe oligonukleotydów, etap 3 – hybrydyzacja oligonukleotydów, etap 4 – reakcje enzymatyczne, etap 5 – elektroforeza PAGE, etap 6 – autoradiografia, etap 7 – kwantyfikacja wyników w programie Quantity One. Wykaz nie uwzględnia drobnych materiałów laboratoryjnych zużywalnych.

Sprzęt	Marka i model	Etap
Spektrofotometr	Varian Cary 1E	1
Dejonizator wody	SolPure VENA UV	1, 2, 3, 4, 5
Pipety automatyczne	Eppendorf Research Plus HTL Discovery Comfort Socorex Acura 825 Socorex Calibra 822	2, 3, 4
Detektor promieniowania	Polon Ekolab EKO-C	2, 3, 4, 5, 6
Waga precyzyjna	Radwag WPS 510/C/2	2, 3, 4, 5
Waga analityczna	Axis AD500 Radwag WAS 220/C/2	2, 3, 4, 5
Wirówka laboratoryjna	DLAB D1008 LMS MCF-2360	2, 3, 4, 5
Vortex	Bio-Rad BR-2000	2, 3, 4, 5

Wirówka próżniowa	Savant SpeedVac SVC-100M	2, 3
Wirówka z chłodzeniem	MPW-365	2, 3
Łaźnia wodna	AJL LW102	2, 4
Termoblok	Grant Instruments QBA1	2, 3, 4
Aparat do PAGE	Thermo Scientific Owl S3S oraz S4S TVS 1400	4
Zasilacz do PAGE	Consort EV232 Consort EV2320	4
pH-metr	Mettler Toledo SevenCompact S220	5
Pompa próżniowa do filtracji	KNF N820AN.18	5
Klisze RTG	Fujifilm Super RX-N	6
Kasety do klisz RTG	Agfa Ortho Gradual	6
Skaner	Epson L386	7

**Tabela 11.** Wykaz odczynników chemicznych stosowanych w kolejnych etapach prac badawczych. Etap 1 – synteza materiału badawczego, etap 2 – znakowanie izotopowe oligonukleotydów, etap 3 – hybrydyzacja oligonukleotydów, etap 4 – reakcje enzymatyczne, etap 5 – elektroforeza PAGE, etap 6 – autoradiografia, etap 7 – kwantyfikacja wyników w programie Quantity One.

Odczynnik	Producent	Kod produktu	Etap prac badawczych
Akrylamid	PanReac AppliChem	A1089.1000	5
Bisakrylamid	Sigma-Aldrich	M7256-250G	5
Mocznik	Pol-Aura	40096-AP0-G1000- 1	5
Tris	GenoPlast Biochemicals	BMGPB0026-3	5

Kwas borowy	РОСН	005-007-00-2	5
EDTA	MP Biomedicals	800683	5
NaOH	РОСН	011-002-00-6	5
Nadsiarczan	VWR	0486-100G	5
amonu	MP Biomedicals	802829	5
TEMED	VWR	0761-100ML	5
Formamid	Sigma-Aldrich	F9037-100ML	2, 3, 4, 5
Błękit	MP Biomedicals	193990	2, 3, 4, 5
bromofenolowy			_, ; , , ; ; ;
Cyjanol ksylenu	Sigma-Aldrich	X4126-10G	2, 3, 4, 5
Etanol bezwodny	РОСН	603-002-00-5	2, 3
czysty			
γ- <sup>32</sup> Ρ ΑΤΡ	Hartmann Analytic	SRP-301	2, 3
Piperydyna	Sigma-Aldrich	104094-100ML	2, 3, 4
Wywoływacz	Foma Bochemia	_	6
	Foma GD-L		0
Kwas cytrynowy	Chempur	425382101	6
Utrwalacz	Foma Bochemia	_	6
	Fomafix		

Odczynnik	Skład	Numery serii
UDG	5000 U/ml UDG, 50 mM chlorku potasu, 10 mM chlorowodorku Tris (pH = 7,4), 1 mM DTT, 0,1 mM EDTA, 50% glicerolu, 100 μg/ml BSA	0121412 10061206 10081986
hAPE1	10000 U/ml hAPE1, 10 mM chlorowodorku Tris, 50 mM chlorku sodu, 1 mM DTT, 0,05 mM EDTA, 200 $\mu$ g/ml BSA, 50% glicerolu, pH = 8,0	0041501 10019494
OGG1	3,42 U/ml hOGG1-α, 20 mM chlorku Tris (pH = 7,8), 1 mM DTT, 1 mM EDTA, 100 mM chlorku sodu, 50% glicerolu	P223581
FPG	20 mM chlorowodorku Tris, 50 mM chlorku sodu, 0,5 mM EDTA, 200 μg/ml BSA, 50% glicerolu, pH = 8,0	10040529
BSA	10 mg/ml BSA, 20 mM chlorowodorku Tris, 100 mM chlorku potasu, 0,1 mM EDTA, 50% glicerolu, pH = 8,0	10014762
Bufor APEX NEBuffer 4	50 mM octanu potasu, 20 mM octanu Tris, 10 mM octanu magnezu, 1 mM DTT, pH = 7,9	0041411 10012689
Bufor do FPG NEBuffer 1	10 mM chlorowodorku Bis-Tris-propanu, 10 mM chlorku magnezu, 1 mM DTT, pH = 7,0	0101804
Bufor do OGG1 REC buffer 6	20 mM chlorku Tris (pH = 8,0), 1 mM EDTA,1mM DTT, 100 μg/ml BSA	20479
SspI-HF	100000 U/ml SspI, 10 mM chlorowodorku Tris, 250 mM chlorku sodu, 1 mM DTT, 0,1	10020697

Tabela 12. Wykaz odczynników biologicznych stosowanych w pracy badawczej.

	mM EDTA, 200 μg/ml BSA, 50% glicerolu, 0,15% Triton X-100, pH = 7,4	
BsmAI	5000 U/ml BsmAI, 10 mM chlorowodorku Tris, 300 mM chlorku sodu, 1 mM DTT, 0,1 mM EDTA, 500 $\mu$ g/ml BSA, 50% glicerolu, pH = 7,4	10025061
Bufor do SspI	50 mM octanu potasu, 20 mM octanu Tris, 10	0041411
NEBuffer 4	mM octanu magnezu, 1 mM DTT, pH = 7,9	10012689
Bufor do BsmAI	50 mM octanu potasu, 20 mM octanu Tris, 10	0041411
NEBuffer 4	mM octanu magnezu, 1 mM DTT, pH = 7,9	10012689
Kinaza T4	10000 U/ml kinazy T4, 10 mM chlorowodorku Tris, 50 mM chlorku potasu, 1 mM DTT, 0,1 mM EDTA, 50% glicerolu, 0,1 μM ATP, pH = 7,4	10064352
Bufor do kinazy T4 Polynucleotide Kinase Reaction Buffer	70 mM chlorowodorku Tris, 10 mM chlorku magnezu, 5 mM DTT, pH = 7,6	10056315

## 5.2. Materiał badawczy

Materiał badawczy stanowiły jednoniciowe oligonukleotydy zsyntezowane oraz oczyszczone w Instytucie Chemii Bioorganicznej Centrum Badań Molekularnych i Makromolekularnych Polskiej Akademii Nauk w Łodzi. Substraty do syntezy oligonukleotydów w postaci fosforamidowych pochodnych deoksypuryn uzyskano w Zakładzie Bromatologii Wydziału Farmaceutycznego Uniwersytetu Medycznego w Łodzi, według metody opisanej w literaturze naukowej [134]. Komercyjnie dostępne niemodyfikowane deoksyrybonukleotydy zakupiono w Sigma Aldrich. Produkty syntezy, składające się z 40 nukleotydów każdy, oczyszczono metodą HPLC na kolumnie

Phenomenex C-18, a czystość analizowano spektrofotometrycznie przy długości fali  $\lambda = 260$  nm. Jakość procesu syntezy potwierdzono przeprowadzając spektroskopię masową oligonukleotydów i wyznaczając ich jony molekularne. Sekwencje uzyskanych oligonukleotydów oraz ich właściwości przedstawiono na Rysunkach 10, 19 i 23 oraz w Tabelach 5, 8 i 9. Wszystkie badane oligonukleotydy przygotowano w postaci roztworów o stężeniach wyrażonych w jednostkach OD. Wartość OD oznacza gęstość optyczną roztworu (OD, ang. *optical density*) i ustala się ją mierząc absorbancję roztworu przy długości fali  $\lambda = 260$  nm. Uzyskaną wartość OD przelicza się według poniższego wzoru na stężenie oligonukleotydu w próbie i wyraża zwykle w pikomolach (pmol) lub mikrogramach (µg).

$$n [nmol] = \frac{100 \cdot n [OD]}{1,54 \cdot A + 1,17 \cdot G + 0,75 \cdot C + 0,92 \cdot T}$$

gdzie:

n [mol] – ilość oligonukleotydu w roztworze wyrażona w nanomolach,

n [OD] – wartość OD roztworu,

A, G, C, T – liczba poszczególnych nukleotydów w sekwencji oligonukleotydu

Ze względu na różne objętości i wartości OD roztworów oligonukleotydów, ich ilość pobieraną do reakcji enzymatycznych przeliczałem indywidualnie (Tabela 5, 8, 9). Dla jednoniciowych oligonukleotydów o długości 40 nukleotydów przyjmuje się, że 1 OD odpowiada ilości 2,3 nmol.

#### 5.3. Znakowanie izotopowe oligonukleotydów

W pierwszym etapie prac badawczych przeprowadziłem znakowanie izotopowe oligonukleotydów na 5'-końcu przy użyciu promieniotwórczego izotopu fosforu <sup>32</sup>P. Metoda polegała na pobraniu każdego oligonukleotydu w ilości 230 pmol (0,1 OD) i dodaniu 2  $\mu$ Ci (0,2  $\mu$ l) [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P] ATP oraz 5 U kinazy polinukleotydowej T4 jako katalizatora reakcji. Środwisko reakcji stanowił dedykowany bufor reakcyjny (T4 Polynucleotide Kinase Reaction Buffer), a całkowita objętość pojedynczej mieszaniny reakcyjnej wynosiła 20  $\mu$ l. Reakcję prowadziłem w temperaturze 37 °C przez 30 minut, następnie denaturowałem enzym umieszczając próbki na 5 minut w temperaturze 95 °C. Po

denaturacji próbki chłodziłem umieszczając w lodowatej łaźni wodnej. Tabela 13 przedstawia przykładowy skład mieszaniny reakcyjnej podczas znakowania izotopowego oligonukleotydów. Tabele 14 i 15 przedstawiają sposoby przygotowania poszczególnych składników mieszaniny reakcyjnej. Tabela 16 przedstawia specyfikację enzymu. Tabela 17 przedstawia specyfikację [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P] ATP.

Składnik	Ilość
Oligonukleotyd	0,1 OD (2,3 pmol)
Bufor reakcyjny 10x	2 µl
Enzym 1:10	5 µl
[γ- <sup>32</sup> P] ATP 1:10	2 µl
Woda dejonizowana	do 20 µl
Suma:	20 µl

**Tabela 13.** Skład jakościowy i ilościowy mieszaniny reakcyjnej stosowanej w etapie znakowania izotopowego oligonukleotydów.

**Tabela 14.** Skład jakościowy i ilościowy roboczego roztworu enzymu służącego do znakowania izotopowego oligonukleotydów.

Składnik	Ilość
Enzym	2 µl
Bufor reakcyjny 10x	1,8 μl
Woda dejonizowana	16,2 µl
Suma:	20 µl

**Tabela 15.** Skład jakościowy i ilościowy roboczego roztworu [ $\gamma$ -32P] ATP służącego do znakowania izotopowego oligonukleotydów.

Składnik	Ilość
[γ- <sup>32</sup> Ρ] ΑΤΡ	1 µl
Woda dejonizowana	9 µl
Suma:	10 µl

Tabela 16. Specyfikacja stosowanej kinazy T4.

Parametr	Kinaza T4	
Тур	Kinaza polinukleotydowa	
Substrat	ssDNA, dsDNA, γ-Pi-ATP	
Kofaktor	Mg <sup>2+</sup>	
Producent	New England Biolabs	
Dystrybutor	Lab-Jot	
Stężenie	10000 U/ml	
Kod produktu	M0201S (500 U)	
Bufor reakcyjny	T4 Polynucleotide Kinase Reaction	
	Buffer	
Dodatki	-	
Ilość do reakcji	5 U	
Objętość do reakcji	0,5 μl	
Temperatura	37 °C	
Czas reakcji	0,5 h	

**Tabela 17.** Specyfikacja stosowanego [γ-32P] ATP.

Parametr	[γ- <sup>32</sup> P] ATP	
Producent	Hartmann Analytic	
Radionuklid	<sup>32</sup> P	
Aktywność	111 TBq (3000 Ci)/mmol	
Stężenie	10 mCi/ml	
Kod produktu	SRP-301	
Ilość do reakcji	2 µCi	
Objętość do reakcji	0,2 μl	

Ze względu na pracę z materiałem promieniotwórczym, każdy etap prac badawczych wymagał stosowania urządzenia monitorującego poziom promieniowania. W tym przypadku było to promieniowanie  $\beta^-$  emitowane przez wysokoenergetyczne atomy izotopu

fosforu <sup>32</sup>P. Do tego celu stosowałem monitor skażeń radioaktywnych EKO-C wyprodukowany przez firmę Polon-Ekolab. Czytnik ten mierzy i podaje poziom promieniowania X i gamma w zakresie  $0,01 - 1000 \ \mu$ Sv/h, promieniowania  $\alpha$  w zakresie  $0,1 - 10000 \ Bq/cm^2$  oraz promieniowania  $\beta$  w zakresie  $0,1 - 10000 \ cps$ . Jednostka cps (ang. *counts per second*) wskazuje na częstotliwość wykrywania pojedynczych cząstek  $\beta$  w czasie 1 sekundy. W wyniku znakowania izotopowego oligonukleotydów, pojedyncza próbka o objętości 20 µl (Tabela 13) wykazywała poziom promieniowania wykraczający poza skalę czytnika (>10000 \ cps).

Czas połowicznego rozpadu – inaczej okres półtrwania – promieniotwórczego izotopu fosforu <sup>32</sup>P wynosi 14,3 dnia. Oznacza to, że po upływie 2 tygodni izotop traci połowę swojej wyjściowej aktywności promieniotwórczej. Z tego względu ilość izotopu dodawanego do pojedynczej mieszaniny reakcyjnej była ustalana indywidualnie na podstawie daty produkcji danej serii.

#### 5.4. Hybrydyzacja oligonukleotydów

Drugi etap prac badawczych polegał na uzyskaniu właściwych substratów dla reakcji w postaci oligonukleotydów dwuniciowych. tym enzymatycznych W celu hybrydyzację wszystkich znakowanych przeprowadziłem oligonukleotydów jednoniciowych z komplementarnymi do nich matrycami. Metoda polegała na dodaniu nadmiaru matrycy w stosunku do ilości znakowanego substratu oraz podgrzaniu mieszaniny do temperatury 95 °C na 10 minut. Nadmiar był 1,2-krotny (0,12 OD) w badaniach nad aktywnościa enzymów UDG, hAPE1, SspI i BsmAI, natomiast 2-krotny (0,2 OD) w badaniach nad aktywnością OGG1 i FPG. Po zakończeniu inkubacji próbki pozostawiałem do powolnego ostygnięcia (około 3-4 godziny), co umożliwiało komplementarne połączenie się nici badanej z nicią matrycową. Po hybrydyzacji prowadziłem wytrącanie oligonukleotydów do postaci osadu poprzez dodatek 250 µl lodowatego suchego etanolu oraz wirowanie przez 30 minut z prędkością 13 tys. obr./min. w temperaturze 4 °C. Po wirowaniu dekantowałem rozwtór znad osadu, mierzyłem poziom promieniowania próbek i suszyłem osad z nadmiaru etanolu w warunkach podciśnienia przez około 30 minut. Następnie osad rozpuszczałem w wodzie i zamrażałem do późniejszego wykorzystania jako substrat do reakcji enzymatycznych.

Dekantacja roztworu znad osadu była obarczona ryzykiem utraty części znakowanego materiału badawczego. Z tego względu, oprócz pomiaru mocy promieniowania próbek przed i po dekantacji, mierzyłem również poziom promieniowania dekantowanego roztworu. Do dalszych eksperymentów kierowałem jedynie tak przygotowane próbki (w postaci osadu), dla których poziom promieniowania dekantowanego roztworu był pomijalnie mały. W przypadku próbek (osadu) o mocy przekraczającej 10000 cps, akceptowalna moc dekantowanego roztworu wynosiła 50-300 cps. Wówczas, po rozcieńczeniu osadu do objętości 100 µl, uzyskiwałem materiał badawczy na 100 kolejnych reakcji enzymatycznych). Moc promieniowania 1 µl materiału badawczego wynosiła wówczas około 200 cps.

Minimalny poziom promieniowania próbki poddawanej reakcji enzymatycznej powinien wynosić 50 cps. Wówczas możliwe było obrazowanie wyników metodą autoradiografii po upływie 24 godzin od zakończenia eksperymentu. W przypadku próbek, których moc promieniowania przekraczała 200 cps, wynik uzyskiwałem po 2 godzinach.

#### 5.5. Reakcje enzymatyczne

Celem mojej pracy badawczej było określenie aktywności wybranych enzymów wobec oligonukleotydowych substratów zawierających w swojej strukturze konkretne uszkodzenia sekwencji DNA. W tym celu przeprowadziłem reakcje enzymatyczne z wykorzystaniem otrzymanych dwuniciowych fragmentów oligonukleotydowych. Całość prac badawczych została podzielona na trzy etapy.

### 5.5.1. Badanie aktywności enzymów UDG i APE1

Pierwszy etap prac obejmował reakcje enzymatyczne wobec 14 jednoniciowych oligonukleotydów hybrydyzowanych z komplementarnymi matrycami do postaci dwuniciowej. Znakowane izotopowo dwuniciowe oligonukleotydy w ilości 2,3 pmol każdy inkubowałem w 5 μl buforu reakcyjnego (NEBuffer 4) z UDG i hAPE1 w temperaturze 37 °C. W celu określenia aktywności UDG używałem enzymów w ilościach 0,02 U UDG i 0,5 U hAPE, prowadząc reakcje przez 0, 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55 i 60 minut. W celu określenia aktywności hAPE1 używałem enzymów w ilościach 0,5 U UDG i 0,02 hAPE1, prowadząc reakcje przez 0, 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 60, 90, 120, 150 i 180 minut.

Parametr	UDG	hAPE1
Тур	Glikozylaza monofunkcyjna	Endonukleaza
Substrat	dU w dsDNA	miejsce AP w dsDNA
Kofaktor	-	Mg <sup>2+</sup>
Producent	New England Biolabs	New England Biolabs
Dystrybutor	Lab-Jot	Lab-Jot
Stężenie	5000 U/ml	10000 U/ml
Kod produktu	M0280S (1000 U)	M0282S (1000 U)
Bufor reakcyjny	NEBuffer 4 (10x)	NEBuffer 4 (10x)
Ilość do reakcji	0,02 U lub 0,5 U	0,02 U lub 0,5 U
Objętość do reakcji	0,004 lub 0,1 μl	0,002 lub 0,05 µl
Temperatura	37 °C	37 °C
Czas reakcji	0 – 1 h	0 – 3 h

Tabela 18. Specyfikacja enzymów UDG i hAPE1 stosowanych w pracach badawczych.

**Tabela 19.** Składy jakościowe i ilościowe mieszanin reakcyjnych w ramach analizy aktywności enzymów UDG i hAPE1.

Etap	Aktywność UDG	Aktywność hAPE1
Składnik	Ilość	
Substrat	1 µl	
UDG	0,004 µl	0,002 µl
hAPE1	0,05 µl	0,1 µl
Bufor reakcyjny 10x	0,5 µl	
Woda dejonizowana	do 5 µl	
Suma:	5 µl	

Próby kontrolne stanowiły reakcje enzymatyczne wobec fragmentów dsDNA natywnych, nieposiadających uszkodzeń DNA w swojej strukturze (dU0 oraz dU(-5)(+5)dA). Próby te potwierdziły aktywność enzymów wobec oligonukleotydów natywnych. Dodatkowo wykonałem próby zerowe polegające na trawieniu wszystkich dsDNA przez badane
enzymy stosowane oddzielnie w ilości 0,5 U, prowadząc reakcje przez 0 i 60 minut dla UDG lub 0 i 180 minut dla hAPE1. Próby te potwierdziły brak aktywności hAPE1 wobec substratów, jak również brak hydrolizy miejsca AP w próbach zawierających tylko UDG. Tabela 19 przedstawia składy mieszanin reakcyjnych podczas badania aktywności enzymów UDG oraz hAPE1.

### 5.5.2. Badanie aktywności enzymów SspI i BsmAI

Drugi etap prac obejmował reakcje enzymatyczne wobec 30 jednoniciowych oligonukleotydów tworzących 15 dwuniciowych dsDNA. Każde dsDNA analizowałem dwukrotnie, w zależności od tego która z nici była znakowana izotopowo. Sumarycznie uzyskałem 30 prób badawczych. Znakowane izotopowo dwuniciowe oligonukleotydy w ilości 2,3 pmol każdy inkubowałem w 5 µl dedykowanego buforu reakcyjnego (NEBuffer 4) z 0,5 U BsmAI (reakcja prowadzona w temperaturze 55 °C) lub 1,5 U SspI (reakcja prowadzona w temperaturze 37 °C). Czasy reakcji dla obu enzymów wynosiły: 0, 1, 5, 15, 30, 45 i 60 minut. Próby kontrolne stanowiły reakcje enzymatyczne wobec dsDNA natywnych, nieposiadających uszkodzeń DNA w swojej strukturze (reakcje z dsDNA A, w którym znakowana izotopowo była nić 1 lub 2). Próby te potwierdziły aktywność enzymów wobec oligonukleotydów natywnych. Dodatkowo wykonałem próby zerowe polegające na trawieniu wszystkich 30 jednoniciowych oligonukleotydów przez badane enzymy. Próby te potwierdziły brak interakcji enzymów z jednoniciowymi substratami. Tabela 21 przedstawia składy mieszanin reakcyjnych podczas badania aktywności enzymów SspI oraz BsmAI.

### 5.5.3. Badanie aktywności enzymów OGG1 i FPG

Trzeci etap prac obejmował reakcje enzymatyczne wobec 3 jednoniciowych oligonukleotydów hybrydyzowanych z komplementarnymi matrycami do postaci dwuniciowej. Znakowane izotopowo dwuniciowe oligonukleotydy w ilości 2,3 pmol każdy inkubowałem w 5 μl buforu reakcyjnego z 0,5 U OGG1 lub FPG w temperaturze 37 °C. W celu określenia aktywności OGG1 reakcje prowadziłem z użyciem dedykowanego buforu (REC buffer 6) przez 0, 30, 60, 120, 180, 240 i 300 minut. W celu określenia aktywności FPG reakcje prowadziłem z użyciem dedykowanego buforu (NEBuffer 1) przez

0, 1, 5, 15, 30, 60 i 120 minut. Próby kontrolne stanowiły reakcje enzymatyczne wobec dsDNA natywnego, niezawierającego uszkodzeń DNA w swojej strukturze (-6/+6(H/dA). Próby te potwierdziły aktywność enzymów wobec oligonukleotydów natywnych. Dodatkowo wykonałem próby zerowe polegające na trawieniu wszystkich trzech jednoniciowych oligonukleotydów przez badane enzymy. Próby te potwierdziły brak interakcji enzymów z jednoniciowymi substratami. Tabela 23 przedstawia składy mieszanin reakcyjnych podczas badania aktywności enzymów OGG1 oraz FPG.

Parametr	SspI	BsmAI				
Tup	Deoksyrybonukleaza	Deoksyrybonukleaza				
тур	IIP	IIS				
Substrat	dsDNA	dsDNA				
Kofaktor	Mg <sup>2+</sup>	Mg <sup>2+</sup>				
Producent	New England Biolabs	New England Biolabs				
Dystrybutor	Lab-Jot	Lab-Jot				
Stężenie	100000 U/ml	5000 U/ml				
Kod produktu	R0132S	R0529S (1000 U)				
Bufor reakcyjny	NEBuffer 4 (10x)	NEBuffer 4 (10x)				
Dodatki	-	-				
Ilość do reakcji	1,5 U	0,5 U				
Objętość do reakcji	0,015 µl	0,1 µl				
Temperatura	37 °C	55 °C				
Czas reakcji	0 – 1 h 0 – 1 h					

Tabela 20. Specyfikacje enzymów SspI i BsmAI stosowanych w pracach badawczych.

Etap	Aktywność SspI Aktywność Bsm							
Składnik	Ilość							
Substrat	1	μl						
SspI	0,015 µl	-						
BsmAI	- 0,1 µl							
Bufor reakcyjny 10x	0,5	5 μl						
Woda dejonizowana	do 5 µl							
Suma:	5	μl						

**Tabela 21.** Składy jakościowe i ilościowe mieszanin reakcyjnych w ramach analizy aktywności enzymów SspI i BsmAI.

**Tabela 22.** Specyfikacje enzymów OGG1 i FPG stosowanych w pracach badawczych.

Parametr	OGG1	FPG				
Тур	Glikozylaza c	łwufunkcyjna				
Substrat	8-oxodG FapyG	8-oxodG, FapyG, Fapy				
Bubblut	0 0/0000, 1 00/00	А				
Kofaktor	-	-				
Producent	Trevigen	New England Biolabs				
Dystrybutor	-	Lab-Jot				
Stężenie	3,42 U/µl	8000 U/ml				
Kod produktu	4130-100-EB (100 U)	M0240S (500U)				
		NEBuffer 1 (10x)				
Bufor reakcyjny	REC Buffer 6 (10x)	(kod produktu:				
		B7001S)				
		BSA 100x (10 mg/ml)				
Dodatki	-	(kod produktu:				
		B9001S)				
Ilość do reakcji	0,5 U	0,5 U				
Objętość do reakcji	0,146 µl	0,0625 µl				
Temperatura	37 °C	37 °C				
Czas reakcji	0 – 5 h	0-2 h				

Etap	Aktywność OGG1 Aktywność FPO						
Składnik	Ilość						
Substrat	1	μl					
OGG1	0,146 µl (0,5 U)	-					
FPG	- 0,0625 μl (0,5						
Bufor reakcyjny 10x	0,5	μl					
Woda dejonizowana	do 5 µl						
Suma:	5	μl					

**Tabela 23.** Składy jakościowe i ilościowe mieszanin reakcyjnych w ramach analizy aktywności enzymów OGG1 i FPG.

#### 5.6. Elektroforeza w żelu poliakrylamidowym

Jakość procesów znakowania, hybrydyzacji i strącania oligonukleotydów, a także efekt reakcji enzymatycznych sprawdzałem metodą elektroforezy w żelu poliakrylamidowym (PAGE, ang. polyacrylamide gel electrophoresis). Metoda ta pozwala na rozdział mieszaniny czasteczek chemicznych pod wpływem przyłożonego napięcia elektrycznego, w zależności od ich masy cząsteczkowej, budowy przestrzennej lub ładunku elektrycznego. W przypadku rozdziału mieszaniny zawierającej oligonukleotydy stosuje się żel poliakrylamidowy, charakteryzujący się obojętnością elektryczną oraz dużą gęstością usieciowania włókien w strukturze żelu. Stopień usieciowania żelu reguluje się poprzez zmiane proporcji akrylamidu do bisakrylamidu w jego składzie. Dzięki temu możliwy jest rozdział mieszaniny oligonukleotydów różniących się między sobą długością pojedynczego nukleotydu. W mojej pracy badawczej używałem żelu o stężeniu 15% lub 20% akrylamidu (w zależności od etapu badawczego), wzbogaconego o mocznik w stężeniu końcowym 8 mol/dm<sup>3</sup> (Tabela 24). Mocznik stanowi czynnik denaturujący, powodujący zerwanie wiązań wodorowych i oddzielenie nici od siebie, a w konsekwencji również zapobiega przypadkowemu parowaniu się zasad azotowych. Dzięki temu możliwa jest obserwacja znakowanych jednoniciowych fragmentów oligonukleotydów jako produktów reakcji. W zależności od miejsca oddziaływania enzymu z substratem, jednoniciowe fragmenty oligonukleotydowe posiadają różną długość, przez co migrują w żelu z różnymi prędkościami. W efekcie, po zakończeniu procesu elektroforezy, znajdują się wewnątrz warstwy żelu w różnych miejscach (dalej lub bliżej w stosunku do miejsca nałożenia próbek na żel). Przepływ napięcia elektrycznego przez warstwę żelu jest możliwy dzięki zalaniu końców żelu roztworem buforowym. W mojej pracy badawczej używałem buforu TBE (Tabela 25, 26).

Przed rozpoczęciem właściwego procesu elektroforezy przeprowadzałem preelektroforezę, polegającą na naniesieniu na gotowy żel czystego buforu obciążającego (LB, ang. *loading buffer*) (Tabela 27, 28). Pre-elektroforeza służy oczyszczeniu żelu z kationów amonowych oraz innych cząsteczek, których obecność mogłaby wpłynąć na wynik eksperymentu. LB pełnił funkcję barwnika, a także – podobnie jak mocznik – czynnika denaturującego. W składzie LB znajdowały się dwa barwiące związki chemiczne: błękit bromofenolowy i cyjanol ksylenu FF. Migrują one w żelu z prędkością zbliżoną do fragmentów oligonukleotydowych o długości odpowiednio 8 i 28 nukleotydów. Rozdział frakcji barwiących na odległość około 8 cm oznaczał gotowość do analizy badanych próbek. Przed naniesieniem próbek na żel dodawałem do nich LB celem ich pełnej denaturacji oraz ułatwienia obserwacji procesu. Po zakończeniu procesu, postęp migracji próbek analizowałem metodą autoradiografii, wykorzystując zjawisko emisji promieniowania β<sup>-</sup> przez izotop <sup>32</sup>P.

Rodzaj żelu	15% PAGE 8 M Urea 20% PAGE 8 M						
Składnik	Ilo	ść					
Akryl 19:1	375 ml	500 ml					
TBE 10x	100 ml						
Mocznik	480 g						
Woda dejonizowana	do 100	00 ml					
Suma:	1000	) ml					

**Tabela 24.** Skład jakościowy i ilościowy denaturujących żeli poliakrylamidowych w przeliczeniu na 1 litr roztworu.

**Tabela 25.** Skład jakościowy i ilościowy mieszaniny akrylamidu i bisakrylamidu w stosunku 19:1, w przeliczeniu na 1 litr roztworu gotowego.

Składnik	Ilość
Akrylamid	380 g
Bisakrylamid	20 g
Woda dejonizowana	do 1000 ml
Suma:	1000 ml

**Tabela 26.** Skład jakościowy i ilościowy buforu TBE (10x) w przeliczeniu na 1 litr roztworu gotowego.

Składnik	Ilość
Tris(hydroksymetylo)aminoetan	108 g
Kwas borowy (H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> )	55 g
Kwas wersenowy (EDTA)	5,8 g
Wodorotlenek sodu (NaOH)	1,6 g
Woda dejonizowana	do 1000 ml
Suma:	1000 ml

**Tabela 27.** Skład jakościowy i ilościowy LB zawierającego 2 mM EDTA-NA<sub>2</sub> (10x) w przeliczeniu na 30 ml roztworu gotowego.

Składnik	Ilość
Błękit bromofenolowy	75 mg
Cyjanol ksylenu FF	75 mg
Formamid	28,5 ml
EDTA-Na <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O	223,2 mg
Woda dejonizowana	do 30 ml
Suma:	30 ml

Składnik	Ilość
LB 10x	1 ml
Formamid	8,55 ml
Woda dejonizowana	0,45 ml
Suma:	10 ml

**Tabela 28.** Skład jakościowy i ilościowy LB zawierającego 2 mM EDTA-Na<sub>2</sub> (1x) w przeliczeniu na 10 ml roztworu gotowego.

Oprócz właściwych prób badanych, metodą PAGE sprawdzałem jakość przeprowadzonych procesów znakowania izotopowego oraz hybrydyzacji oligonukleotydów. Do tego celu wykorzystywałem niedenaturujący żel poliakrylamidowy o stężeniu 15% akrylamidu, niezawierający mocznika w składzie. Brak mocznika zapobiegał denaturacji próbek zawierających oligonukleotydy dwuniciowe (po hybrydyzacji). Dzięki temu możliwe było odróżnienie od siebie próbek zawierających oligonukleotydy jednoniciowe (ssDNA) i dwuniciowe (dsDNA) (Rysunek 35). Podczas pracy z żelem niedenaturującym, używany był LP natywny, niezawierający w składzie EDTA i formamidu (Tabela 29).



**Rysunek 35.** Przykładowy skan kliszy rentgenowskiej po wizualizacji wyników rozdziału elektroforetycznego dotyczącego sprawdzenia poprawności znakowania i hybrydyzacji oligonukleotydów. Dolny rząd przedstawia jednoniciowe oligonukleotydy (ssDNA) po znakowaniu izotopowym, górny rząd przedstawia te same oligonukleotydy w formie dwuniciowej (dsDNA), po hybrydyzacji z niciami matrycowymi. Prążki oznaczają kolejno: dU(-5)(+5)dA (3, 4), dU(+5)ScdA (5, 6), dU(-5)(+5)ScdA (7, 8), dU(+5)RcdA (9, 10), dU(-5)(+5)RcdA (11, 12), dU(-5)ScdG (13, 14), dU(+5)ScdG (15, 16), dU(-5)(+5)ScdG (17, 18), dU(-5)RcdG (19, 20), dU(+5)RcdG (21, 22), dU(-5)(+5)RcdG (23, 24).

Składnik	Ilość
Błękit bromofenolowy	25 mg
Cyjanol ksylenu FF	25 mg
Sacharoza	4 g
Woda dejonizowana	do 30 ml
Suma:	30 ml

**Tabela 29.** Skład jakościowy i ilościowy LB natywnego (6x) w przeliczeniu na 30 ml roztworu gotowego.

### 5.1.Autoradiografia

Celem wizualizacji wyników rozdziału elektroforetycznego korzystałem z metody autoradiografii, utrwalając na kliszy rentgenowskiej efekt promieniowania badanych próbek. Metoda ta polega na oddziaływaniu promieniowania emitowanego przez próbkę z materiałem światłoczułym znajdującym się na powierzchni kliszy rentgenowskiej. Następnie kliszę poddaje się standardowej obróbce fotograficznej z wykorzystaniem roztworu utrwalającego i odwiesza do wyschnięcia. Uzyskana w ten sposób klisza przedstawia utrwalony obraz promieniowania poszczególnych próbek, który następnie można poddać dalszej analizie.

### 5.2. Analiza wyników – kwantyfikacja w programie Quantity One

Celem kwantyfikacji wyników rozdziału elektroforetycznego, klisze rentgenowskie skanowałem przy użyciu skanera biurowego, a następnie odczytywałem w programie Quantity One firmy BioRad. Odczyt wyników polegał na pomiarze objętości prążków na kliszy przez program oraz zapisie wyników pomiarów w formie liczbowej. Następnie wykonywałem obróbkę wartości liczbowych w programie Microsoft Excel celem uzyskania odpowiednich krzywych na wykresach. Przykład obliczeń w postaci kinetyki reakcji enzymu FPG wobec nici dU(-6)(+6)H/dA znajduje się poniżej (Rysunek 36, Tabela 30).

Wynik każdego eksperymentu stanowił wykres końcowy kinetyki reakcji enzymatycznej konkretnego enzymu wobec konkretnej nici (oligonukleotydu), zawierający uśrednione

wyniki z trzech powtórzeń (Rysunek 37). Na podstawie wykresów oraz wartości liczbowych oceniano wpływ uszkodzeń DNA na aktywność badanych enzymów.



**Rysunek 36.** Ilustracja metody kwantyfikacji wyników autoradiografii w programie Quantity One. Lewa strona rysunku przedstawia skan kliszy rentgenowskiej z wynikiem pierwszego powtórzenia reakcji enzymatycznej hydrolizy nici dU(-6)/(+6)H/dA przez enzym FPG. Prawa strona rysunku przedstawia sposób zaznaczania prążków oraz teł w programie Quantity One. Pola 1-7 zawierają objętość prążków dla nienaruszonej nici. Pola 8-14 zawierają tła dla pól 1-7. Pola 15-21 zawierają objętość prążków dla nici rozciętej. Pola 22-28 zawierają tła dla pól 15-21. Pola 29-35 zawierają objętość prążków dla produktu pośredniego reakcji. Pola 36-42 zawierają tła dla pól 36-42. **Tabela 30.** Wyniki liczbowe objętości prążków prób badanych oraz teł dla pierwszego powtórzenia reakcji enzymatycznej hydrolizy nici dU(-6)/(+6)H/dA przez enzym FPG. Przedostatnia kolumna przedstawia sumę objętości wszystkich prążków dla danego czasu reakcji po odjęciu tła. Ostatnia kolumna przedstawia wynik procentowy objętości konkretnych prążków w odniesieniu do swszystkich prążków dla danego czasu reakcji.

Czas	Pró	bba badana	Tło		Próba badana	Czas	Wynik	
reakcji	Pole	Objętość	Pole	Objętość	minus tło	reakcji	Suma	[%]
[min.]		prążka		prążka		[min.]		[ · · · ]
0	U1	45263,192	U8	3381,305	41881,887	0	42260,345	99,104
1	U2	43663,675	U9	3165,750	40497,925	1	44130,735	91,768
5	U3	32946,758	U10	2336,927	30609,831	5	55997,707	54,663
15	U4	17611,348	U11	1440,456	16170,892	15	61521,897	26,285
30	U5	5954,117	U12	929,030	5025,087	30	55840,733	8,999
60	U6	2311,042	U13	657,977	1653,065	60	55532,748	2,977
120	U7	2021,028	U14	667,002	1354,026	120	55230,010	2,452
0	U15	934,120	U22	817,045	117,075	0		0,277
1	U16	3973,003	U23	864,005	3108,997 1			7,045
5	U17	24922,301	U24	1195,166	23727,135 5			42,372
15	U18	44376,491	U25	1533,746	42842,745	15		69,638
30	U19	50667,446	U26	1844,670	48822,776	30		87,432
60	U20	54508,090	U27	1853,000	52655,091	60		94,818
120	U21	54528,062	U28	1593,151	52934,911	120		95,844
0	U29	741,920	U36	480,537	261,383	0		0,619
1	U30	1037,360	U37	513,547	523,813	1		1,187
5	U31	2340,232	U38	679,490	1660,742	5		2,966
15	U32	3178,531	U39	670,271	2508,260	15		4,077
30	U33	2668,375	U40	675,504	1992,871	30		3,569
60	U34	1708,434	U41	483,841	1224,593	60		2,205
120	U35	1356,771	U42	415,698	941,073	120		1,704



**Rysunek 37.** Końcowy wykres krzywych kinetyki reakcji enzymu FPG dla nici dU(-6)(+6)H/dA uwzględniający uśrednione wyniki z trzech powtórzeń ekspetymentu.

### 5.3. Walidacja metod badawczych

W celu walidacji metod badawczych, w obrębie każdego eksperymentu wykonałem próby Próby kontrolne przeprowadziłem kontrolne i zerowe. Z wykorzystaniem oligonukleotydów natywnych, niezawierających dodatkowych uszkodzeń DNA w swojej sekwencji, potwierdzając w ten sposób, że stosowane substraty w reakcjach enzymatycznych są właściwe dla badanych enzymów. Próby zerowe przeprowadziłem z wykorzystaniem takich warunków reakcji, w których niemożliwe jest uzyskanie produktu danej katalizy enzymatycznej. W ten sposób potwierdziłem, że w zaprojektowanej metodzie badawczej, oprócz spodziewanej aktywności enzymatycznej, nie występują żadne inne procesy mogące wpływać na wynik eksperymentu. Każdy pojedynczy eksperyment przeprowadziłem trzykrotnie celem uzyskania powtarzalnych i wiarygodnych wyników.

# 6. Dane tabelaryczne

Tabele 31-36 przedstawiają kompletne wyniki wszystkich przeprowadzonych eksperymentów w ramach zadań badawczych. Odniesienia do tych wyników znajdują się w części dyskusji niniejszej pracy.

Nić	Czas	1	2	3	Avg	SD	1	2	3	Avg	SD	1	2	3	Avg	SD
	[min.]	Wyd	ajność reak	cji (nić nier	naruszona)	[%]	W	ydajność re	akcji (nić	rozcięta) [	%]	Wyda	jność reak	cji (produ	kt pośredn	i) [%]
						Natywne	kontrolne	oligonukleo	otydy							
	0	100,00	100,00	99,93	99,98	0,04	0,00	0,00	0,07	0,02	0,04					
	1	100,00	99,75	99,69	99,81	0,17	0,00	0,25	0,31	0,19	0,17					
	5	95,16	80,34	74,26	83,25	10,75	4,84	19,66	25,74	16,75	10,75					
	10	77,13	67,90	62,99	69,34	7,18	22,87	32,10	37,01	30,66	7,18					
	15	66,07	53,91	49,78	56,59	8,47	33,93	46,09	50,22	43,41	8,47					
	20	59,68	46,89	42,35	49,64	8,99	40,32	53,11	57,65	50,36	8,99					
dU0	25	60,31	36,45	27,19	41,32	17,09	39,69	63,55	72,81	58,68	17,09					
400	30	47,44	28,22	23,99	33,22	12,50	52,56	71,78	76,01	66,78	12,50					
	35	8,89	1,95	1,14	3,99	4,26	91,11	98,05	98,86	96,01	4,26					
	40	1,96	1,11	4,85	2,64	1,96	98,04	98,89	95,15	97,36	1,96					
	45	2,43	1,91	2,91	2,41	0,50	97,57	98,09	97,09	97,59	0,50					
	50	1,77	0,35	1,59	1,24	0,78	98,23	99,65	98,41	98,76	0,78					
	55	5,60	0,00	1,10	2,23	2,97	94,40	100,00	98,90	97,77	2,97					
	60	2,78	0,16	0,81	1,25	1,37	97,22	99,84	99,19	98,75	1,37					
	0	100,00	99,78	99,75	99,84	0,14	0,00	0,22	0,25	0,16	0,14	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	1	99,21	97,65	95,76	97,54	1,73	0,40	1,17	1,92	1,16	0,76	0,39	1,18	2,32	1,30	0,97
	5	65,08	51,87	64,52	60,49	7,47	11,82	19,59	14,02	15,15	4,01	23,11	28,54	21,46	24,37	3,70
	10	47,80	46,66	34,77	43,08	7,22	21,53	23,94	30,89	25,45	4,86	30,67	29,40	34,34	31,47	2,57
dU(-5)	15	41,20	26,99	15,87	28,02	12,70	25,90	36,84	46,44	36,39	10,28	32,90	36,18	37,70	35,59	2,45
(+5)dA	20	21,33	13,86	2,91	12,70	9,26	40,85	46,75	64,31	50,64	12,20	37,82	39,38	32,78	36,66	3,45
	25	7,08	9,90	2,39	6,46	3,79	54,49	50,38	65,95	56,94	8,07	38,43	39,72	31,66	36,60	4,33
	30	7,16	5,19	1,60	4,65	2,82	54,68	57,38	75,59	62,55	11,37	38,16	37,43	22,81	32,80	8,66
	35	1,84	3,39	1,49	2,24	1,01	94,17	63,76	96,88	84,94	18,39	3,99	32,85	1,64	12,82	17,38
	40	2,03	4,22	0,67	2,31	1,79	89,76	61,27	98,66	83,23	19,53	8,21	34,51	0,67	14,46	17,77
	45	1,73	4,80	1,06	2,53	2,00	89,75	61,32	94,10	81,72	17,80	8,51	33,88	4,84	15,74	15,81

Tabela 31. Dane liczbowe	e uzyskane w ramacł	ı analızy aktywr	lości enzymu UDG.

	50	2,65	3,28	0,70	2,21	1,35	85,87	94,44	97,98	92,76	6,22	11,48	2,28	1,33	5,03	5,61
	55	14,17	2,15	0,68	5,67	7,40	46,93	77,23	99,22	74,46	26,25	38,89	20,62	0,10	19,87	19,40
	60	1,02	1,91	0,37	1,10	0,77	92,92	76,24	99,13	89,43	11,84	6,06	21,85	0,50	9,47	11,08
							Scd	A								
	0	99,99	99,99	99,77	99,92	0,12	0,01	0,01	0,23	0,08	0,12					
	1	99,96	100,00	99,70	99,88	0,16	0,04	0,00	0,30	0,12	0,16					
	5	99,69	99,91	88,48	96,03	6,54	0,31	0,09	11,52	3,97	6,54					
	10	95,54	82,16	64,86	80,85	15,38	4,46	17,84	35,14	19,15	15,38					
	15	87,94	75,66	57,04	73,54	15,56	12,06	24,34	42,96	26,46	15,56					
	20	70,53	59,95	33,00	54,49	19,35	29,47	40,05	67,00	45,51	19,35					
dU(-5)ScdA	25	60,73	41,06	20,77	40,85	19,98	39,27	58,94	79,23	59,15	19,98					
	30	56,82	88,05	24,24	56,37	31,91	43,18	11,95	75,76	43,63	31,91					
	35	3,16	14,25	30,85	16,09	13,94	96,84	85,75	69,15	83,91	13,94					
	40	20,20	25,36	3,67	16,41	11,33	79,80	74,64	96,33	83,59	11,33					
	45	22,61	3,08	1,97	9,22	11,61	77,39	96,92	98,03	90,78	11,61					
	50	14,48	5,66	5,26	8,47	5,21	85,52	94,34	94,74	91,53	5,21					
	55	15,14	6,05	5,41	8,87	5,44	84,86	93,95	94,59	91,13	5,44					
	60	11,03	14,64	4,79	10,16	4,99	88,97	85,36	95,21	89,84	4,99					
	0	99,53	99,84	100,00	99,79	0,24	0,47	0,16	0,00	0,21	0,24					
	1	97,73	98,36	99,04	98,37	0,66	2,27	1,64	0,96	1,63	0,66					
	5	47,91	44,18	24,11	38,73	12,80	52,09	55,82	75,89	61,27	12,80					
	10	27,41	25,20	13,99	22,20	7,19	72,59	74,80	86,01	77,80	7,19					
	15	15,83	8,11	3,97	9,30	6,02	84,17	91,89	96,03	90,70	6,02					
	20	7,72	7,11	3,69	6,17	2,17	92,28	92,89	96,31	93,83	2,17					
dU(+5)ScdA	25	8,46	4,89	2,50	5,28	3,00	91,54	95,11	97,50	94,72	3,00					
	30	5,33	2,83	11,76	6,64	4,61	94,67	97,17	88,24	93,36	4,61					
	35	4,06	1,98	2,30	2,78	1,12	95,94	98,02	97,70	97,22	1,12					
	40	4,00	1,89	1,86	2,58	1,23	96,00	98,11	98,14	97,42	1,23					
	45	3,16	2,00	2,53	2,56	0,58	96,84	98,00	97,47	97,44	0,58					
	50	3,10	2,12	2,39	2,54	0,51	96,90	97,88	97,61	97,46	0,51					
	55	3,29	1,59	2,30	2,39	0,86	96,71	98,41	97,70	97,61	0,86					
	60	3,95	1,82	1,78	2,52	1,24	96,05	98,18	98,22	97,48	1,24					
dU(-5)	0	99,88	99,35	99,69	99,64	0,27	0,10	0,00	0,18	0,10	0,09	0,02	0,65	0,13	0,26	0,34
(+5)ScdA	1	96,43	94,16	92,95	94,51	1,77	1,62	1,70	2,81	2,04	0,66	1,95	4,14	4,25	3,44	1,30
	5	44,86	32,84	33,11	36,93	6,86	27,72	32,83	29,42	29,99	2,60	27,42	34,34	37,47	33,08	5,14
L	l	1	1	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	1	

	10	35,54	30,60	33,36	33,17	2,47	34,32	34,69	29,55	32,85	2,87	30,14	34,71	37,09	33,98	3,53
	15	27,50	12,45	7,33	15,76	10,48	39,94	45,31	58,95	48,07	9,80	32,56	42,24	33,72	36,17	5,29
	20	5,90	4,75	5,47	5,38	0,58	60,58	58,38	60,13	59,70	1,16	33,52	36,87	34,40	34,93	1,74
	25	4,81	3,37	3,21	3,80	0,88	62,26	64,55	69,85	65,56	3,89	32,93	32,08	26,94	30,65	3,24
	30	4,10	2,11	1,66	2,63	1,30	67,78	79,07	76,32	74,39	5,89	28,12	18,82	22,02	22,98	4,73
	35	1,61	2,04	1,23	1,63	0,40	97,45	95,79	97,77	97,00	1,06	0,94	2,17	0,99	1,36	0,69
	40	1,43	1,79	1,08	1,43	0,35	97,93	88,60	98,24	94,92	5,48	0,63	9,62	0,67	3,64	5,17
	45	1,62	1,19	0,95	1,26	0,34	94,99	95,51	98,23	96,24	1,74	3,39	3,30	0,82	2,50	1,46
	50	2,32	1,10	0,97	1,46	0,75	92,31	97,55	98,11	95,99	3,20	5,37	1,35	0,92	2,54	2,45
	55	11,07	1,42	0,97	4,49	5,70	73,60	96,71	97,02	89,11	13,43	15,33	1,87	2,02	6,40	7,73
	60	1,75	0,86	0,58	1,06	0,61	97,31	97,68	98,47	97,82	0,59	0,94	1,47	0,95	1,12	0,30
						1	Rcd	A	1	1	1	1	1	1	1	1
	0	100,00	100,00	99,97	99,99	0,02	0,00	0,00	0,03	0,01	0,02					
	1	99,93	99,91	98,58	99,47	0,77	0,07	0,09	1,42	0,53	0,77					
	5	93,37	95,63	53,90	80,97	23,47	6,63	4,37	46,10	19,03	23,47					
	10	63,87	60,52	40,45	54,95	12,67	36,13	39,48	59,55	45,05	12,67					
	15	45,57	42,05	16,38	34,67	15,93	54,43	57,95	83,62	65,33	15,93					
	20	45,60	32,78	6,76	28,38	19,79	54,40	67,22	93,24	71,62	19,79					
dU(-5)RcdA	25	15,70	25,84	5,33	15,62	10,26	84,30	74,16	94,67	84,38	10,26					
	30	7,32	16,19	6,60	10,04	5,34	92,68	83,81	93,40	89,96	5,34					
	35	4,37	2,76	1,09	2,74	1,64	95,63	97,24	98,91	97,26	1,64					
	40	4,31	2,10	0,75	2,39	1,80	95,69	97,90	99,25	97,61	1,80					
	45	3,19	1,48	1,60	2,09	0,95	96,81	98,52	98,40	97,91	0,95					
	50	0,66	0,20	2,23	1,03	1,06	99,34	99,80	97,77	98,97	1,06					
	55	8,25	0,23	0,30	2,93	4,61	91,75	99,77	99,70	97,07	4,61					
	60	0,40	0,54	1,40	0,78	0,54	99,60	99,46	98,60	99,22	0,54					
	0	98,00	100,00	99,96	99,32	1,14	2,00	0,00	0,04	0,68	1,14					
	1	93,74	100,00	97,15	96,96	3,13	6,26	0,00	2,85	3,04	3,13					
	5	60,28	69,96	68,17	66,14	5,15	39,72	30,04	31,83	33,86	5,15					
	10	58,21	56,61	58,63	57,82	1,07	41,79	43,39	41,37	42,18	1,07					
dU(+5)RcdA	15	47,38	53,60	47,52	49,50	3,55	52,62	46,40	52,48	50,50	3,55					
	20	37,08	38,67	30,48	35,41	4,34	62,92	61,33	69,52	64,59	4,34					
	25	29,29	16,94	28,51	24,91	6,92	70,71	83,06	71,49	75,09	6,92					
	30	31,07	30,72	7,10	22,96	13,74	68,93	69,28	92,90	77,04	13,74					
	35	18,54	28,67	6,11	17,78	11,30	81,46	71,33	93,89	82,22	11,30					

	40	15,70	9,85	7,17	10,91	4,36	84,30	90,15	92,83	89,09	4,36					
	45	16,57	10,67	10,43	12,56	3,48	83,43	89,33	89,57	87,44	3,48					
	50	16,43	21,69	9,58	15,90	6,07	83,57	78,31	90,42	84,10	6,07					
	55	19,99	22,33	16,44	19,59	2,97	80,01	77,67	83,56	80,41	2,97					
	60	17,38	26,08	19,06	20,84	4,61	82,62	73,92	80,94	79,16	4,61					
	0	96,30	98,74	99,39	98,14	1,63	1,32	1,26	0,61	1,06	0,40	2,39	0,00	0,00	0,80	1,38
	1	90,05	96,04	97,61	94,57	3,99	3,95	3,18	2,39	3,17	0,78	6,00	0,77	0,00	2,26	3,26
	5	62,61	69,34	74,71	68,89	6,06	17,39	15,42	11,34	14,72	3,09	19,99	15,25	13,95	16,40	3,18
	10	51,42	50,37	48,27	50,02	1,60	23,19	24,24	25,08	24,17	0,95	25,38	25,39	26,65	25,81	0,73
	15	46,64	37,28	50,58	44,83	6,83	25,81	32,79	23,43	27,34	4,86	27,55	29,93	25,99	27,82	1,99
	20	38,20	42,14	34,23	38,19	3,96	31,09	30,18	34,70	31,99	2,39	30,71	27,68	31,07	29,82	1,87
dU(-5)	25	38,02	28,14	30,51	32,22	5,16	31,19	42,33	37,87	37,13	5,61	30,79	29,53	31,62	30,65	1,05
(+5)RcdA	30	37,01	16,83	16,79	23,55	11,66	32,06	55,08	53,09	46,75	12,75	30,92	28,08	30,12	29,71	1,46
	35	11,81	16,26	6,47	11,51	4,90	64,33	56,96	84,92	68,74	14,49	23,86	26,78	8,61	19,75	9,76
	40	15,19	18,51	14,51	16,07	2,14	59,12	56,14	68,96	61,41	6,71	25,70	25,35	16,52	22,52	5,20
	45	15,30	16,52	14,89	15,57	0,85	61,20	65,60	67,82	64,87	3,37	23,50	17,87	17,29	19,55	3,43
	50	20,33	72,72	12,86	35,30	32,62	59,59	15,05	82,73	52,46	34,39	20,08	12,23	4,42	12,24	7,83
	55	18,47	20,24	19,75	19,48	0,91	77,66	74,81	74,69	75,72	1,68	3,87	4,96	5,56	4,80	0,86
	60	18,91	20,22	24,97	21,36	3,19	70,21	73,77	70,65	71,54	1,94	10,88	6,02	4,38	7,09	3,38
							ScdO	3	•					•		
	0	99,67	100,00	100,00	99,89	0,19	0,33	0,00	0,00	0,11	0,19					
	1	99,62	99,86	99,86	99,78	0,14	0,38	0,14	0,14	0,22	0,14					
	5	90,11	83,76	77,97	83,95	6,07	9,89	16,24	22,03	16,05	6,07					
	10	68,94	63,08	53,22	61,75	7,94	31,06	36,92	46,78	38,25	7,94					
	15	59,41	50,49	45,70	51,87	6,96	40,59	49,51	54,30	48,13	6,96					
	20	43,19	40,98	38,52	40,90	2,33	56,81	59,02	61,48	59,10	2,33					
dU(-5)ScdG	25	35,71	39,87	27,87	34,49	6,09	64,29	60,13	72,13	65,51	6,09					
	30	27,86	30,42	13,96	24,08	8,86	72,14	69,58	86,04	75,92	8,86					
	35	10,74	0,85	2,69	4,76	5,26	89,26	99,15	97,31	95,24	5,26					
	40	11,84	0,26	10,09	7,39	6,24	88,16	99,74	89,91	92,61	6,24					
	45	17,18	3,47	12,34	11,00	6,95	82,82	96,53	87,66	89,00	6,95					
	50	6,59	3,02	4,19	4,60	1,82	93,41	96,98	95,81	95,40	1,82					
	55	7,45	5,34	4,59	5,79	1,48	92,55	94,66	95,41	94,21	1,48					
	60	1,84	6,83	0,74	3,14	3,25	98,16	93,17	99,26	96,86	3,25					
dU(+5)ScdG	0	100,00	100,00	100,00	100,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00					

	1	100,00	99,81	100,00	99,94	0,11	0,00	0,19	0,00	0,06	0,11					
	5	77,55	78,42	67,68	74,55	5,96	22,45	21,58	32,32	25,45	5,96					
	10	63,30	58,53	37,58	53,14	13,68	36,70	41,47	62,42	46,86	13,68					
	15	49,94	36,41	28,40	38,25	10,88	50,06	63,59	71,60	61,75	10,88					
	20	34,68	28,64	15,19	26,17	9,98	65,32	71,36	84,81	73,83	9,98					
	25	27,97	23,31	19,94	23,74	4,03	72,03	76,69	80,06	76,26	4,03					
	30	24,12	11,10	1,12	12,11	11,54	75,88	88,90	98,88	87,89	11,54					
	35	0,24	0,85	0,08	0,39	0,40	99,76	99,15	99,92	99,61	0,40					
	40	0,41	0,99	0,12	0,51	0,44	99,59	99,01	99,88	99,49	0,44					
	45	0,74	1,05	0,16	0,65	0,45	99,26	98,95	99,84	99,35	0,45					
	50	1,12	0,75	0,25	0,70	0,44	98,88	99,25	99,75	99,30	0,44					
	55	0,36	0,88	0,25	0,50	0,34	99,64	99,12	99,75	99,50	0,34					
	60	0,28	0,43	0,15	0,29	0,14	99,72	99,57	99,85	99,71	0,14					
	0	100,00	99,98	100,00	99,99	0,01	0,00	0,02	0,00	0,01	0,01	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	1	99,99	98,02	96,03	98,02	1,98	0,01	1,04	1,34	0,79	0,70	0,00	0,95	2,63	1,19	1,33
	5	75,09	70,15	59,62	68,29	7,90	12,19	16,35	19,99	16,18	3,90	12,72	13,49	20,38	15,53	4,22
	10	48,10	31,26	37,12	38,82	8,55	27,40	41,64	32,57	33,87	7,21	24,50	27,10	30,32	27,31	2,91
	15	36,61	16,85	27,00	26,82	9,89	35,84	53,74	39,72	43,10	9,42	27,55	29,42	33,28	30,08	2,92
	20	28,65	9,62	15,37	17,88	9,76	43,76	62,52	49,99	52,09	9,55	27,58	27,86	34,64	30,03	4,00
dU(-5)	25	15,57	2,98	27,08	15,21	12,05	55,43	72,70	40,73	56,29	16,01	29,00	24,31	32,19	28,50	3,96
(+5)ScdG	30	5,18	0,59	4,73	3,50	2,53	69,08	81,65	61,27	70,67	10,28	25,73	17,76	34,00	25,83	8,12
	35	0,19	1,57	3,75	1,84	1,80	99,43	77,03	63,20	79,89	18,28	0,38	21,39	33,05	18,27	16,56
	40	0,77	0,12	1,86	0,92	0,88	89,18	94,83	75,32	86,44	10,04	10,05	5,05	22,82	12,64	9,16
	45	10,05	0,19	0,41	3,55	5,63	60,47	95,08	99,51	85,02	21,38	29,48	4,73	0,08	11,43	15,81
	50	0,51	0,01	0,43	0,32	0,27	86,30	99,01	99,53	94,95	7,49	13,19	0,97	0,04	4,74	7,34
	55	0,12	0,02	0,72	0,29	0,38	90,66	99,98	98,92	96,52	5,10	9,23	0,00	0,36	3,20	5,22
	60	0,29	0,04	0,40	0,24	0,18	93,15	99,79	94,23	95,72	3,56	6,56	0,17	5,37	4,03	3,40
				_	-	-	Rcd	G		_						r
	0	99,50	99,98	100,00	99,83	0,28	0,50	0,02	0,00	0,17	0,28					
	1	99,30	99,94	99,36	99,53	0,35	0,70	0,06	0,64	0,47	0,35					
	5	92,74	90,06	75,41	86,07	9,33	7,26	9,94	24,59	13,93	9,33					
dU(-5)RcdG	10	76,26	70,53	52,30	66,36	12,51	23,74	29,47	47,70	33,64	12,51					
	15	67,65	65,08	35,81	56,18	17,69	32,35	34,92	64,19	43,82	17,69					
	20	58,52	49,25	27,19	44,98	16,10	41,48	50,75	72,81	55,02	16,10					
	25	50,10	54,18	27,26	43,85	14,51	49,90	45,82	72,74	56,15	14,51					

	30	49,96	28,87	17,63	32,15	16,41	50,04	71,13	82,37	67,85	16,41					
	35	2,46	18,35	0,44	7,08	9,81	97,54	81,65	99,56	92,92	9,81					
	40	14,94	12,85	2,81	10,20	6,49	85,06	87,15	97,19	89,80	6,49					
	45	7,44	5,68	0,25	4,46	3,75	92,56	94,32	99,75	95,54	3,75					
	50	5,95	6,94	1,33	4,74	2,99	94,05	93,06	98,67	95,26	2,99					
	55	13,31	13,21	1,28	9,27	6,92	86,69	86,79	98,72	90,73	6,92					
	60	29,95	12,32	0,64	14,31	14,75	70,05	87,68	99,36	85,69	14,75					
	0	100,00	99,84	100,00	99,95	0,09	0,00	0,16	0,00	0,05	0,09					
	1	99,91	96,95	100,00	98,95	1,73	0,09	3,05	0,00	1,05	1,73					
	5	63,89	58,79	84,52	69,06	13,62	36,11	41,21	15,48	30,94	13,62					
	10	44,58	30,67	41,16	38,80	7,25	55,42	69,33	58,84	61,20	7,25					
	15	28,67	23,51	14,28	22,15	7,29	71,33	76,49	85,72	77,85	7,29					
	20	12,14	5,01	3,72	6,95	4,53	87,86	94,99	96,28	93,05	4,53					
dU(+5)RcdG	25	8,46	4,31	1,03	4,60	3,73	91,54	95,69	98,97	95,40	3,73					
	30	4,98	2,10	0,31	2,46	2,35	95,02	97,90	99,69	97,54	2,35					
	35	0,94	1,99	0,19	1,04	0,90	99,06	98,01	99,81	98,96	0,90					
	40	7,00	2,49	0,02	3,17	3,54	93,00	97,51	99,98	96,83	3,54					
	45	3,22	1,14	0,01	1,46	1,63	96,78	98,86	99,99	98,54	1,63					
	50	1,42	1,54	0,03	0,99	0,84	98,58	98,46	99,97	99,01	0,84					
	55	0,40	1,87	0,10	0,79	0,95	99,60	98,13	99,90	99,21	0,95					
	60	0,38	1,20	0,01	0,53	0,61	99,62	98,80	99,99	99,47	0,61					
	0	99,71	99,79	99,86	99,79	0,08	0,12	0,00	0,03	0,05	0,07	0,16	0,21	0,11	0,16	0,05
	1	85,07	82,78	86,66	84,84	1,95	6,12	7,44	5,93	6,49	0,82	8,82	9,78	7,41	8,67	1,19
	5	51,45	46,45	48,63	48,84	2,51	22,95	26,88	26,86	25,56	2,27	25,60	26,67	24,51	25,59	1,08
	10	46,45	30,40	22,90	33,25	12,03	26,97	38,34	48,29	37,87	10,67	26,58	31,26	28,81	28,88	2,34
	15	28,93	17,64	18,96	21,84	6,17	39,92	50,62	54,59	48,38	7,59	31,15	31,74	26,45	29,78	2,90
	20	19,99	10,09	14,55	14,87	4,96	47,82	64,54	62,52	58,29	9,13	32,19	25,37	22,93	26,83	4,80
dU(-5)	25	17,60	4,64	28,39	16,87	11,89	52,92	79,70	48,10	60,24	17,02	29,48	15,67	23,51	22,88	6,93
(+5)RcdG	30	3,98	8,59	6,57	6,38	2,31	77,03	74,69	80,98	77,57	3,18	18,99	16,71	12,45	16,05	3,32
	35	14,14	5,83	8,26	9,41	4,28	77,05	92,26	84,83	84,71	7,60	8,80	1,91	6,91	5,88	3,56
	40	32,14	9,71	21,77	21,21	11,22	56,58	87,56	69,15	71,10	15,58	11,28	2,73	9,08	7,70	4,44
	45	18,96	12,18	17,79	16,31	3,63	72,47	86,88	74,65	78,00	7,77	8,57	0,94	7,56	5,69	4,14
	50	21,46	17,18	15,97	18,20	2,88	70,88	82,18	81,11	78,06	6,24	7,66	0,64	2,91	3,74	3,58
	55	24,19	34,08	13,04	23,77	10,53	73,71	62,25	82,16	72,71	9,99	2,10	3,67	4,80	3,52	1,36
	60	19,73	23,10	18,49	20,44	2,38	80,27	72,66	79,10	77,34	4,10	0,00	4,25	2,40	2,22	2,13

Nić	Czas [min ]	1	2	3	Avg	SD	1	2	3	Avg	SD
INC	CZas [inin.]	1	Wydajność rea	ıkcji (nić nien	aruszona) [%]			Wydajność	reakcji (nić ro	zcięta) [%]	
				Natywne kor	ntrolne oligon	ukleotydy					
	0	99,29	96,84	100,00	98,71	1,66	0,71	3,16	0,00	1,29	1,66
	1	100,00	98,74	100,00	99,58	0,73	0,00	1,26	0,00	0,42	0,73
	5	99,40	94,82	100,00	98,07	2,83	0,60	5,18	0,00	1,93	2,83
	10	98,97	93,65	99,88	97,50	3,37	1,03	6,35	0,12	2,50	3,37
	15	97,98	91,36	99,54	96,29	4,35	2,02	8,64	0,46	3,71	4,35
	20	95,94	87,18	98,85	93,99	6,07	4,06	12,82	1,15	6,01	6,07
dU0	25	92,19	84,92	97,08	91,40	6,12	7,81	15,08	2,92	8,60	6,12
	30	79,20	61,86	70,79	70,62	8,67	20,80	38,14	29,21	29,38	8,67
	60	57,27	36,75	53,17	49,06	10,86	42,73	63,25	46,83	50,94	10,86
	90	33,05	27,38	36,75	32,39	4,72	66,95	72,62	63,25	67,61	4,72
	120	12,49	3,99	0,56	5,68	6,14	87,51	96,01	99,44	94,32	6,14
	150	5,95	0,00	0,32	2,09	3,35	94,05	100,00	99,68	97,91	3,35
	180	7,23	0,00	0,10	2,44	4,15	92,77	100,00	99,90	97,56	4,15
	0	99,93	99,99	99,80	99,91	0,10	0,07	0,01	0,20	0,09	0,10
	1	100,00	100,00	99,92	99,97	0,04	0,00	0,00	0,08	0,03	0,04
	5	99,84	97,84	96,09	97,92	1,87	0,16	2,16	3,91	2,08	1,87
	10	83,76	90,22	87,68	87,22	3,25	16,24	9,78	12,32	12,78	3,25
	15	73,53	77,18	73,06	74,59	2,26	26,47	22,82	26,94	25,41	2,26
dU(-5)	20	59,71	60,79	63,61	61,37	2,02	40,29	39,21	36,39	38,63	2,02
(+5)dA	25	55,73	50,66	64,42	56,94	6,96	44,27	49,34	35,58	43,06	6,96
(13)41	30	34,06	26,12	36,18	32,12	5,30	65,94	73,88	63,82	67,88	5,30
	60	8,14	6,86	10,33	8,44	1,75	91,86	93,14	89,67	91,56	1,75
	90	0,18	1,45	0,00	0,54	0,79	99,82	98,55	100,00	99,46	0,79
	120	0,02	2,71	0,00	0,91	1,56	99,98	97,29	100,00	99,09	1,56
	150	0,36	1,20	0,00	0,52	0,62	99,64	98,80	100,00	99,48	0,62
	180	0,06	0,67	0,00	0,24	0,37	99,94	99,33	100,00	99,76	0,37
		I	I	1	ScdA	I	1	I	I	I	I
	0	99,54	99,81	99,79	99,71	0,15	0,46	0,19	0,21	0,29	0,15
dU(-5)ScdA	1	99,97	99,64	99,76	99,79	0,17	0,03	0,36	0,24	0,21	0,17
	5	98,01	98,31	99,15	98,49	0,59	1,99	1,69	0,85	1,51	0,59
	10	96,38	96,36	98,04	96,93	0,96	3,62	3,64	1,96	3,07	0,96

### Tabela 32. Dane liczbowe uzyskane w ramach analizy aktywności enzymu hAPE1.

	15	93,24	91,40	96,01	93,55	2,32	6,76	8,60	3,99	6,45	2,32
	20	78,57	82,29	92,32	84,39	7,11	21,43	17,71	7,68	15,61	7,11
	25	79,68	79,18	87,31	82,06	4,56	20,32	20,82	12,69	17,94	4,56
	30	14,22	56,13	80,56	50,30	33,55	85,78	43,87	19,44	49,70	33,55
	60	13,09	6,79	9,32	9,73	3,17	86,91	93,21	90,68	90,27	3,17
	90	2,01	2,88	4,83	3,24	1,44	97,99	97,12	95,17	96,76	1,44
	120	1,41	0,78	0,63	0,94	0,41	98,59	99,22	99,37	99,06	0,41
	150	0,71	0,90	2,06	1,22	0,73	99,29	99,10	97,94	98,78	0,73
	180	0,67	0,67	0,42	0,59	0,15	99,33	99,33	99,58	99,41	0,15
	0	100,00	100,00	99,84	99,95	0,09	0,00	0,00	0,16	0,05	0,09
	1	99,89	97,76	98,85	98,83	1,07	0,11	2,24	1,15	1,17	1,07
	5	88,41	88,56	90,93	89,30	1,41	11,59	11,44	9,07	10,70	1,41
	10	75,35	65,81	70,51	70,56	4,77	24,65	34,19	29,49	29,44	4,77
	15	57,09	51,77	51,38	53,41	3,18	42,91	48,23	48,62	46,59	3,18
	20	52,08	41,53	43,19	45,60	5,67	47,92	58,47	56,81	54,40	5,67
dU(+5)ScdA	25	40,78	29,27	38,55	36,20	6,10	59,22	70,73	61,45	63,80	6,10
	30	38,40	25,29	29,24	30,97	6,72	61,60	74,71	70,76	69,03	6,72
	60	11,34	13,75	8,50	11,20	2,63	88,66	86,25	91,50	88,80	2,63
	90	2,96	3,24	4,68	3,63	0,92	97,04	96,76	95,32	96,37	0,92
	120	2,69	3,43	3,46	3,19	0,44	97,31	96,57	96,54	96,81	0,44
	150	2,14	2,82	3,46	2,81	0,66	97,86	97,18	96,54	97,19	0,66
	180	1,91	3,57	13,00	6,16	5,98	98,09	96,43	87,00	93,84	5,98
	0	100,00	99,48	99,49	99,66	0,30	0,00	0,52	0,51	0,34	0,30
	1	99,92	99,24	99,66	99,60	0,34	0,08	0,76	0,34	0,40	0,34
	5	89,17	71,69	96,49	85,78	12,74	10,83	28,31	3,51	14,22	12,74
	10	71,05	46,53	90,37	69,32	21,97	28,95	53,47	9,63	30,68	21,97
	15	56,28	28,22	60,58	48,36	17,57	43,72	71,78	39,42	51,64	17,57
dU(-5)	20	35,53	18,09	60,63	38,09	21,39	64,47	81,91	39,37	61,91	21,39
(+5)ScdA	25	31,34	12,25	35,22	26,27	12,29	68,66	87,75	64,78	73,73	12,29
	30	42,70	2,66	10,04	18,47	21,31	57,30	97,34	89,96	81,53	21,31
	60	9,32	1,89	3,23	4,81	3,96	90,68	98,11	96,77	95,19	3,96
	90	3,67	1,12	1,88	2,22	1,31	96,33	98,88	98,12	97,78	1,31
	120	2,38	0,62	1,72	1,57	0,89	97,62	99,38	98,28	98,43	0,89
	150	1,73	1,31	1,19	1,41	0,29	98,27	98,69	98,81	98,59	0,29
	180	0,87	0,48	0,87	0,74	0,23	99,13	99,52	99,13	99,26	0,23

					RcdA						
	0	99,89	99,85	97,23	98,99	1,52	0,11	0,15	2,77	1,01	1,52
	1	99,79	99,34	94,37	97,83	3,01	0,21	0,66	5,63	2,17	3,01
	5	91,32	76,60	78,02	81,98	8,12	8,68	23,40	21,98	18,02	8,12
	10	76,77	51,80	37,80	55,46	19,74	23,23	48,20	62,20	44,54	19,74
	15	50,25	35,84	48,58	44,89	7,88	49,75	64,16	51,42	55,11	7,88
	20	31,83	11,18	10,53	17,85	12,12	68,17	88,82	89,47	82,15	12,12
dU(-5)RcdA	25	27,93	10,01	4,91	14,28	12,09	72,07	89,99	95,09	85,72	12,09
	30	8,27	3,20	1,25	4,24	3,63	91,73	96,80	98,75	95,76	3,63
	60	0,10	0,68	0,40	0,39	0,29	99,90	99,32	99,60	99,61	0,29
	90	0,14	0,76	0,36	0,42	0,31	99,86	99,24	99,64	99,58	0,31
	120	0,30	0,90	0,20	0,47	0,38	99,70	99,10	99,80	99,53	0,38
	150	0,33	0,87	0,23	0,48	0,34	99,67	99,13	99,77	99,52	0,34
	180	0,59	1,13	0,05	0,59	0,54	99,41	98,87	99,95	99,41	0,54
	0	99,98	99,91	99,83	99,90	0,08	0,02	0,09	0,17	0,10	0,08
	1	97,00	94,31	94,40	95,24	1,53	3,00	5,69	5,60	4,76	1,53
	5	81,86	79,20	73,89	78,32	4,06	18,14	20,80	26,11	21,68	4,06
	10	70,97	62,27	60,04	64,43	5,78	29,03	37,73	39,96	35,57	5,78
	15	62,09	87,61	44,78	64,83	21,55	37,91	12,39	55,22	35,17	21,55
	20	50,36	41,04	41,99	44,46	5,13	49,64	58,96	58,01	55,54	5,13
dU(+5)RcdA	25	44,15	40,79	36,96	40,63	3,60	55,85	59,21	63,04	59,37	3,60
	30	41,05	22,36	24,16	29,19	10,31	58,95	77,64	75,84	70,81	10,31
	60	19,78	4,25	8,49	10,84	8,03	80,22	95,75	91,51	89,16	8,03
	90	14,51	2,19	3,22	6,64	6,84	85,49	97,81	96,78	93,36	6,84
	120	6,74	3,18	6,28	5,40	1,93	93,26	96,82	93,72	94,60	1,93
	150	5,56	3,56	8,63	5,91	2,56	94,44	96,44	91,37	94,09	2,56
	180	6,51	3,15	5,13	4,93	1,69	93,49	96,85	94,87	95,07	1,69
	0	99,94	99,87	100,00	99,94	0,07	0,06	0,13	0,00	0,06	0,07
	1	97,43	97,75	100,00	98,39	1,40	2,57	2,25	0,00	1,61	1,40
	5	90,46	82,48	100,00	90,98	8,77	9,54	17,52	0,00	9,02	8,77
dU(-5)	10	73,49	72,85	72,40	72,92	0,55	26,51	27,15	27,60	27,08	0,55
(+5)RcdA	15	61,51	62,10	57,42	60,34	2,55	38,49	37,90	42,58	39,66	2,55
	20	59,55	50,29	56,59	55,47	4,73	40,45	49,71	43,41	44,53	4,73
	25	44,39	32,23	44,05	40,22	6,93	55,61	67,77	55,95	59,78	6,93
	30	50,30	20,77	34,06	35,04	14,79	49,70	79,23	65,94	64,96	14,79

	60	37,27	29,28	28,30	31,62	4,92	62,73	70,72	71,70	68,38	4,92
	90	11,30	3,92	8,82	8,02	3,76	88,70	96,08	91,18	91,98	3,76
	120	4,71	6,04	7,93	6,22	1,62	95,29	93,96	92,07	93,78	1,62
	150	4,19	2,36	5,23	3,93	1,45	95,81	97,64	94,77	96,07	1,45
	180	5,42	1,93	3,50	3,62	1,75	94,58	98,07	96,50	96,38	1,75
		1			ScdG						1
	0	99,87	100,00	99,77	99,88	0,11	0,13	0,00	0,23	0,12	0,11
	1	100,00	100,00	99,69	99,90	0,18	0,00	0,00	0,31	0,10	0,18
	5	89,73	98,93	95,28	94,65	4,63	10,27	1,07	4,72	5,35	4,63
	10	74,02	91,22	83,61	82,95	8,62	25,98	8,78	16,39	17,05	8,62
	15	57,17	79,51	69,58	68,75	11,19	42,83	20,49	30,42	31,25	11,19
	20	44,84	67,24	61,06	57,71	11,57	55,16	32,76	38,94	42,29	11,57
dU(-5)ScdG	25	44,13	56,96	51,53	50,87	6,44	55,87	43,04	48,47	49,13	6,44
	30	28,53	18,13	22,33	23,00	5,23	71,47	81,87	77,67	77,00	5,23
	60	6,22	6,95	8,31	7,16	1,06	93,78	93,05	91,69	92,84	1,06
	90	1,42	0,98	2,06	1,48	0,54	98,58	99,02	97,94	98,52	0,54
	120	0,84	0,94	2,08	1,29	0,69	99,16	99,06	97,92	98,71	0,69
	150	0,66	1,03	1,40	1,03	0,37	99,34	98,97	98,60	98,97	0,37
	180	0,27	0,59	1,20	0,68	0,47	99,73	99,41	98,80	99,32	0,47
	0	99,82	100,00	99,97	99,93	0,10	0,18	0,00	0,03	0,07	0,10
	1	94,37	100,00	99,17	97,85	3,04	5,63	0,00	0,83	2,15	3,04
	5	81,24	97,00	86,87	88,37	7,99	18,76	3,00	13,13	11,63	7,99
	10	69,39	74,92	67,07	70,46	4,03	30,61	25,08	32,93	29,54	4,03
	15	54,72	61,49	64,31	60,17	4,93	45,28	38,51	35,69	39,83	4,93
	20	43,52	30,93	40,15	38,20	6,52	56,48	69,07	59,85	61,80	6,52
dU(+5)ScdG	25	40,68	28,94	35,90	35,17	5,91	59,32	71,06	64,10	64,83	5,91
	30	22,03	5,98	9,56	12,52	8,42	77,97	94,02	90,44	87,48	8,42
	60	5,41	0,00	2,23	2,55	2,72	94,59	100,00	97,77	97,45	2,72
	90	0,75	0,00	0,33	0,36	0,37	99,25	100,00	99,67	99,64	0,37
	120	0,75	0,00	1,35	0,70	0,68	99,25	100,00	98,65	99,30	0,68
	150	0,90	0,00	0,23	0,38	0,47	99,10	100,00	99,77	99,62	0,47
	180	0,62	0,00	0,29	0,30	0,31	99,38	100,00	99,71	99,70	0,31
dU(-5)	0	99,99	100,00	100,00	100,00	0,00	0,01	0,00	0,00	0,00	0,00
(+5)ScdG	1	99,57	100,00	99,98	99,85	0,24	0,43	0,00	0,02	0,15	0,24
( ),====	5	87,73	99,95	97,74	95,14	6,51	12,27	0,05	2,26	4,86	6,51
L		1					1		1	1	1

	10	74,06	86,44	86,05	82,18	7,03	25,94	13,56	13,95	17,82	7,03
	15	60,77	68,02	61,17	63,32	4,07	39,23	31,98	38,83	36,68	4,07
	20	47,50	47,50	49,65	48,21	1,24	52,50	52,50	50,35	51,79	1,24
	25	38,59	57,63	43,18	46,47	9,94	61,41	42,37	56,82	53,53	9,94
	30	29,64	21,44	22,35	24,48	4,49	70,36	78,56	77,65	75,52	4,49
	60	10,72	4,81	17,49	11,01	6,35	89,28	95,19	82,51	88,99	6,35
	90	2,57	0,75	0,77	1,36	1,05	97,43	99,25	99,23	98,64	1,05
	120	0,85	0,01	0,17	0,34	0,44	99,15	99,99	99,83	99,66	0,44
	150	0,59	0,00	0,01	0,20	0,34	99,41	100,00	99,99	99,80	0,34
	180	2,43	0,11	0,00	0,85	1,37	97,57	99,89	100,00	99,15	1,37
	1		J	J	RcdG				J	J	
	0	100,00	100,00	100,00	100,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	1	100,00	100,00	100,00	100,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	5	99,84	98,93	96,98	98,58	1,46	0,16	1,07	3,02	1,42	1,46
	10	91,84	87,39	84,14	87,79	3,87	8,16	12,61	15,86	12,21	3,87
	15	79,42	80,11	66,97	75,50	7,40	20,58	19,89	33,03	24,50	7,40
	20	79,27	73,43	58,18	70,29	10,89	20,73	26,57	41,82	29,71	10,89
dU(-5)RcdG	25	47,85	56,14	55,39	53,13	4,59	52,15	43,86	44,61	46,87	4,59
	30	12,29	30,89	37,77	26,98	13,18	87,71	69,11	62,23	73,02	13,18
	60	1,91	19,81	9,29	10,34	9,00	98,09	80,19	90,71	89,66	9,00
	90	2,34	1,05	3,28	2,22	1,12	97,66	98,95	96,72	97,78	1,12
	120	1,89	0,59	2,61	1,70	1,02	98,11	99,41	97,39	98,30	1,02
	150	1,23	0,58	11,22	4,34	5,96	98,77	99,42	88,78	95,66	5,96
	180	1,43	0,52	1,82	1,26	0,67	98,57	99,48	98,18	98,74	0,67
	0	100,00	100,00	100,00	100,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	1	98,38	100,00	100,00	99,46	0,93	1,62	0,00	0,00	0,54	0,93
	5	93,27	99,98	99,18	97,48	3,66	6,73	0,02	0,82	2,52	3,66
	10	84,33	91,38	92,38	89,36	4,39	15,67	8,62	7,62	10,64	4,39
	15	59,69	70,30	83,95	71,31	12,16	40,31	29,70	16,05	28,69	12,16
dU(+5)RcdG	20	70,80	44,57	63,97	59,78	13,61	29,20	55,43	36,03	40,22	13,61
	25	0,00	33,83	56,36	30,06	28,37	100,00	66,17	43,64	69,94	28,37
	30	11,31	6,06	26,67	14,68	10,71	88,69	93,94	73,33	85,32	10,71
	60	6,54	5,12	7,70	6,45	1,29	93,46	94,88	92,30	93,55	1,29
	90	0,11	0,00	0,35	0,15	0,18	99,89	100,00	99,65	99,85	0,18
	120	0,01	0,00	0,00	0,00	0,01	99,99	100,00	100,00	100,00	0,01

	150	0,01	0,00	0,00	0,00	0,01	99,99	100,00	100,00	100,00	0,01
	180	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	100,00	100,00	100,00	100,00	0,00
	0	100,00	99,96	99,55	99,84	0,25	0,00	0,04	0,45	0,16	0,25
	1	99,90	96,73	99,61	98,75	1,75	0,10	3,27	0,39	1,25	1,75
	5	97,26	92,30	96,16	95,24	2,61	2,74	7,70	3,84	4,76	2,61
	10	82,94	83,41	96,96	87,77	7,97	17,06	16,59	3,04	12,23	7,97
	15	85,43	68,08	81,35	78,29	9,07	14,57	31,92	18,65	21,71	9,07
dU(-5)	20	68,14	68,01	72,83	69,66	2,75	31,86	31,99	27,17	30,34	2,75
(+5)RcdG	25	39,90	54,89	68,07	54,29	14,10	60,10	45,11	31,93	45,71	14,10
	30	0,72	39,54	20,70	20,32	19,41	99,28	60,46	79,30	79,68	19,41
	60	0,01	62,91	1,19	21,37	35,98	99,99	37,09	98,81	78,63	35,98
	90	0,00	30,08	0,81	10,30	17,14	100,00	69,92	99,19	89,70	17,14
	120	2,41	0,33	0,27	1,01	1,22	97,59	99,67	99,73	98,99	1,22
	150	0,00	0,59	0,04	0,21	0,33	100,00	99,41	99,96	99,79	0,33
	180	0,00	0,21	0,00	0,07	0,12	100,00	99,79	100,00	99,93	0,12

Tabela 33. Dane	liczbowe	uzyskane v	w ramach	analizy	aktywności	enzymu	OGG1.

	Czas	1	2	3	Avg	SD	1	2	3	Avg	SD	1	2	3	Avg	SD
Nić	[min.]	117				[0/]	117	1.1	1			¥71			1.4	i) [0/]
		wydajność reakcji (ne menaruszona) [70]					w	ydajnose re	akeji (nie i	ozcięta) [9	% J	wyda	ijnose reak	cji (produ	kt posredr	11) [%]
		1				Natywne	kontrolne	oligonukleo	tydy							
	0	98,58	98,95	99,99	99,17	0,73	1,36	1,03	0,01	0,80	0,70	0,06	0,02	0,00	0,03	0,03
	30	95,73	97,22	98,40	97,12	1,34	4,27	2,47	1,54	2,76	1,39	0,00	0,31	0,06	0,12	0,16
-6/+6	60	90,13	94,70	94,84	93,23	2,68	9,44	5,30	5,04	6,59	2,47	0,43	0,00	0,12	0,18	0,22
(H/dA)	120	64,17	77,51	76,60	72,76	7,45	35,28	22,49	23,22	26,99	7,18	0,55	0,00	0,18	0,24	0,28
()	180	45,33	53,14	52,15	50,21	4,25	54,42	46,70	47,60	49,58	4,22	0,24	0,16	0,25	0,22	0,05
	240	18,42	19,48	23,87	20,59	2,89	81,25	80,49	75,99	79,24	2,84	0,33	0,03	0,15	0,17	0,15
	300	4,40	5,96	4,90	5,09	0,80	95,26	93,77	94,70	94,58	0,75	0,34	0,27	0,40	0,34	0,06
						Oligonu	ikleotydy za	wierające o	зdG							
	0	98,11	99,14	99,91	99,06	0,90	1,63	0,59	0,09	0,77	0,78	0,26	0,26	0,00	0,18	0,15
	30	92,99	96,30	97,30	95,53	2,26	6,67	3,49	2,27	4,14	2,27	0,34	0,21	0,43	0,33	0,11
-6/+6	60	86,47	88,14	89,31	87,97	1,43	13,24	11,68	10,17	11,70	1,53	0,29	0,19	0,52	0,33	0,17
(H/ScdG)	120	54,11	59,45	61,41	58,32	3,78	45,89	40,05	37,90	41,28	4,13	0,00	0,50	0,69	0,39	0,35
	180	16,64	26,91	29,76	24,43	6,90	83,07	72,73	69,39	75,06	7,13	0,29	0,36	0,86	0,50	0,31
	240	4,38	6,52	4,41	5,11	1,23	94,99	92,92	94,93	94,28	1,18	0,62	0,56	0,65	0,61	0,05

ĺ	300	0,00	0,16	0,56	0,24	0,29	99,38	99,36	98,71	99,15	0,38	0,62	0,48	0,73	0,61	0,13
	0	98,96	99,32	99,75	99,34	0,39	1,04	0,24	0,21	0,50	0,47	0,00	0,44	0,04	0,16	0,24
	30	90,23	94,78	95,70	93,57	2,93	9,77	5,07	3,96	6,27	3,08	0,00	0,15	0,33	0,16	0,17
-6/+6	60	73,92	86,71	82,76	81,13	6,55	26,08	12,80	17,24	18,71	6,76	0,00	0,49	0,00	0,16	0,28
(H/RcdG)	120	26,26	55,45	45,88	42,53	14,88	73,74	43,93	53,96	57,21	15,17	0,00	0,62	0,16	0,26	0,32
	180	6,59	12,83	12,54	10,66	3,52	93,07	86,51	87,43	89,00	3,55	0,34	0,66	0,03	0,34	0,31
	240	0,00	0,31	0,30	0,20	0,18	99,61	99,69	99,59	99,63	0,05	0,39	0,00	0,11	0,16	0,20
	300	0,00	0,00	0,01	0,00	0,01	100,00	100,00	99,95	99,98	0,03	0,00	0,00	0,04	0,01	0,03

# Tabela 34. Dane liczbowe uzyskane w ramach analizy aktywności enzymu FPG.

Nić	Czas	1	2	3	Avg	SD	1	2	3	Avg	SD	1	2	3	Avg	SD
	[mm.]	Wyo	lajność real	cji (nić nie	naruszona)	[%]	W	ydajność re	akcji (nić	rozcięta) [	%]	Wyda	ijność real	cji (produ	kt pośredn	i) [%]
	I					Natywne	kontrolne	oligonukle	otydy							
	0	99,10	99,89	99,41	99,47	0,39	0,28	0,11	0,54	0,31	0,22	0,62	0,00	0,05	0,22	0,34
	1	91,77	92,68	92,23	92,23	0,46	7,04	6,48	6,64	6,72	0,29	1,19	0,85	1,13	1,05	0,18
6116	5	54,66	63,77	65,86	61,43	5,95	42,37	33,68	31,47	35,84	5,76	2,97	2,55	2,66	2,73	0,22
-0/+0	15	26,28	40,14	50,61	39,01	12,20	69,64	56,43	45,65	57,24	12,01	4,08	3,43	3,73	3,75	0,32
(H/dA)	30	9,00	17,09	28,60	18,23	9,85	87,43	79,42	67,35	78,07	10,11	3,57	3,50	4,04	3,70	0,30
	60	2,98	4,88	11,99	6,62	4,75	94,82	92,86	85,57	91,08	4,87	2,21	2,26	2,44	2,30	0,12
	120	2,45	1,48	2,09	2,00	0,49	95,84	97,75	96,84	96,81	0,95	1,70	0,77	1,07	1,18	0,48
						Oligonu	kleotydy z	awierające	cdG							
	0	99,75	99,58	99,34	99,56	0,21	0,25	0,27	0,58	0,37	0,19	0,00	0,15	0,08	0,08	0,07
	1	95,93	94,09	92,40	94,14	1,76	4,07	5,49	6,88	5,48	1,40	0,00	0,41	0,72	0,38	0,36
-6/+6	5	45,91	52,21	58,36	52,16	6,22	53,70	46,63	40,11	46,81	6,79	0,39	1,16	1,53	1,03	0,58
(H/ScdG)	15	10,00	10,62	23,36	14,66	7,54	89,60	87,94	74,70	84,08	8,16	0,40	1,45	1,94	1,26	0,79
	30	0,45	4,80	1,65	2,30	2,24	99,49	94,09	97,08	96,88	2,70	0,06	1,11	1,27	0,82	0,66
	60	0,04	0,45	0,86	0,45	0,41	99,96	98,98	98,29	99,08	0,84	0,01	0,57	0,84	0,47	0,43
	120	0,01	0,08	0,21	0,10	0,10	99,97	99,53	99,07	99,52	0,45	0,02	0,39	0,72	0,38	0,35
	0	99,51	99,63	99,55	99,56	0,06	0,42	0,33	0,00	0,25	0,22	0,07	0,04	0,45	0,19	0,23
	1	89,11	90,27	90,85	90,07	0,89	10,23	9,33	7,70	9,09	1,29	0,66	0,40	1,46	0,84	0,55
-6/+6	5	24,20	15,33	31,86	23,80	8,27	74,24	83,57	64,99	74,27	9,29	1,57	1,10	3,15	1,94	1,07
(H/RcdG)	15	1,04	0,62	1,92	1,19	0,66	98,32	99,02	96,62	97,98	1,24	0,64	0,36	1,46	0,82	0,57
	30	0,00	0,00	1,77	0,59	1,02	99,92	99,87	97,62	99,13	1,31	0,08	0,13	0,61	0,28	0,29
	60	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	99,81	99,80	99,43	99,68	0,21	0,19	0,20	0,57	0,32	0,21

	120 0,00	0,00 0,08	0,03 0,04	99,82 99,82	99,35 99,66	0,27 0,18	0,18 0,58	0,31 0,23
--	----------	-----------	-----------	-------------	-------------	-----------	-----------	-----------

	SspI					Czas reakcji [n	in.]		
	osp.		0	1	5	15	30	45	60
dsDNA	Nić	Dane				Wydajność reakc	ji [%]		
		1.	0,08	0,36	2,73	14,48	46,87		83,75
		2.	0,37	1,17	4,79	16,21	37,64		85,93
	1	3.	0,00	0,00	2,84	24,16	49,31		87,62
		Avg	0,15	0,51	3,45	18,29	44,60		85,77
А		SD	0,19	0,60	1,16	5,16	6,15		1,94
		1.	0,02	0,13	1,85	19,74	60,40		88,89
		2.	0,00	0,16	3,94	17,60	47,57		72,72
	2	3.	0,37	0,86	6,14	23,15	40,29		85,02
		Avg	0,13	0,39	3,97	20,17	49,42		82,21
		SD	0,21	0,41	2,15	2,80	10,18		8,44
		1.	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
		2.	0,00	0,00	0,00	0,00	0,25	0,00	0,11
	3	3.	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
		Avg	0,00	0,00	0,00	0,00	0,08	0,00	0,04
в		SD	0,00	0,00	0,00	0,00	0,15	0,00	0,06
		1.	0,00	0,00	0,13	0,00	0,00	0,00	0,00
		2.	0,07	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	4	3.	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,02	0,02
		Avg	0,02	0,00	0,04	0,00	0,00	0,01	0,01
		SD	0,04	0,00	0,08	0,00	0,00	0,01	0,01
		1.	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
		2.	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	5	3.	0,37	0,26	0,28	0,11	0,04	0,12	0,35
С		Avg	0,12	0,09	0,09	0,04	0,01	0,04	0,12
		SD	0,21	0,15	0,16	0,06	0,02	0,07	0,20
		1.	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	6	2.	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
		3.	0,13	0,16	0,12	0,21	0,10	0,04	0,01

<b>Tabela 35.</b> Dane liczbowe uzyskane w ramach analizy aktywności enzymu SspI.
---

		Avg	0,04	0,05	0,04	0,07	0,03	0,01	0,00
		SD	0,08	0,09	0,07	0,12	0,06	0,02	0,00
		1.	0,06	0,47	3,50	27,30	55,23	79,33	94,81
		2.	0,00	0,00	1,38	18,20	48,04	67,24	92,72
	7	3.	0,00	0,00	1,80	14,96	50,93	63,46	98,73
		Avg	0,02	0,16	2,22	20,15	51,40	70,01	95,42
D		SD	0,04	0,27	1,12	6,40	3,62	8,29	3,05
2		1.	0,01	0,16	2,62	33,42	54,89	66,74	80,17
		2.	0,07	0,47	2,17	13,71	47,75	74,59	92,86
	8	3.	0,00	0,00	0,49	15,44	44,40	84,93	94,09
		Avg	0,03	0,21	1,76	20,86	49,01	75,42	89,04
		SD	0,04	0,24	1,12	10,91	5,35	9,13	7,71
		1.	0,00	0,63	5,99	32,31	71,12	91,25	97,23
		2.	0,74	1,37	4,07	21,52	56,38	87,71	94,68
	9	3.	0,00	0,59	4,86	28,14	62,66	79,19	94,94
		Avg	0,25	0,86	4,97	27,32	63,39	86,05	95,62
E		SD	0,43	0,44	0,96	5,44	7,40	6,20	1,40
		1.	0,00	0,06	4,86	30,40	72,92	94,44	97,96
		2.	0,00	0,28	2,78	21,99	62,68	89,16	91,44
	10	3.	0,25	0,79	5,83	24,66	67,39	84,05	93,40
		Avg	0,08	0,37	4,49	25,68	67,66	89,22	94,27
		SD	0,14	0,37	1,56	4,30	5,13	5,19	3,34
		1.	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
		2.	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	11	3.	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
		Avg	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
F		SD	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
		1.	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
		2.	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	12	3.	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
		Avg	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
		SD	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
		1.	0,09	0,11	0,12	1,01	0,35	0,69	1,81
G	13	2.	0,14	0,00	0,00	0,13	0,06	0,00	0,00
		3.	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
			1						l

		Avg	0,08	0,04	0,04	0,38	0,14	0,23	0,60
		SD	0,07	0,06	0,07	0,55	0,19	0,40	1,05
		1.	1,02	0,31	0,49	0,06	0,00	0,00	0,00
		2.	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	14	3.	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
		Avg	0,34	0,10	0,16	0,02	0,00	0,00	0,00
		SD	0,59	0,18	0,28	0,03	0,00	0,00	0,00
		1.	0,00	0,00	2,31	12,34	38,45	66,54	83,94
		2.	0,47	1,36	4,51	14,39	36,84	53,96	75,05
	15	3.	0,00	0,05	1,32	14,89	35,23	59,59	82,67
		Avg	0,16	0,47	2,71	13,87	36,84	60,03	80,55
н		SD	0,27	0,77	1,63	1,35	1,61	6,30	4,81
		1.	0,00	0,00	1,72	13,34	42,17	77,84	93,28
		2.	0,00	0,00	2,17	15,22	32,27	53,84	60,49
	16	3.	0,00	0,00	2,33	15,43	38,80	50,35	82,63
		Avg	0,00	0,00	2,07	14,66	37,74	60,68	78,80
		SD	0,00	0,00	0,31	1,15	5,04	14,96	16,73
		1.	0,00	0,82	2,92	17,79	37,52	57,45	73,24
		2.	2,24	3,28	6,20	22,34	43,38	65,53	73,41
	17	3.	0,00	0,93	6,68	25,21	54,69	74,13	87,41
		Avg	0,75	1,68	5,26	21,78	45,20	65,70	78,02
T		SD	1,29	1,39	2,05	3,74	8,73	8,34	8,14
1		1.	0,00	0,03	1,79	19,21	38,94	65,55	85,84
		2.	0,00	0,75	7,30	28,89	51,60	66,14	82,84
	18	3.	0,00	0,00	4,08	20,79	49,54	83,06	91,21
		Avg	0,00	0,26	4,39	22,96	46,70	71,58	86,63
		SD	0,00	0,42	2,77	5,19	6,79	9,94	4,24
		1.	0,00	0,20	2,42	16,63	39,34	47,82	73,51
		2.	0,14	0,96	4,82	23,30	45,63	66,37	80,01
	19	3.	0,00	0,00	2,26	15,45	38,10	55,56	67,57
т		Avg	0,05	0,39	3,17	18,46	41,02	56,58	73,70
-		SD	0,08	0,51	1,44	4,23	4,04	9,32	6,22
		1.	0,04	0,46	11,22	39,73	56,74	73,61	83,45
	20	2.	0,00	0,17	10,08	35,21	44,93	56,57	78,79
		3.	0,30	0,73	8,18	38,37	51,62	78,38	91,28
L	L	L	1	1	1	1		1	1

		Avg	0,11	0,45	9,83	37,77	51,10	69,52	84,51
		SD	0,16	0,28	1,53	2,32	5,92	11,46	6,31
		1.	0,00	0,00	1,13	7,87	17,34	36,06	55,52
		2.	0,00	0,43	3,05	24,52	56,18	74,87	88,33
	21	3.	0,00	0,34	2,88	12,07	31,04	57,92	60,86
		Avg	0,00	0,26	2,35	14,82	34,85	56,29	68,24
V		SD	0,00	0,23	1,06	8,66	19,69	19,46	17,61
ĸ		1.	0,10	0,04	0,57	4,78	17,09	33,38	44,22
		2.	0,00	0,00	0,86	9,35	19,13	22,79	45,87
	22	3.	0,00	0,00	1,56	12,57	25,99	39,94	48,76
		Avg	0,03	0,01	1,00	8,90	20,74	32,04	46,28
		SD	0,06	0,02	0,51	3,91	4,66	8,66	2,30
		1.	0,52	0,60	0,67	0,64	0,60	0,59	0,52
		2.	0,20	0,72	0,39	0,64	0,93	0,93	1,28
	23	3.	0,51	0,55	0,76	0,34	0,35	0,33	0,18
		Avg	0,41	0,62	0,61	0,54	0,63	0,62	0,66
L		SD	0,18	0,08	0,20	0,17	0,29	0,30	0,56
		1.	0,19	0,20	0,16	0,22	0,26	0,38	0,41
		2.	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	24	3.	0,03	0,06	0,02	0,01	0,00	0,00	0,06
		Avg	0,08	0,09	0,06	0,08	0,09	0,13	0,15
		SD	0,10	0,10	0,09	0,12	0,15	0,22	0,22
		1.	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,04	0,11
		2.	0,00	0,00	0,09	0,41	0,53	0,35	0,27
М	26	3.	0,00	0,00	0,00	0,00	0,18	0,02	0,24
		Avg	0,00	0,00	0,03	0,14	0,24	0,14	0,21
		SD	0,00	0,00	0,05	0,24	0,27	0,18	0,08
		1.	0,64	0,68	0,70	0,64	0,59	0,37	0,54
		2.	0,46	0,93	1,29	1,61	1,82	2,00	1,81
	27	3.	0,18	0,20	0,21	0,09	0,18	0,25	0,02
N		Avg	0,43	0,60	0,74	0,78	0,86	0,87	0,79
		SD	0,23	0,37	0,54	0,77	0,85	0,98	0,92
		1.	0,54	0,75	0,71	0,75	0,83	0,88	1,05
	28	2.	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
		3.	0,20	0,19	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
L		1					1		

		Avg	0,25	0,32	0,24	0,25	0,28	0,29	0,35
		SD	0,27	0,39	0,41	0,43	0,48	0,51	0,61
		1.	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,13	0,00
		2.	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
0	30	3.	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
		Avg	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,04	0,00
		SD	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,07	0,00

# Tabela 36. Dane liczbowe uzyskane w ramach analizy aktywności enzymu BsmAI.

	BsmAI					Czas reakcji [mi	n.]		
			0	1	5	15	30	45	60
dsDNA	Nić	Dane			I	Wydajność reakcji	[%]		
		1.	0,03	0,08	2,44	32,13	93,13		99,32
		2.	0,00	2,30	21,70	63,20	92,75		96,82
	1	3.	0,12	1,59	28,70	78,82	99,12		100,00
		Avg	0,05	1,32	17,62	58,05	95,00		98,71
А		SD	0,06	1,13	13,60	23,77	3,57		1,68
		1.	0,00	0,00	8,61	68,13	98,67		99,38
		2.	0,97	4,33	39,65	82,72	95,06		95,07
	2	3.	0,00	2,71	42,67	94,24	98,86		99,26
		Avg	0,32	2,35	30,31	81,70	97,53		97,90
		SD	0,56	2,19	18,86	13,08	2,14		2,45
		1.	0,08	1,03	10,18	72,40	99,78	99,70	99,44
		2.	0,00	0,70	13,01	69,39	98,91	99,53	90,07
	3	3.	0,00	1,89	17,12	75,81	99,50	99,38	96,15
		Avg	0,03	1,21	13,44	72,53	99,40	99,54	95,22
В		SD	0,05	0,61	3,49	3,21	0,44	0,16	4,75
		1.	0,00	1,32	18,48	90,86	98,99	99,39	99,05
		2.	0,00	1,22	22,26	71,10	99,06	99,24	99,13
	4	3.	0,25	1,70	14,14	84,96	97,07	98,76	99,36
		Avg	0,08	1,41	18,30	82,31	98,37	99,13	99,18
		SD	0,14	0,25	4,06	10,15	1,13	0,33	0,16
С	5	1.	0,00	2,60	31,86	89,16	99,10	98,11	99,01
		2.	0,43	5,94	27,90	88,30	95,66	95,78	95,39

		3.	0,00	3,57	35,63	92,49	99,62	99,44	98,77
		Avg	0,14	4,04	31,80	89,99	98,12	97,78	97,72
		SD	0,25	1,72	3,87	2,21	2,15	1,85	2,03
		1.	0,00	2,39	26,36	85,04	98,57	98,14	96,86
		2.	0,13	3,33	22,23	79,32	94,42	92,81	92,42
	6	3.	0,20	5,12	42,24	91,17	98,88	97,80	97,67
		Avg	0,11	3,61	30,28	85,18	97,29	96,25	95,65
		SD	0,10	1,39	10,57	5,93	2,49	2,98	2,82
		1.	0,01	0,00	0,00	0,15	0,29	0,46	0,54
		2.	0,00	0,01	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	7	3.	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
		Avg	0,00	0,00	0,00	0,05	0,10	0,15	0,18
D		SD	0,00	0,01	0,00	0,09	0,17	0,26	0,31
D		1.	0,00	0,00	0,00	0,00	0,03	0,02	0,00
		2.	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	8	3.	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
		Avg	0,00	0,00	0,00	0,00	0,01	0,01	0,00
		SD	0,00	0,00	0,00	0,00	0,02	0,01	0,00
		1.	0,00	0,03	1,34	9,96	33,18	42,84	36,25
		2.	0,00	0,55	4,53	15,26	31,68	39,47	48,03
	9	3.	0,01	0,09	2,96	17,35	43,74	55,53	49,32
		Avg	0,00	0,22	2,94	14,19	36,20	45,95	44,53
F		SD	0,01	0,28	1,59	3,81	6,57	8,47	7,20
Е		1.	0,00	0,00	1,83	7,41	22,47	44,16	41,10
	10	2.	0,52	1,18	3,89	13,26	23,83	32,71	37,64
		3.	0,63	1,53	6,72	26,26	49,73	52,33	54,74
		Avg	0,38	0,90	4,15	15,64	32,01	43,07	44,49
		SD	0,34	0,80	2,45	9,65	15,36	9,85	9,04
		1.	0,92	1,46	19,19	89,49	99,70	99,84	99,84
		2.	0,09	1,03	17,08	73,97	99,02	98,66	98,35
	11	3.	0,00	0,19	26,48	94,16	99,96	99,97	99,92
F		Avg	0,34	0,89	20,92	85,87	99,56	99,49	99,37
		SD	0,51	0,65	4,93	10,57	0,49	0,72	0,89
	12	1.	0,00	0,50	22,35	84,63	98,49	99,67	99,51
	12	2.	0,00	0,92	11,74	81,80	96,75	99,08	98,61
			1						

		3.	0,00	2,73	32,82	91,65	99,75	99,93	99,90
		Avg	0,00	1,38	22,31	86,02	98,33	99,56	99,34
		SD	0,00	1,18	10,54	5,07	1,51	0,43	0,66
		1.	0,00	0,49	14,28	71,43	98,85	98,93	99,12
		2.	0,00	1,63	17,03	52,65	94,71	96,78	97,72
	13	3.	1,24	3,61	19,53	56,36	95,49	98,15	95,66
		Avg	0,41	1,91	16,94	60,15	96,35	97,95	97,50
G		SD	0,72	1,58	2,63	9,95	2,20	1,09	1,74
_		1.	0,40	4,67	23,92	64,85	95,12	97,15	94,58
		2.	0,52	5,87	30,11	64,77	92,19	97,03	96,25
	14	3.	0,02	4,14	19,79	69,41	96,16	97,40	96,64
		Avg	0,31	4,89	24,61	66,34	94,49	97,19	95,83
		SD	0,26	0,88	5,19	2,66	2,06	0,19	1,09
		1.	0,13	0,77	18,92	61,18	93,62	96,78	94,55
Н		2.	0,56	1,86	16,68	70,88	93,74	93,17	94,02
	15	3.	0,00	0,13	20,23	72,77	97,30	99,58	99,04
		Avg	0,23	0,92	18,61	68,28	94,89	96,51	95,87
		SD	0,29	0,88	1,80	6,22	2,09	3,21	2,76
		1.	0,00	0,00	4,81	38,53	54,82	74,45	74,14
		2.	0,00	0,00	2,38	26,67	55,98	67,21	65,06
	16	3.	0,31	1,47	10,15	46,88	79,22	85,53	87,41
		Avg	0,10	0,49	5,78	37,36	63,34	75,73	75,54
		SD	0,18	0,85	3,97	10,15	13,76	9,23	11,24
	17	1.	0,40	3,51	24,71	67,47	88,06	88,92	89,59
		2.	0,00	4,34	24,95	65,47	86,61	90,49	90,66
		3.	0,74	6,07	30,44	72,58	91,64	92,79	89,70
		Avg	0,38	4,64	26,70	68,51	88,77	90,73	89,99
I		SD	0,37	1,31	3,24	3,67	2,59	1,94	0,59
		1.	0,82	3,77	16,63	43,86	63,25	68,22	73,44
		2.	1,49	4,45	16,54	40,31	74,52	71,87	71,29
	18	3.	0,00	3,11	14,94	45,21	83,58	79,55	76,87
		Avg	0,77	3,78	16,04	43,13	73,78	73,21	73,87
		SD	0,75	0,67	0,95	2,53	10,18	5,78	2,81
J	19	1.	0,00	0,12	2,48	31,98	69,29	87,67	82,97
-		2.	0,00	0,00	0,35	16,44	69,66	93,46	85,55
L		L	1	1					1

		3.	0,00	0,14	1,52	24,17	62,86	89,04	88,41
		Avg	0,00	0,09	1,45	24,20	67,27	90,06	85,65
		SD	0,00	0,07	1,07	7,77	3,82	3,03	2,72
		1.	0,39	0,48	0,67	0,88	1,32	1,58	1,72
		2.	1,66	1,62	2,29	3,58	5,94	7,21	7,28
	20	3.	1,84	1,95	2,29	3,51	5,29	5,84	5,80
		Avg	1,30	1,35	1,75	2,65	4,18	4,88	4,93
		SD	0,79	0,77	0,94	1,54	2,50	2,94	2,88
		1.	0,00	0,07	0,49	4,10	13,23	21,79	24,12
		2.	0,00	0,00	0,00	1,73	10,06	20,97	21,18
	21	3.	0,16	0,25	0,46	4,54	12,04	19,40	19,35
		Avg	0,05	0,11	0,32	3,46	11,78	20,72	21,55
к		SD	0,09	0,13	0,28	1,51	1,60	1,22	2,40
		1.	2,72	2,81	3,38	4,38	8,24	11,77	14,29
		2.	12,54	10,78	12,75	15,29	22,03	28,11	28,14
	22	3.	9,81	8,06	8,96	10,78	15,67	21,13	22,93
		Avg	8,36	7,22	8,36	10,15	15,31	20,33	21,78
		SD	5,07	4,05	4,71	5,48	6,90	8,20	7,00
ſ		1.	0,08	1,01	9,91	39,00	49,55	47,99	52,19
		2.	0,14	2,85	12,13	38,25	48,85	59,89	56,63
	23	3.	0,00	2,22	13,03	34,87	56,11	60,09	55,30
		Avg	0,07	2,03	11,69	37,37	51,50	55,99	54,71
		SD	0,07	0,94	1,61	2,20	4,01	6,93	2,28
		1.	0,00	0,00	2,15	8,33	16,71	12,83	13,05
		2.	0,00	0,00	1,86	6,38	14,39	13,98	17,56
	24	3.	0,00	0,00	3,13	13,86	15,14	19,59	27,37
		Avg	0,00	0,00	2,38	9,52	15,41	15,47	19,33
		SD	0,00	0,00	0,67	3,88	1,19	3,62	7,32
		1.	3,90	3,88	6,07	15,08	25,00	26,85	23,91
		2.	16,22	14,73	16,87	22,92	35,97	37,36	33,50
М	26	3.	9,59	10,04	10,65	17,87	24,43	24,28	20,34
		Avg	9,90	9,55	11,20	18,62	28,47	29,50	25,92
		SD	6,17	5,44	5,42	3,97	6,51	6,93	6,81
N	27	1.	0,00	0,44	10,08	41,33	58,28	67,25	67,92
		2.	0,00	1,35	13,38	42,41	63,41	62,84	72,20
L	1	1	1	1		i	1		

	Ì	3.	0,00	2,77	16,60	42,59	60,11	65,77	67,91
		Avg	0,00	1,52	13,35	42,11	60,60	65,29	69,34
		SD	0,00	1,18	3,26	0,68	2,60	2,25	2,48
		1.	0,00	0,72	3,12	12,91	32,35	29,83	29,70
		2.	0,00	0,00	1,06	12,50	31,67	28,39	22,48
	28	3.	0,84	1,65	7,22	20,21	34,03	33,62	30,20
		Avg	0,28	0,79	3,80	15,21	32,68	30,61	27,46
		SD	0,48	0,83	3,14	4,33	1,21	2,70	4,32
0		1.	4,02	4,43	6,37	16,48	22,70	22,61	23,20
		2.	11,90	13,03	15,48	21,79	27,81	31,66	29,41
	30	3.	7,32	6,25	7,71	12,91	16,57	12,99	11,03
		Avg	7,74	7,91	9,86	17,06	22,36	22,42	21,21
		SD	3,96	4,53	4,92	4,47	5,63	9,34	9,35

# 7. Wykaz skrótów

DNA	deoxyribonucleic acid
RNA	ribonucleic acid
dAMP	2'-deoxyadenosine 5'-monophosphate
dTMP	2'-deoxythymidine 5'-monophosphate
dGMP	2'-deoxyguanosine 5'-monophosphate
dCMP	2'-deoxycytidine 5'-monophosphate
ROS	reactive oxygen species
RNS	reactive nitrogen species
UVR	ultraviolet radiation
IR	ionising radiation
LET	linear energy transfer
RBE	relative biological effectiveness
6TG	6-thioguanine
dTTP	2'-deoxythymidine 5'-triphosphate
dUTP	2'-deoxyuridine 5'-triphosphate
TET	ten-eleven translocation
TDG	thymine-DNA glycosylase
SMUG1	specific monofunctional uracil-DNA glucosylase 1
HIV	human immunodeficiency virus
AAG	3-alkyladenine DNA glycosylase
CDL	clustered DNA lesions
DSB	double strand break
cdPus	cyclodeoxypurines
CPD	cyclobutane pyrimidine dimers
6-4 PP	pyrimidine(6-4)pyrimidone photoproducts
NER	nucleotide excision repair
FAD	flavin adenine dinucleotide
AP-site	apurynic/apyrimidinic site
SSB	single-strand break

8-oxoG	7,8-dihydro-8-oxoguanine
8-oxodG	7,8-dihydro-8-oxo-2'-deoxyguanosine
FPG	formamidopyrimidine DNA glycosylase
FapyG/Gua	2,6-diamino-4-hydroxy-5-formamidoguanosine
FapyA/Ade	2,6-diamino-4-hydroxy-5-formamidoadenosine
OGG1	oxoguanine glycosylase 1
yOGG1	yeast OGG1
hOGG1	human OGG1
8-oxoA	7,8-dihydro-8-oxoadenine
cdG	5',8-cyclo-2'-deoxyguanosine
cdA	5',8-cyclo-2'-deoxyadenosine
BER	base excision repair
TC-NER	transcription-coupled nucleotide excision repair
GG-NER	global genomic nucleotide excision repair
TLS	translesion synthesis
MMR	mismatch repair
NHEJ	non-homologous end joining
HRR	homologous recombination repair
SP-BER	short-patch BER
LP-BER	long-patch BER
FEN1	flap endonuclease 1
ATP	adenosine 5'-triphosphate
TFIIH	transcription factor II human
ssDNA	single-stranded DNA
RPA	replication protein A)
RFC	replication factor C)
PCNA	proliferating cell nuclear antigen)
DNA-PKcs	DNA-dependent protein kinase catalytic subunit
DNA-PK	DNA-dependent protein kinase
HDR	homology-directed repair)
DSBR	double strand break repair)

SDSA	synthesis-dependent strand annealing)
SSA	single-strand annealing)
BIR	break-induced replication)
mtDNA	mitochondrial DNA)
nDNA	nuclear DNA)
MGMT	O <sup>6</sup> -methylguanine DNA methyltransferase
XP	xeroderma pigmentosum
AIDS	acquired immunodeficiency syndrome
TLS	translesion synthesis
CS	Cockayne syndrome
HGPS	Hutchinson-Gilford progeria syndrome
TTD	trichothiodystrophy
HP	halogenated pyrimidines
BNCT	boron neutron capture therapy
UDG	uracil-DNA glycosylase
APE1	apurynic/apyrimidinic (AP) endonuclease 1
hAPE1	$human\ apurynic/apyrimidinic\ (AP)\ endonuclease\ 1$
cps	counts per second
LB	loading buffer
## 8. Wykaz rysunków

**Rysunek 2.** Porównanie struktury chemicznej par zasad Watsona-Cricka (po lewej) i Hoogsteena (po prawej). Pary A-T i A·T znajduja sie na górze, pary G-C i G·C na dole. 16 **Rysunek 3.** Spektrum fal elektromagnetycznych. Wartości długości i częstotliwości fal są **Rysunek 4.** Schematyczne przedstawienie różnicy pomiędzy tranzycją a transwersją. Tranzycja polega na zastąpieniu w sekwencji DNA jednej puryny przez inną lub jednej pirymidyny przez inna. W przypadku tranzycji puryna ulega zamianie na pirymidyne lub Rysunek 5. Wzory strukturalne cytozyny, 5-metylocytozyny, 5-formylocytozyny i 5-Rysunek 6. Wzory strukturalne 2'-deoksyadenozyny (dA), 2'-deoksyguanozyny (dG), ich pochodnych, a także substratów FPG i OGG1. Oznaczenia: ScdG - (5'S)-5',8-cyklo-2'deoksyguanozyna; RcdG – (5'R)-5',8-cyklo-2'-deoksyguanozyna; 8-oxodG - 7,8-dihydro-8-oksodeoksyguanozyna; 8-oxodA - 7,8-dihydro-8-oksodeoksyadenozyna......29 Rysunek 8. Schematyczne przedstawienie dwuniciowego DNA oraz podstawowych rodzajów jego uszkodzeń: miejsca AP (na górze po lewej), pęknięcia jednej nici (SSB) (na górze po prawej) oraz pęknięć obu nici (DSB) (na dole po lewej i na dole po prawej).....31 **Rysunek 10.** Mechanizm reakcji enzymatycznej katalizowanej przez UDG. W pierwszym etapie widać hyrdolizę wiązania C1'-N9 w cząsteczce dU, co skutkuje uwolnieniem cząsteczki uracylu. Widoczne połączenia w postaci wiązań wodorowych pomiędzy DNA a resztami aminokwasowymi w strukturze białka: Cys157, Asn204, Gln144, Asp145, Pro146, His148 i His268. Rusynek zaadoptowałem wg. Schormann N. 2014 [112].......49 Rysunek 11. Struktura połaczenia miejsca aktywnego ludzkiej czasteczki UDG (kolor purpurowy) z fragmentem dsDNA zawierającym miejsce AP. Nici dsDNA zaznaczono kolorem ciemnozielonym (nić uszkodzona) oraz brazowym (nić komplementarna). Kolorem pomarańczowym zaznaczono atomy fosforu wchodzace w skład kolejnych nukleotydów. W centralnej części rysunku zaznaczono cząsteczkę 2'-deoksyrybozy, pozostała po hydrolizie wiązania C1'-N9 w cząsteczce dU. Jest ona zwrócona w kierunku wnętrza miejsca aktywnego UDG, w przeciwieństwie do dwóch nieuszkodzonych sąsiednich nukleozydów: 2'-dA (powyżej) oraz 2'-dT (poniżej). Reszty aminokwasowe Leu272, Tyr275 i Arg276 są wskazano bez widocznych struktur ze względu na większa odległość od centrum rysunku. Rysunek wykonałem na podstawie pozycji w bibliotece **Rysunek 12.** Mechanizm hydrolizy miejsca AP przez enzym hAPE1 przedstawiony z uwzględnieniem fragmentu nici uszkodzonej. Zaznaczono obecność reszty aminokwasowej Asp210, zaangażowanej w atak nukleofilowy atomu tlenu z czasteczki wody (kolor pomarańczowy) na atom fosforu końca 5' miejsca AP (lewa strona rysunku). Produkt reakcji stanowi SSB z wolnymi końcami 3'-OH oraz 5'-fosforanu, widoczne po prawej stronie rysunku. Rysunek zaadoptowałem wg. Aboelnga M. M. 2019 [114]. ......53 **Rysunek 13.** Struktura miejsca aktywnego hAPE1 (kolor ciemnozielony) związanego z miejscem AP w dsDNA. Koniec 5' miejsca AP zaznaczono kolorem czerwonym z widocznym atomem fosforu (kolor pomarańczowy). Koniec 3' miejsca AP zaznaczono kolorem jasnozielonym z widocznym pierścieniem 2'-dC. Nić komplementarną zaznaczono kolorem brązowym. W centrum rysunku znajdują się zaznaczone kolorem jasnozielonym kationy Mg<sup>2+</sup>, stabilizowane przez reszty aminokwasowe Asn68, Asp70 i Glu96. Rysunek wykonałem na podstawie pozycji w bibliotece Protein Data Bank o numerze 4IEM. Kolor czerwony: 5'-fosforan, kolor zielony: 3'-OH w 2'-deoksycytydynie. Kolor jasnozielony: Rysunek 14. Sekwencje oligonukleotydów zaprojektowanych w celu określenia wpływu cdPus na aktywność enzymów UDG i hAPE1......58 **Rysunek 15.** Kinetyka reakcji 0,02 U UDG i 0,5 U hAPE1 wobec dsDNA zawierających w swojej sekwencji dU i ScdA – dU(-5)ScdA (A, B), dU(+5)ScdA (C, D), dU(-5)(+5)ScdA (E, F). (A, C, E) autoradiogramy przedstawiające 14 torów każdy, odpowiadające czasom reakcji 0, 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55 i 60 minut, począwszy od lewej strony. (B, D, F) wykresy przedstawiające spadek ilości substratu (kolor niebieski), wzrost ilości produktu (kolor pomarańczowy) oraz zawartość produktu pośredniego (kolor szary).....60 **Rysunek 16.** Kinetyka reakcji 0,5 U UDG i 0,02 U hAPE1 wobec dsDNA zawierających w swojej sekwencji dU i ScdA – dU(-5)ScdA (A, B), dU(+5)ScdA (C, D), dU(-5)(+5)ScdA (E, F). (A, C, E) autoradiogramy przedstawiające 13 torów każdy, odpowiadające czasom reakcji 0, 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 60, 90, 120, 150 i 180 minut, począwszy od lewej strony. (B, D, F) wykresy przedstawiające spadek ilości substratu (kolor niebieski) oraz wzrost ilości produktu (kolor pomarańczowy). .....61 Rysunek 17. Kinetyka reakcji 0,02 U UDG i 0,5 U hAPE1 wobec dsDNA zawierających w swojej sekwencji dU i RcdA - dU(-5)RcdA (A, B), dU(+5)RcdA (C, D), dU(-5)(+5)RcdA (E, F). (A, C, E) autoradiogramy przedstawiające 14 torów każdy, odpowiadające czasom reakcji 0, 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55 i 60 minut, począwszy od lewej strony. (B, D, F) wykresy przedstawiające spadek ilości substratu (kolor niebieski), wzrost ilości produktu (kolor pomarańczowy) oraz zawartość produktu **Rysunek 18.** Kinetyka reakcji 0,5 U UDG i 0,02 U hAPE1 wobec dsDNA zawierających w swojej sekwencji dU i RcdA - dU(-5)RcdA (A, B), dU(+5)RcdA (C, D), dU(-5)(+5)RcdA (E, F). (A, C, E) autoradiogramy przedstawiające 13 torów każdy, odpowiadające czasom reakcji 0, 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 60, 90, 120, 150 i 180 minut, poczawszy od lewej strony. (B, D, F) wykresy przedstawiające spadek ilości substratu 

**Rysunek 19.** Kinetyka reakcji 0,02 U UDG i 0,5 U hAPE1 wobec dsDNA zawierających w swojej sekwencji dU i ScdG – dU(-5)ScdG (A, B), dU(+5)ScdG (C, D), dU(-5)(+5)ScdG (E, F). (A, C, E) autoradiogramy przedstawiające 14 torów każdy, odpowiadające czasom reakcji 0, 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55 i 60 minut, począwszy od lewej strony. (B, D, F) wykresy przedstawiające spadek ilości substratu (kolor niebieski), wzrost ilości produktu (kolor pomarańczowy) oraz zawartość produktu pośredniego (kolor szary)......64 Rysunek 20. Kinetyka reakcji 0,5 U UDG i 0,02 U hAPE1 wobec dsDNA zawierających w swojej sekwencji dU i ScdG – dU(-5)ScdG (A, B), dU(+5)ScdG (C, D), dU(-5)(+5)ScdG (E, F). (A, C, E) autoradiogramy przedstawiające 13 torów każdy, odpowiadające czasom reakcji 0, 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 60, 90, 120, 150 i 180 minut, począwszy od lewej strony. (B, D, F) wykresy przedstawiające spadek ilości substratu (kolor niebieski) oraz wzrost ilości produktu (kolor pomarańczowy). .....65 **Rysunek 21.** Kinetyka reakcji 0,02 U UDG i 0,5 U hAPE1 wobec dsDNA zawierających w swojej sekwencji dU i RcdG - dU(-5)RcdG (A, B), dU(+5)RcdG (C, D), dU(-5)(+5)RcdG (E, F). (A, C, E) autoradiogramy przedstawiające 14 torów każdy, odpowiadające czasom reakcji 0, 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55 i 60 minut, począwszy od lewej strony. (B, D, F) wykresy przedstawiające spadek ilości substratu (kolor niebieski), wzrost ilości produktu (kolor pomarańczowy) oraz zawartość produktu **Rysunek 22.** Kinetyka reakcji 0,5 U UDG i 0,02 U hAPE1 wobec dsDNA zawierających w swojej sekwencji dU i ScdA-dU(-5)RcdG (A, B), dU(+5)RcdG (C, D), dU(-5)(+5)RcdG (E, F). (A, C, E) autoradiogramy przedstawiające 13 torów każdy, odpowiadające czasom reakcji 0, 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 60, 90, 120, 150 i 180 minut, począwszy od lewej strony. (B, D, F) wykresy przedstawiające spadek ilości substratu (kolor niebieski) oraz wzrost Rysunek 23. Proponowany mechanizm reakcji enzymatycznej katalizowanej przez OGG1 zgodnie z zasadą beta-eliminacji. Etap pierwszy przedstawia hyrdolizę wiązania C1'-N9 w cząsteczce 8-oxodG, katalizowanej przy udziale reszt aminokwasowych Lys249 i Asp268. Następuje otwarcie pierścienia 2'-deoksyrybozy z utworzeniem produktu pośredniego (zasady Schiffa) (etap 1). Etapy 2 i 3 przedstawiają hydrolizę wiązania fosfodiestrowego z wytworzeniem SSB zawierającego wolne końce 5'-fosforanu oraz 3'-hydroksyaldehydu. Rysunek zaadoptowałem wg. Popov A. V. 2020 [113]. .....69 Rysunek 24. Struktura miejsca aktywnego cząsteczki OGG1 (kolor ciemnozielony) w połączeniu z substratem w postaci dsDNA. Nić uszkodzoną zaznaczono kolorem purpurowym, nić kmplementarną zaznaczono kolorem brązowym. W centralnej części rusynku widać czasteczkę 8-oxodG, która jest ułożona w płaszczyźnie poziomej, przez co nie widać struktury pierścienia pirymidynowego. Cząsteczka 8-oxodG jest zwrócona do wnętrza miejsca aktywnego OGG1, w przeciwieństwie do nieuszkodzonych nukleozydów sąsiednich: 2'-dA (na górze), oraz 2'-dG (na dole). Widać połączenia cząsteczki 8-oxodG z czterema resztami aminokwasowymi: Phe319, Gln315, Asp368 i Pro266. Rysunek wykonałem na podstawie pozycji w bibliotece Protein Data Bank o numerze 3IH7. ......70

**Rysunek 25.** Proponowany mechanizm reakcji katalizowanej przez enzym FPG zgodnie z zasada beta- (etap 6) i delta-eliminacji (etap 8). Powstanie zasady Schiffa przedstawiono w etapie 1, gdzie widoczne jest otwarcie pierścienia 2'-deoksyrybozy w cząsteczce 8-oxodG. Odłączenie wolnej cząsteczki 8-oxoG przedstawiono w etapie 4. Produkt reakcji stanowi SSB z wolnymi końcami 3'-OH i 5'-OH, powstałymi po usujęciu produktu przejściowego (zasady Schiffa) w postaci 4-okso-2-pentanalu (etap 8). Widoczne reszty aminokwasowe cząsteczki FPG, które biorą udział w katalizie reakcji: Pro1 oraz Glu2. Rysunek zaadoptowałem wg. Boiteux S. 2017 [119]......73 Rysunek 26. Struktura miejsca aktywnego cząsteczki FPG z E. coli (kolor czerwony), związanego z substratem w postaci dsDNA. Nić uszkodzoną zaznaczono kolorem jasnozielonym, fragment nici komplementarnej zaznaczono kolorem ciemnozielonym. W centralnej części rysunku zaznaczono pięcioweglowy szkielet produktu pośredniego (zasady Schiffa), stabilizowany przez reszty aminokwasowe Arg258, Tyr236, Pro1 oraz Glu2. Po prawej stronie rysunku widać struktury sąsiednich nukleozydów: 2'-dG (na górze) oraz 2'-dA (na dole). Kolorem żółtym zaznaczono atom siarki w strukturze reszty aminokwasowej Met73, niebiorącej udziału w reakcji. Rysunek wykonałem na podstawie pozycji w bibliotece Protein Data Bank o numerze 1K82. .....74 Rysunek 27. Sekwencje oligonukleotydów zaprojektowanych w celu określenia wpływu Rysunek 28. Kinetyka reakcji hydrolizy dsDNA zawierającego 8-oxodG i cdG przez 0,5 U OGG1. Badane oligonukleotydy składają się z nici matrycowej (komplementarnej) Matrix H/G oraz nici badanej (wiodacej) -6/+6(H/ScdG) (A, B) lub -6/+6(H/RcdG) (C, D). (A, C) autoradiogramy przedstawiające 7 torów każdy, które odpowiadają czasom reakcji 0, 30, 60, 120, 180, 240 i 300 minut, począwszy od lewej strony. (B, D) wykresy przedstawiające spadek ilości substratu (kolor niebieski), wzrost ilości produktu (kolor **Rysunek 29.** Kinetyka reakcji hydrolizy dsDNA zawierającego 8-oxodG i cdG przez 0,5 U FPG. Badane oligonukleotydy składają się z nici matrycowej (komplementarnej) Matrix H/G oraz nici badanej (wiodącej) -6/+6(H/ScdG) (A, B) lub -6/+6(H/RcdG) (C, D). (A, C) autoradiogramy przedstawiające 7 torów każdy, które odpowiadają czasom reakcji 0, 30, 60, 120, 180, 240 i 300 minut, począwszy od lewej strony. (B, D) wykresy przedstawiające spadek ilości substratu (kolor niebieski), wzrost ilości produktu (kolor pomarańczowy) oraz zawartość produktu pośredniego (kolor szary)......79 Rysunek 30. Schematyczne przedstawienie sekwencji rozpoznawanych przez enzymy SspI (kolor zielony) i BsmAI (kolor niebieski). Strzałki wskazują miajsca hydrolizy wiązań Rysunek 31. Sekwencje oligonukleotydów zaprojektowanych w celu określenia wpływu cdPus na aktywność enzymów restrykcyjnych. Pogrubione linie symbolizują miejsca cięcia oligonukleotydów przez enzymy, zaznaczono również sekwencje rozpoznawane przez SspI (kolor zielony) i BsmAI (kolor niebieski). Litery od A do O oznaczają kolejne dwuniciowe fragmenty oligonukleotydowe (dsDNA), liczby od 1 do 30 oznaczają kolejne pojedyńcze

nici, które wchodza w skład zaprojektowanych dsDNA. Kolorem czerwonym zaznaczone Rysunek 32. Kinetyka reakcji hydrolizy dsDNA przez 1,5 U SspI. Substraty zawierają cdPus poza obrębem sekwencji rozpoznawanej przez enzym. (A) dsDNA zawierające cdA na nici wiodącej (7-10). (B) dsDNA zawierające cdA na nici komplementarnej (15-18). (C) dsDNA zawierające cdG na nici komplementarnej (19-22). (D) Przykładowy autoradiogram przedstawiający wynik reakcji dsDNA zawierającego znakowaną nić 8, która nie zawiera uszkodzenia w swojej sekwencji. Nić 8 jest komplementarna do nici 7, Rysunek 33. Kinetyka reakcji hydrolizy dsDNA zawierającego ScdA i RcdA przez 0,5 U BsmAI. (A) Trawienie nici 3-6, które tworzą dupleksy B i C, zawierające cdA w obrębie sekwencji rozpoznawanej przez SspI. (B) Trawienie nici 7-18, które tworzą dupleksy D, E, Rysunek 34. Kinetyka reakcji hydrolizy dsDNA zawierającego ScdG i RcdG przez 0,5 U BsmAI. (A) Trawienie nici 19-22, które tworzą dupleksy J i K, zawierające cdG w obrębie miejsca cięcia dsDNA przez BsmAI. (B) Trawienie nici 23-30, które tworzą dupleksy L-O, zawierające cdPus w obu niciach, w obrębie sekwencji rozpoznawanych przez oba enzymy.

Rysunek 35. Przykładowy skan kliszy rentgenowskiej po wizualizacji wyników rozdziału elektroforetycznego dotyczącego sprawdzenia poprawności znakowania i hybrydyzacji oligonukleotydów. Dolny rząd przedstawia jednoniciowe oligonukleotydy (ssDNA) po znakowaniu izotopowym, górny rząd przedstawia te same oligonukleotydy w formie dwuniciowej (dsDNA), po hybrydyzacji z niciami matrycowymi. Prążki oznaczają kolejno: dU(-5)(+5)dA (3, 4), dU(+5)ScdA (5, 6), dU(-5)(+5)ScdA (7, 8), dU(+5)RcdA (9, 10), dU(-5)(+5)RcdA (11, 12), dU(-5)ScdG (13, 14), dU(+5)ScdG (15, 16), dU(-5)(+5)ScdG (17, Rysunek 36. Ilustracja metody kwantyfikacji wyników autoradiografii w programie Quantity One. Lewa strona rysunku przedstawia skan kliszy rentgenowskiej z wynikiem pierwszego powtórzenia reakcji enzymatycznej hydrolizy nici dU(-6)/(+6)H/dA przez enzym FPG. Prawa strona rysunku przedstawia sposób zaznaczania prążków oraz teł w programie Quantity One. Pola 1-7 zawierają objętość prążków dla nienaruszonej nici. Pola 8-14 zawierają tła dla pól 1-7. Pola 15-21 zawierają objętość prążków dla nici rozciętej. Pola 22-28 zawierają tła dla pól 15-21. Pola 29-35 zawierają objętość prążków dla produktu pośredniego reakcji. Pola 36-42 zawierają tła dla pól 36-42.....117 Rysunek 37. Końcowy wykres krzywych kinetyki reakcji enzymu FPG dla nici dU(-6)(+6)H/dA uwzględniający uśrednione wyniki z trzech powtórzeń ekspetymentu......119

## 9. Wykaz tabel

<b>Tabela 1.</b> Podsumowanie informacji na temat najważniejszych systemów naprawy DNA
w organizmach prokariotycznych i eukariotycznych
Tabela 2. Charakterystyka wariantów Xeroderma Pigmentosum.         44
Tabela 3. Charakterystyka UDG.    51
Tabela 4. Charakterystyka hAPE1    55
Tabela 5. Charakterystyka materiału badawczego w postaci oligonukleotydów
stosowanych do określenia aktywności enzymów UDG i hAPE157
Tabela 6. Charakterystyka OGG1.    71
Tabela 7. Charakterystyka FPG.    75
Tabela 8. Charakterystyka materiału badawczego w postaci oligonukleotydów
stosowanych do określenia aktywności enzymów OGG1 i FPG77
Tabela 9. Charakterystyka materiału badawczego w postaci oligonukleotydów
stosowanych do określenia aktywności enzymów SspI i BsmAI85
Tabela 10. Wykaz sprzętu stosowanego w kolejnych etapach prac badawczych. Etap 1 –
synteza materiału badawczego, etap 2 – znakowanie izotopowe oligonukleotydów, etap 3
– hybrydyzacja oligonukleotydów, etap 4 – reakcje enzymatyczne, etap 5 – elektroforeza
PAGE, etap 6 – autoradiografia, etap 7 – kwantyfikacja wyników w programie Quantity
One. Wykaz nie uwzględnia drobnych materiałów laboratoryjnych zużywalnych98
<b>Tabela 11.</b> Wykaz odczynników chemicznych stosowanych w kolejnych etapach prac
badawczych. Etap 1 – synteza materiału badawczego, etap 2 – znakowanie izotopowe
oligonukleotydów, etap 3 – hybrydyzacja oligonukleotydów, etap 4 – reakcje
enzymatyczne, etap 5 – elektroforeza PAGE, etap 6 – autoradiografia, etap 7 –
kwantyfikacja wyników w programie Quantity One
<b>Tabela 12.</b> Wykaz odczynników biologicznych stosowanych w pracy badawczej101
<b>Tabela 13.</b> Skład jakościowy i ilościowy mieszaniny reakcyjnej stosowanej w etapie
znakowania izotopowego oligonukleotydów
Tabela 14. Skład jakościowy i ilościowy roboczego roztworu enzymu służącego do
znakowania izotopowego oligonukleotydów104
<b>Tabela 15.</b> Skład jakościowy i ilościowy roboczego roztworu [γ-32P] ATP służącego do
znakowania izotopowego oligonukleotydów104
Tabela 16. Specyfikacja stosowanej kinazy T4.    105
<b>Tabela 17.</b> Specyfikacja stosowanego [γ-32P] ATP105
<b>Tabela 18.</b> Specyfikacja enzymów UDG i hAPE1 stosowanych w pracach badawczych.108
Tabela 19. Składy jakościowe i ilościowe mieszanin reakcyinych w ramach analizy
aktywności enzymów UDG i hAPE1108
Tabela 20. Specyfikacje enzymów SspI i BsmAI stosowanych w pracach badawczych.

<b>Tabela 21.</b> Składy jakościowe i ilościowe mieszanin reakcyjnych w ramach analizy
aktywności enzymów SsnI i BsmAI
<b>Tabela 22</b> Specufikacie enzymów OGG1 i EPG stosowanych w pracach badawczych 111
<b>Tabela 22.</b> Składy jakościowa i ilościowa mieszaniu roskowinych w pracach badawczych. 111
labera 23. Składy jakościowe i nościowe inieszanini reakcyjnych w ramach analizy
aktywnosci enzymow OGGI i FPG
<b>Tabela 24.</b> Skład jakościowy i ilościowy denaturujących żeli poliakrylamidowych w
przeliczeniu na 1 litr roztworu113
Tabela 25. Skład jakościowy i ilościowy mieszaniny akrylamidu i bisakrylamidu w
stosunku 19:1, w przeliczeniu na 1 litr roztworu gotowego114
Tabela 26. Skład jakościowy i ilościowy buforu TBE (10x) w przeliczeniu na 1 litr
roztworu gotowego114
<b>Tabela 27.</b> Skład jakościowy i ilościowy LB zawierającego 2 mM EDTA-NA <sub>2</sub> (10x) w
przeliczeniu na 30 ml roztworu gotowego114
Tabela 28. Skład jakościowy i ilościowy LB zawierającego 2 mM EDTA-Na <sub>2</sub> (1x) w
przeliczeniu na 10 ml roztworu gotowego115
Tabela 29. Skład jakościowy i ilościowy LB natywnego (6x) w przeliczeniu na 30 ml
roztworu gotowego
Tabela 30. Wyniki liczbowe objętości prążków prób badanych oraz teł dla pierwszego
powtórzenia reakcji enzymatycznej hydrolizy nici dU(-6)/(+6)H/dA przez enzym FPG.
Przedostatnia kolumna przedstawia sumę objętości wszystkich prążków dla danego czasu
reakcji po odjęciu tła. Ostatnia kolumna przedstawia wynik procentowy objętości
konkretnych prążków w odniesieniu do swszystkich prążków dla danego czasu reakcji.
Tabela 31. Dane liczbowe uzyskane w ramach analizy aktywności enzymu UDG 120
Tabela 32. Dane liczbowe uzyskane w ramach analizy aktywności enzymu hAPE1126
Tabela 33. Dane liczbowe uzyskane w ramach analizy aktywności enzymu OGG1131
Tabela 34. Dane liczbowe uzyskane w ramach analizy aktywności enzymu FPG
Tabela 35. Dane liczbowe uzyskane w ramach analizy aktywności enzymu SspI133
Tabela 36. Dane liczbowe uzyskane w ramach analizy aktywności enzymu BsmAI 137

## **10. Bibliografia**

- J. F. Alhmoud, J. F. Woolley, A. Al Moustafa, and M. I. Malki, "DNA Damage / Repair Management in Cancers" 2020.
- S. Sudhir Ambekar, "DNA: Damage and Repair Mechanisms in Humans," *Glob. J. Pharm. Pharm. Sci.*, vol. 3, no. 3, 2017, doi: 10.19080/gjpps.2017.03.555613.
- [3] F. Gorini, G. Scala, M. S. Cooke, B. Majello, and S. Amente, "Towards a comprehensive view of 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine: Highlighting the intertwined roles of DNA damage and epigenetics in genomic instability," *DNA Repair (Amst).*, vol. 97, p. 103027, 2021, doi: 10.1016/j.dnarep.2020.103027.
- [4] T. Lindahl, "Instability and decay of the primary structure of DNA," *Nature*, vol. 362, pp. 709–715, 1993.
- [5] I. Kuraoka, C. Bender, A. Romieu, J. Cadet, R. D. Wood, and T. Lindahl, "Removal of oxygen free-radical-induced 5',8-purine cyclodeoxynucleosides from DNA by the nucleotide excision-repair pathway in human cells," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 97, no. 8, pp. 3832–3837, 2000, doi: 10.1073/pnas.070471597.
- [6] P. J. Brooks, "The cyclopurine deoxynucleosides: DNA repair, biological effects, mechanistic insights, and unanswered questions," *Free Radic. Biol. Med.*, vol. 107, no. September 2016, pp. 90–100, 2017, doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2016.12.028.
- B. Bukowska and B. T. Karwowski, "The Clustered DNA Lesions Types, Pathways of Repair and Relevance to Human Health," *Curr. Med. Chem.*, vol. 25, no. 23, pp. 2722–2735, 2018, doi: 10.2174/0929867325666180226110502.
- [8] C. Chatgilialoglu *et al.*, "5',8-Cyclopurine lesions in DNA damage: Chemical, analytical, biological, and diagnostic significance," *Cells*, vol. 8, no. 6, 2019, doi: 10.3390/cells8060513.
- [9] C. You *et al.*, "A quantitative assay for assessing the effects of DNA lesions on transcription," *Nat. Chem. Biol.*, vol. 8, no. 10, pp. 817–822, 2012, doi: 10.1038/nchembio.1046.
- [10] M. Dizdaroglu, E. Coskun, and P. Jaruga, "Measurement of oxidatively induced DNA damage and its repair, by mass spectrometric techniques," *Free Radic. Res.*, vol. 49, no. 5, pp. 525–548, 2015, doi: 10.3109/10715762.2015.1014814.

- H. Huang, R. S. Das, A. K. Basu, and M. P. Stone, "Structures of (5'S)-8,5'-Cyclo-2'deoxyguanosine Mismatched with dA or dT," *Chem. Res. Toxicol.*, vol. 25, no. 2, pp. 478– 490, 2012, doi: 10.1021/tx2005053.
- [12] B. T. Karwowski, S. Bellon, P. O'Neill, M. E. Lomax, and J. Cadet, "Effects of (5'S)-5',8cyclo-2'-deoxyadenosine on the base excision repair of oxidatively generated clustered DNA damage. A biochemical and theoretical study," *Org. Biomol. Chem.*, vol. 12, no. 43, pp. 8671–8682, 2014, doi: 10.1039/c4ob01089b.
- [13] B. T. Karwowski, "The Influence of (5'R)- and (5'S)-5',8-Cyclo-2'-Deoxyadenosine on UDG and hAPE1 Activity. Tandem Lesions are the Base Excision Repair System's Nightmare," pp. 1–20, 2019.
- K. Govender *et al.*, "A novel and more efficient biosynthesis approach for human insulin production in Escherichia coli (E. coli)," *AMB Express*, vol. 10, no. 1, 2020, doi: 10.1186/s13568-020-00969-w.
- [15] A. Gonzalez-Perez, R. Sabarinathan, and N. Lopez-Bigas, "Local Determinants of the Mutational Landscape of the Human Genome," *Cell*, vol. 177, no. 1, pp. 101–114, 2019, doi: 10.1016/j.cell.2019.02.051.
- [16] S. P. Jackson and J. Bartek, "The DNA-damage response in human biology and disease," *Nature*, vol. 461, no. 7267, pp. 1071–1078, 2009, doi: 10.1038/nature08467.
- B. F. Godley, F. A. Shamsi, F. Q. Liang, S. G. Jarrett, S. Davies, and M. Boulton, "Blue light induces mitochondrial DNA damage and free radical production in epithelial cells," *J. Biol. Chem.*, vol. 280, no. 22, pp. 21061–21066, 2005, doi: 10.1074/jbc.M502194200.
- S. Thürmer *et al.*, "Accurate vertical ionization energy and work function determinations of liquid water and aqueous solutions," *Chem. Sci.*, vol. 12, no. 31, pp. 10558–10582, 2021, doi: 10.1039/d1sc01908b.
- [19] A. E. Gasperini, S. Sanchez, A. L. Doiron, M. Lyles, and G. K. German, "Non-ionising UV light increases the optical density of hygroscopic self assembled DNA crystal films," *Sci. Rep.*, vol. 7, no. 1, pp. 1–10, 2017, doi: 10.1038/s41598-017-06884-8.
- [20] V. Mladenova, E. Mladenov, M. Stuschke, and G. Iliakis, "DNA Damage Clustering after Ionizing Radiation and Consequences in the Processing of Chromatin Breaks," *Molecules*, vol. 27, no. 5, pp. 1–18, 2022, doi: 10.3390/molecules27051540.
- [21] R. J. Carter, C. M. Nickson, J. M. Thompson, A. Kacperek, M. A. Hill, and J. L. Parsons,

"Characterisation of Deubiquitylating Enzymes in the Cellular Response to High-LET Ionizing Radiation and Complex DNA Damage," *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, vol. 104, no. 3, pp. 656–665, 2019, doi: 10.1016/j.ijrobp.2019.02.053.

- [22] M. A. Hill, "Radiation Track Structure: How the Spatial Distribution of Energy Deposition Drives Biological Response," *Clin. Oncol.*, vol. 32, no. 2, pp. 75–83, 2020, doi: 10.1016/j.clon.2019.08.006.
- [23] L. Zhao *et al.*, "The Determinant of DNA Repair Pathway Choices in Ionising Radiation-Induced DNA Double-Strand Breaks," *Biomed Res. Int.*, vol. 2020, 2020, doi: 10.1155/2020/4834965.
- [24] A. C. Vítor, P. Huertas, G. Legube, and S. F. de Almeida, "Studying DNA Double-Strand Break Repair: An Ever-Growing Toolbox," *Front. Mol. Biosci.*, vol. 7, no. February, pp. 1– 16, 2020, doi: 10.3389/fmolb.2020.00024.
- [25] T. Matsunaga, Y. Hatakeyama, M. Ohta, T. Mori, and O. Nikaido, "Establishment and Characterization of a Monoclonal Antibody Recognizing The Dewar Isomers of (6– 4)Photoproducts," *Photochem. Photobiol.*, vol. 57, no. 6, pp. 934–940, 1993, doi: 10.1111/j.1751-1097.1993.tb02952.x.
- [26] J. Yamamoto, P. Plaza, and K. Brettel, "Repair of (6-4) Lesions in DNA by (6-4) Photolyase:
  20 Years of Quest for the Photoreaction Mechanism," *Photochem. Photobiol.*, vol. 93, no.
  1, pp. 51–66, 2017, doi: 10.1111/php.12696.
- [27] P. Chen *et al.*, "Retinal neuron is more sensitive to blue light-induced damage than glia cell due to DNA Double-strand breaks," *Cells*, vol. 8, no. 1, 2019, doi: 10.3390/cells8010068.
- [28] Q. Gueranger *et al.*, "Protein oxidation and DNA repair inhibition by 6-thioguanine and UVA radiation," *J. Invest. Dermatol.*, vol. 134, no. 5, pp. 1408–1417, 2014, doi: 10.1038/jid.2013.509.
- [29] E. Markkanen, "Not breathing is not an option: How to deal with oxidative DNA damage," DNA Repair (Amst)., vol. 59, no. September, pp. 82–105, 2017, doi: 10.1016/j.dnarep.2017.09.007.
- [30] D. Pluskota-Karwatka, "Modifications of nucleosides by endogenous mutagens-DNA adducts arising from cellular processes," *Bioorg. Chem.*, vol. 36, no. 4, pp. 198–213, 2008, doi: 10.1016/j.bioorg.2008.04.002.
- [31] P. Boesch et al., "DNA repair in organelles: Pathways, organization, regulation, relevance

in disease and aging," *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.*, vol. 1813, no. 1, pp. 186–200, 2011, doi: 10.1016/j.bbamcr.2010.10.002.

- [32] A. Tubbs and A. Nussenzweig, "Endogenous DNA Damage as a Source of Genomic Instability in Cancer," *Cell*, vol. 168, no. 4, pp. 644–656, 2017, doi: 10.1016/j.cell.2017.01.002.
- [33] M. Tomkova and B. Schuster-Böckler, "DNA Modifications: Naturally More Error Prone?," *Trends Genet.*, vol. 34, no. 8, pp. 627–638, 2018, doi: 10.1016/j.tig.2018.04.005.
- [34] H. G. Linhart *et al.*, "Folate Deficiency Induces Genomic Uracil Misincorporation and Hypomethylation But Does Not Increase DNA Point Mutations," *Gastroenterology*, vol. 136, no. 1, pp. 227-235.e3, 2009, doi: 10.1053/j.gastro.2008.10.016.
- [35] A. Y. Panchin, V. J. Makeev, and Y. A. Medvedeva, "Preservation of methylated CpG dinucleotides in human CpG islands," *Biol. Direct*, vol. 11, no. 1, pp. 1–15, 2016, doi: 10.1186/S13062-016-0113-X.
- [36] F. Blokzijl *et al.*, "Tissue-specific mutation accumulation in human adult stem cells during life," *Nature*, vol. 538, no. 7624, pp. 260–264, 2016, doi: 10.1038/nature19768.
- [37] R. Rahbari *et al.*, "Timing, rates and spectra of human germline mutation," *Nat. Genet.*, vol. 48, no. 2, pp. 126–133, 2016, doi: 10.1038/ng.3469.
- [38] A. Breiling and F. Lyko, "Epigenetic regulatory functions of DNA modifications: 5methylcytosine and beyond," *Epigenetics and Chromatin*, vol. 8, no. 1, pp. 1–9, 2015, doi: 10.1186/s13072-015-0016-6.
- [39] Y. Yin, S. Sasaki, and Y. Taniguchi, "Recognition and excision properties of 8-halogenated-7-deaza-2'-deoxyguanosine as 8-oxo-2'-deoxyguanosine analogues and fpg and hOGG1 inhibitors," *ChemBioChem*, vol. 16, no. 8, pp. 1190–1198, 2015, doi: 10.1002/cbic.201402690.
- [40] E. Privat and L. C. Sowers, "Photochemical deamination and demethylation of 5methylcytosine," *Chem. Res. Toxicol.*, vol. 9, no. 4, pp. 745–750, 1996, doi: 10.1021/tx9501820.
- [41] C. Wu and T. Kurinomaru, "Development of the bioluminescent immunoassay for the detection of 5-hydroxymethylcytosine in dinoflagellate," *Anal. Sci.*, vol. 35, no. 3, pp. 301– 305, 2019, doi: 10.2116/analsci.18P401.
- [42] C. Gerecke, C. Egea Rodrigues, T. Homann, and B. Kleuser, "The Role of Ten-Eleven

Translocation Proteins in Inflammation," *Front. Immunol.*, vol. 13, no. March, pp. 1–18, 2022, doi: 10.3389/fimmu.2022.861351.

- [43] E. Mahfoudhi *et al.*, "TET2-mediated 5-hydroxymethylcytosine induces genetic instability and mutagenesis," *DNA Repair (Amst).*, vol. 43, pp. 78–88, 2016, doi: 10.1016/j.dnarep.2016.05.031.
- [44] A. Rosca *et al.*, "Immunoassay and molecular methods to investigate DNA methylation changes in peripheral blood mononuclear cells in HIV infected patients on cART," *J. Immunoass. Immunochem.*, vol. 38, no. 3, pp. 299–307, 2017, doi: 10.1080/15321819.2016.1260587.
- [45] D. L. Bordin, L. Lirussi, and H. Nilsen, "Cellular response to endogenous DNA damage: DNA base modifications in gene expression regulation," *DNA Repair (Amst).*, vol. 99, p. 103051, 2021, doi: 10.1016/j.dnarep.2021.103051.
- [46] S. Imoto, L. A. Bransfield, D. L. Croteau, B. Van Houten, and M. M. Greenberg, "DNA tandem lesion repair by strand displacement synthesis and nucleotide excision repair," *Biochemistry*, vol. 47, no. 14, pp. 4306–4316, 2008, doi: 10.1021/bi7021427.
- [47] E. Sage and N. Shikazono, "Radiation-induced clustered DNA lesions: Repair and mutagenesis," *Free Radic. Biol. Med.*, vol. 107, pp. 125–135, 2017, doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2016.12.008.
- [48] D. J. Laverty and M. M. Greenberg, "Expanded Substrate Scope of DNA Polymerase θ and DNA Polymerase β: Lyase Activity on 5'-Overhangs and Clustered Lesions," *Biochemistry*, vol. 57, no. 42, pp. 6119–6127, 2018, doi: 10.1021/acs.biochem.8b00911.
- [49] B. Jakob, M. Dubiak-Szepietowska, E. Janiel, A. Schmidt, M. Durante, and G. Taucher-Scholz, "Differential Repair Protein Recruitment at Sites of Clustered and Isolated DNA Double-Strand Breaks Produced by High-Energy Heavy Ions," *Sci. Rep.*, vol. 10, no. 1, p. 1443, 2020, doi: 10.1038/s41598-020-58084-6.
- [50] K. Kropachev *et al.*, "Structural basis for the recognition of diastereomeric 5',8-cyclo- 2'deoxypurine lesions by the human nucleotide excision repair system," *Nucleic Acids Res.*, vol. 42, no. 8, pp. 5020–5032, 2014, doi: 10.1093/nar/gku162.
- [51] S. Czene and M. Harms-Ringdahl, "Detection of single-strand breaks and formamidopyrimidine-DNA glycosylase-sensitive sites in DNA of cultured human fibroblasts," *Mutat. Res. Repair*, vol. 336, no. 3, pp. 235–242, 1995, doi: 10.1016/0921-

8777(94)00058-E.

- [52] M. Hada and A. G. Georgakilas, "Formation of clustered DNA damage after high-LET irradiation: A review," J. Radiat. Res., vol. 49, no. 3, pp. 203–210, 2008, doi: 10.1269/jrr.07123.
- [53] D. D. Shamina *et al.*, "The complexity of clustered DNA DSBs in human fibroblasts under the action of low and high-LET radiation," *AIP Conf. Proc.*, vol. 2377, no. September, 2021, doi: 10.1063/5.0063357.
- [54] I. V. Mavragani *et al.*, "Complex DNA damage: A route to radiation-induced genomic instability and carcinogenesis," *Cancers (Basel).*, vol. 9, no. 7, pp. 1–21, 2017, doi: 10.3390/cancers9070091.
- [55] J. Nakamura and J. A. Swenberg, "Endogenous apurinic/apyrimidinic sites in genomic DNA of mammalian tissues," *Cancer Res.*, vol. 59, no. 11, pp. 2522–2526, 1999.
- [56] J. A. Nickoloff, N. Sharma, and L. Taylor, "Clustered DNA double-strand breaks: Biological effects and relevance to cancer radiotherapy," *Genes (Basel).*, vol. 11, no. 1, 2020, doi: 10.3390/genes11010099.
- [57] M. M. Vilenchik and A. G. Knudson, "Endogenous DNA double-strand breaks: Production, fidelity of repair, and induction of cancer," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 100, no. 22, pp. 12871–12876, 2003, doi: 10.1073/pnas.2135498100.
- [58] H. E. Krokan, F. Drabløs, and G. Slupphaug, "Uracil in DNA Occurrence, consequences and repair," *Oncogene*, vol. 21, no. 58 REV. ISS. 8, pp. 8935–8948, 2002, doi: 10.1038/sj.onc.1205996.
- [59] P. A. Van Der Kemp, D. Thomas, R. Barbey, R. De Oliveira, and S. Boiteux, "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.*, vol. 93, no. 11, pp. 5197– 5202, 1996, doi: 10.1073/pnas.93.11.5197.
- [60] R. Lu, H. M. Nash, and G. L. Verdine, "A mammalian DNA repair enzyme that excises oxidatively damaged guanines maps to a locus frequently lost in lung cancer," *Curr. Biol.*, vol. 7, no. 6, pp. 397–407, 1997, doi: 10.1016/S0960-9822(06)00187-4.
- [61] R. Zhang, Y. Niu, and Y. Zhou, "Increase the cisplatin cytotoxicity and cisplatin-induced DNA damage in HepG2 cells by XRCC1 abrogation related mechanisms," *Toxicol. Lett.*,

vol. 192, no. 2, pp. 108–114, 2010, doi: 10.1016/j.toxlet.2009.10.012.

- [62] A. Yimit, O. Adebali, A. Sancar, and Y. Jiang, "Differential damage and repair of DNAadducts induced by anti-cancer drug cisplatin across mouse organs," *Nat. Commun.*, vol. 10, no. 1, 2019, doi: 10.1038/s41467-019-08290-2.
- [63] M. Duan, J. Ulibarri, K. J. Liu, and P. Mao, "Role of nucleotide excision repair in cisplatin resistance," *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 21, no. 23, pp. 1–13, 2020, doi: 10.3390/ijms21239248.
- [64] Y. Krasikova, N. Rechkunova, and O. Lavrik, "Nucleotide excision repair: From molecular defects to neurological abnormalities," *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 22, no. 12, 2021, doi: 10.3390/ijms22126220.
- [65] D. J. López, J. A. Rodríguez, and S. Bañuelos, "Molecular mechanisms regulating the dna repair protein ape1: A focus on its flexible n-terminal tail domain," *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 22, no. 12, pp. 1–17, 2021, doi: 10.3390/ijms22126308.
- [66] Y. Matsumoto, "Molecular Mechanism of PCNA-Dependent Base Excision Repair II" Pogress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology vol. 68, 2001.
- [67] E. A. Belousova, I. A. Vasil'eva, N. A. Moor, T. S. Zatsepin, T. S. Oretskaya, and O. I. Lavrik, "Clustered DNA Lesions Containing 5-Formyluracil and AP Site: Repair via the BER System," *PLoS One*, vol. 8, no. 8, pp. 1–11, 2013, doi: 10.1371/journal.pone.0068576.
- [68] J. C. Muñoz, I. Beckerman, R. Choudhary, L. A. Bouvier, and M. J. Muñoz, "DNA Damage-Induced RNAPII Degradation and Its Consequences in Gene Expression," *Genes*, vol. 13, no. 11. 2022. doi: 10.3390/genes13111951.
- [69] M. E. Geijer and J. A. Marteijn, "What happens at the lesion does not stay at the lesion: Transcription-coupled nucleotide excision repair and the effects of DNA damage on transcription in cis and trans," *DNA Repair (Amst).*, vol. 71, no. August, pp. 56–68, 2018, doi: 10.1016/j.dnarep.2018.08.007.
- [70] G. Spivak, "Nucleotide excision repair in humans," *Physiol. Behav.*, vol. 176, no. 1, pp. 1570–1573, 2018, doi: 10.1016/j.dnarep.2015.09.003.Nucleotide.
- [71] H. Long, S. F. Miller, E. Williams, and M. Lynch, "Specificity of the DNA mismatch repair system (MMR) and mutagenesis bias in bacteria," *Mol. Biol. Evol.*, vol. 35, no. 10, pp. 2414– 2421, 2018, doi: 10.1093/molbev/msy134.
- [72] P. J. Masih, D. Kunnev, and T. Melendy, "Mismatch repair proteins are recruited to replicating DNA through interaction with Proliferating Cell Nuclear Antigen (PCNA),"

Nucleic Acids Res., vol. 36, no. 1, pp. 67–75, 2008, doi: 10.1093/nar/gkm943.

- [73] V. Gorbunova, A. Seluanov, Z. Mao, and C. Hine, "Changes in DNA repair during aging," *Nucleic Acids Res.*, vol. 35, no. 22, pp. 7466–7474, 2007, doi: 10.1093/nar/gkm756.
- [74] M. R. Lieber, "The mechanism of DSB repair by the NHEJ," *Annu. Rev. Biochem.*, vol. 79, no. 3, pp. 181–211, 2011, doi: 10.1146/annurev.biochem.052308.093131.The.
- [75] C. Bertrand, A. Thibessard, C. Bruand, F. Lecointe, and P. Leblond, "Bacterial NHEJ: a never ending story," *Mol. Microbiol.*, vol. 111, no. 5, pp. 1139–1151, 2019, doi: 10.1111/mmi.14218.
- [76] W. F. Martin, "Endosymbiotic theories for eukaryote origin," *Philos. Trans. B*, vol. 370, 2015, doi: 10.1002/(sici)1520-6629(199805)26:3<269::aid-jcop8>3.0.co;2-q.
- [77] M. Brandeis, "Were eukaryotes made by sex?: Sex might have been vital for merging endosymbiont and host genomes giving rise to eukaryotes," *BioEssays*, vol. 43, no. 6, pp. 1–9, 2021, doi: 10.1002/bies.202000256.
- [78] H. Nagase, T. Watanabe, N. Koshikawa, S. Yamamoto, K. Takenaga, and J. Lin, "Mitochondria: Endosymbiont bacteria DNA sequence as a target against cancer," *Cancer Sci.*, vol. 112, no. 12, pp. 4834–4843, 2021, doi: 10.1111/cas.15143.
- [79] D. Speijer, M. Hammond, and J. Lukeš, "Comparing early eukaryotic integration of mitochondria and chloroplasts in the light of internal ROS challenges: Timing is of the essence," *MBio*, vol. 11, no. 3, 2020, doi: 10.1128/mBio.00955-20.
- [80] I. Zachar and G. Boza, "Endosymbiosis before eukaryotes: mitochondrial establishment in protoeukaryotes," *Cell. Mol. Life Sci.*, vol. 77, no. 18, pp. 3503–3523, 2020, doi: 10.1007/s00018-020-03462-6.
- [81] M. Alexeyev, I. Shokolenko, G. Wilson, and S. LeDoux, "The maintenance of mitochondrial DNA integrity - Critical analysis and update," *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, vol. 5, no. 5, 2013, doi: 10.1101/cshperspect.a012641.
- [82] M. Saki and A. Prakash, "DNA Damage Related Crosstalk Between the Nucleus and Mitochondria," *Free Radic. Biol. Med.*, vol. 176, no. 3, pp. 139–148, 2017, doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2016.11.050.DNA.
- [83] M. Takahashi, "Mitochondrial dysfunction promotes aquaporin expression that controls hydrogen peroxide permeability and ferroptosis," *Free Radic. Biol. Med.*, vol. 161, no. September, pp. 60–70, 2020, doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2020.09.027.

- [84] M. Zhang, L. Wang, and D. Zhong, "Photolyase: Dynamics and Mechanisms of Repair of Sun- Induced DNA Damage Meng," *Photochem. Photobiol.*, vol. 93, no. 1, pp. 78–92, 2017, doi: 10.1111/php.12695.Photolyase.
- [85] Y. Takashi *et al.*, "Mitochondrial dysfunction promotes aquaporin expression that controls hydrogen peroxide permeability and ferroptosis," *Free Radic. Biol. Med.*, vol. 161, no. September, pp. 60–70, 2020, doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2020.09.027.
- [86] R. T. Dame and M. Tark-Dame, "Bacterial chromatin: Converging views at different scales," *Curr. Opin. Cell Biol.*, vol. 40, pp. 60–65, 2016, doi: 10.1016/j.ceb.2016.02.015.
- [87] H. G. Hampton, B. N. J. Watson, and P. C. Fineran, "The arms race between bacteria and their phage foes," *Nature*, vol. 577, no. 7790, pp. 327–336, 2020, doi: 10.1038/s41586-019-1894-8.
- [88] Z. Hobbs and S. T. Abedon, "Diversity of phage infection types and associated terminology: the problem with 'Lytic or lysogenic," *FEMS Microbiol. Lett.*, vol. 363, no. 7, pp. 1–8, 2016, doi: 10.1093/FEMSLE/FNW047.
- [89] S. Wang, "SspABCD-SspFGH Constitutes a New Type of DNA," *MBio*, vol. 12, no. 2, pp. 1–12, 2021.
- [90] A. Bernheim and R. Sorek, "The pan-immune system of bacteria: antiviral defence as a community resource," *Nat. Rev. Microbiol.*, vol. 18, no. 2, pp. 113–119, 2020, doi: 10.1038/s41579-019-0278-2.
- [91] E. A. Mullins, A. A. Rodriguez, N. P. Bradley, and B. F. Eichman, "Emerging Roles of DNA Glycosylases and the Base Excision Repair Pathway," *Trends Biochem. Sci.*, vol. 44, no. 9, pp. 765–781, 2019, doi: 10.1016/j.tibs.2019.04.006.
- [92] P. H. Oliveira, M. Touchon, and E. P. C. Rocha, "The interplay of restriction-modification systems with mobile genetic elements and their prokaryotic hosts," *Nucleic Acids Res.*, vol. 42, no. 16, pp. 10618–10631, 2014, doi: 10.1093/nar/gku734.
- [93] J. C. Hesson, J. O. LundströM, P. Halvarsson, P. Erixon, and A. Collado, "A sensitive and reliable restriction enzyme assay to distinguish between the mosquitoes Culex torrentium and Culex pipiens," *Med. Vet. Entomol.*, vol. 24, no. 2, pp. 142–149, 2010, doi: 10.1111/j.1365-2915.2010.00871.x.
- [94] A. Muniesa-Vargas, A. F. Theil, C. Ribeiro-Silva, W. Vermeulen, and H. Lans, "XPG: a multitasking genome caretaker," *Cellular and Molecular Life Sciences*, vol. 79, no. 3. 2022.

doi: 10.1007/s00018-022-04194-5.

- [95] Q. Xue *et al.*, "Kinetic analysis of bypass of 7,8-dihydro-8-oxo-2'-deoxyguanosine by the catalytic core of yeast DNA polymerase η," *Biochimie*, vol. 121, pp. 161–169, 2016, doi: 10.1016/j.biochi.2015.12.009.
- [96] M. Piccione et al., "Xeroderma Pigmentosum : General Aspects and Management," 2021.
- [97] H. Cheng, C. Xie, R. Zhang, S. Hu, Z. Wang, and W. Yue, "Xeroderma Pigmentosum Complementation Group F Polymorphisms Influence Risk of Glioma," vol. 14, pp. 4083– 4087, 2013.
- [98] J. Lehmann and S. Emmert, "Xeroderma pigmentosum: Diagnostic procedures, interdisciplinary patient care, and novel therapeutic approaches," pp. 867–872, 2014, doi: 10.1111/ddg.12419.
- [99] L. Feller and R. A. G. Khammissa, "Xeroderma pigmentosum : a case report and review of the literature," no. June 2010, 2014, doi: 10.15167/2421-4248/jpmh2010.51.2.218.
- [100] A. T. Vessoni *et al.*, "Cockayne Syndrome: The many challenges and approaches to understand a multifaceted disease," vol. 1, no. suppl 1, 2020.
- [101] K. T. Abagge, F. Haupenthal, G. Y. Felber, and S. Raskin, "PIBIDS syndrome in two Brazilian siblings," *BMJ Case Rep.*, vol. 11, no. 1, pp. 11–14, 2018, doi: 10.1136/bcr-2017-223744.
- [102] P. Jaruga and M. Dizdaroglu, "8,5'-Cyclopurine-2'-deoxynucleosides in DNA: Mechanisms of formation, measurement, repair and biological effects," *DNA Repair (Amst).*, vol. 7, no. 9, pp. 1413–1425, 2008, doi: 10.1016/j.dnarep.2008.06.005.
- [103] P. Jaruga, E. Coskun, K. Kimbrough, A. Jacob, W. E. Johnson, and M. Dizdaroglu, "Biomarkers of oxidatively induced DNA damage in dreissenid mussels: A genotoxicity assessment tool for the Laurentian Great Lakes," *Environ. Toxicol.*, vol. 32, no. 9, pp. 2144– 2153, 2017, doi: 10.1002/tox.22427.
- [104] K. M. Anderson *et al.*, "Structural alterations in breast stromal and epithelial DNA: The influence of 8,5'-cyclo-2'-deoxyadenosine," *Cell Cycle*, vol. 5, no. 11, pp. 1240–1244, 2006, doi: 10.4161/cc.5.11.2816.
- [105] J. Wang, C. L. Clauson, P. D. Robbins, L. J. Niedernhofer, and Y. Wang, "The oxidative DNA lesions 8,5'-cyclopurines accumulate with aging in a tissue-specific manner," *Aging Cell*, vol. 11, no. 4, pp. 714–716, 2012, doi: 10.1111/j.1474-9726.2012.00828.x.

- [106] M. G. Krokidis *et al.*, "Purine 5',8-cyclo-2'-deoxynucleoside lesions: formation by radical stress and repair in human breast epithelial cancer cells," *Free Radic. Res.*, vol. 51, no. 5, pp. 470–482, 2017, doi: 10.1080/10715762.2017.1325485.
- [107] C. Chatgilialoglu, "Cyclopurine (cPu) lesions: what, how, and why?," *Free Radic. Res.*, vol. 53, no. 9–10, pp. 941–943, 2019, doi: 10.1080/10715762.2019.1643017.
- [108] Y. Fujii *et al.*, "Comparison of the bromodeoxyuridine-mediated sensitization effects between low-LET and high-LET ionizing radiation on DNA double-strand breaks," *Oncol. Rep.*, vol. 29, no. 6, pp. 2133–2139, 2013, doi: 10.3892/or.2013.2354.
- [109] D. L. Mitchell, J. P. Allison, and R. S. Nairn, "DNA Dimers in uv-Irradiated Cyclobutane Pyrimidine," vol. 123, no. 3, pp. 299–303, 2012.
- [110] S. S. Parikh *et al.*, "Uracil-DNA glycosylase-DNA substrate and product structures: Conformational strain promotes catalytic efficiency by coupled stereoelectronic effects," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 97, no. 10, pp. 5083–5088, 2000, doi: 10.1073/pnas.97.10.5083.
- [111] J. I. Baños-Sanz *et al.*, "Crystal structure and functional insights into uracil-DNA glycosylase inhibition by phage Φ29 DNA mimic protein p56.," *Nucleic Acids Res.*, vol. 41, no. 13, pp. 6761–6773, 2013, doi: 10.1093/nar/gkt395.
- [112] N. Schormann, R. Ricciardi, and D. Chattopadhyay, "Uracil-DNA glycosylases Structural and functional perspectives on an essential family of DNA repair enzymes," *Protein Sci.*, vol. 23, no. 12, pp. 1667–1685, 2014, doi: 10.1002/pro.2554.
- [113] M. Bazlekowa-Karaban *et al.*, "Mechanism of stimulation of DNA binding of the transcription factors by human apurinic/apyrimidinic endonuclease 1, APE1," *DNA Repair* (*Amst*)., vol. 82, no. January, p. 102698, 2019, doi: 10.1016/j.dnarep.2019.102698.
- [114] M. M. Aboelnga and S. D. Wetmore, "Unveiling a Single-Metal-Mediated Phosphodiester Bond Cleavage Mechanism for Nucleic Acids: A Multiscale Computational Investigation of a Human DNA Repair Enzyme," J. Am. Chem. Soc., vol. 141, no. 21, pp. 8646–8656, 2019, doi: 10.1021/jacs.9b03986.
- [115] A. A. Kuznetsova, O. S. Fedorova, and N. A. Kuznetsov, "Kinetic features of 30-50 exonuclease activity of human AP-endonuclease ape1," *Molecules*, vol. 23, no. 9, pp. 1–14, 2018, doi: 10.3390/molecules23092101.
- [116] A. M. Whitaker and B. D. Freudenthal, "APE1: A skilled nucleic acid surgeon," DNA Repair

(Amst)., vol. 71, no. August, pp. 93–100, 2018, doi: 10.1016/j.dnarep.2018.08.012.

- [117] B. D. Freudenthal, W. A. Beard, M. J. Cuneo, N. S. Dyrkheeva, and S. H. Wilson, "Capturing snapshots of APE1 processing DNA damage," *Nat. Struct. Mol. Biol.*, vol. 22, no. 11, pp. 924–931, 2015, doi: 10.1038/nsmb.3105.
- [118] M. Z. Hadi, K. Ginalski, L. H. Nguyen, and D. M. Wilson, "Determinants in nuclease specificity of Ape1 and Ape2, human homologues of Escherichia coli exonuclease III," J. Mol. Biol., vol. 316, no. 3, pp. 853–866, 2002, doi: 10.1006/jmbi.2001.5382.
- [119] S. Boiteux, F. Coste, and B. Castaing, "Repair of 8-oxo-7,8-dihydroguanine in prokaryotic and eukaryotic cells: Properties and biological roles of the Fpg and OGG1 DNA Nglycosylases," *Free Radic. Biol. Med.*, vol. 107, no. November 2016, pp. 179–201, 2017, doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2016.11.042.
- [120] C. J. Chetsanga, M. Lozon, C. Makaroff, and L. Savage, "Purification and Characterization of Escherichia coli Formamidopyrimidine-DNA Glycosylase That Excises Damaged 7-Methylguanine from Deoxyribonucleic Acid," *Biochemistry*, vol. 20, no. 18, pp. 5201–5207, 1981, doi: 10.1021/bi00521a016.
- [121] S. Duclos, P. Aller, P. Jaruga, M. Dizdaroglu, S. S. Wallace, and S. Doublié, "Structural and biochemical studies of a plant formamidopyrimidine-DNA glycosylase reveal why eukaryotic Fpg glycosylases do not excise 8-oxoguanine," *DNA Repair (Amst).*, vol. 11, no. 9, pp. 714–725, 2012, doi: 10.1016/j.dnarep.2012.06.004.
- [122] S. Sowlati-Hashjin and S. D. Wetmore, "Quantum mechanical study of the β- And δ-lyase reactions during the base excision repair process: Application to FPG," *Phys. Chem. Chem. Phys.*, vol. 17, no. 38, pp. 24696–24706, 2015, doi: 10.1039/c5cp04250j.
- [123] F. Huber, S. da Silva, T. C. B. Bomfim, K. R. S. Teixeira, and A. R. Bello, "Genotypic characterization and phylogenetic analysis of Cryptosporidium sp. from domestic animals in Brazil," *Vet. Parasitol.*, vol. 150, no. 1–2, pp. 65–74, 2007, doi: 10.1016/j.vetpar.2007.08.018.
- [124] G. A. Abdel-Alim, M. H. H. Awaad, and Y. M. Saif, "Characterization of Egyptian Field Strains of Infectious Bursal Disease Virus," *Avian Dis.*, vol. 47, no. 4, pp. 1452–1457, 2003, doi: 10.1637/7032.
- [125] D. J. Jackwood and S. E. Sommer, "Restriction fragment length polymorphisms in the VP2 gene of infectious bursal disease viruses from outside the United States," *Avian Dis.*, vol.

43, no. 2, pp. 310–314, 1999, doi: 10.2307/1592622.

- [126] A. Koltermann, U. Kettling, J. Bieschke, T. Winkler, and M. Eigen, "Rapid assay processing by integration of dual-color fluorescence cross-correlation spectroscopy: High throughput screening for enzyme activity," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 95, no. 4, pp. 1421– 1426, 1998, doi: 10.1073/pnas.95.4.1421.
- [127] A. O. Ture, Y. M. Saif, and D. J. Jackwood, "Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis of Highly Virulent Strains of Infectious Bursal Disease Viruses from Holland, Turkey, and Taiwan Published by: American Association of Avian Pathologists Stable URL: http://www.jstor.org/stable/1592673," vol. 42, no. 3, pp. 470–479, 2016.
- [128] R. J. Roberts, T. Vincze, J. Posfai, and D. Macelis, "REBASE-A database for DNA restriction and modification: Enzymes, genes and genomes," *Nucleic Acids Res.*, vol. 38, no. SUPPL.1, pp. 2009–2011, 2009, doi: 10.1093/nar/gkp874.
- [129] A. Pingoud, M. Fuxreiter, V. Pingoud, and W. Wende, "Type II restriction endonucleases: Structure and mechanism," *Cell. Mol. Life Sci.*, vol. 62, no. 6, pp. 685–707, 2005, doi: 10.1007/s00018-004-4513-1.
- [130] L. Dijkshoorn, B. Van Harsselaar, I. Tjernberg, P. J. M. Bouvet, and M. Vaneechoutte, "Evaluation of amplified ribosomal DNA restriction analysis for identification of Acinetobacter genomic species," *Syst. Appl. Microbiol.*, vol. 21, no. 1, pp. 33–39, 1998, doi: 10.1016/S0723-2020(98)80006-4.
- [131] Z. Zhu, J. C. Samuelson, J. Zhou, A. Dore, and S. Y. Xu, "Engineering Strand-specific DNA Nicking Enzymes from the Type IIS Restriction Endonucleases BsaI, BsmBI, and BsmAI," *J. Mol. Biol.*, vol. 337, no. 3, pp. 573–583, 2004, doi: 10.1016/j.jmb.2004.02.003.
- [132] A. Jakubauskas, G. Sasnauskas, J. Giedriene, and A. Janulaitis, "Domain organization and functional analysis of type IIS restriction endonuclease Eco31I," *Biochemistry*, vol. 47, no. 33, pp. 8546–8556, 2008, doi: 10.1021/bi800660u.
- [133] P. Pande, "Repair efficiency of (5'S)-8,5'-cyclo-2'-deoxyguanosine and (5'S)-8,5'-cyclo-2'-deoxyadenosine depends on the complementary base," *DNA Repair (Amst).*, vol. 11, no. 111, pp. 926–931, 2012, doi: 10.1038/nature08365.Reconstructing.
- [134] A. Romieu, D. Gasparutto, and J. Cadet, "Synthesis and Characterization of Oligonucleotides Containing 5 ', 8-Cyclopurine 2 '-Deoxyribonucleosides :," *Chem. Res. Toxicol.*, vol. 12, no. Chart 1, pp. 412–421, 1999.

Źródła internetowe:

[A]: <u>RJR REBASE Enz 1746 - SspI (neb.com)</u>

[B]: <u>REBASE enz 1746 seq 883 - SspI Sequence Data (neb.com)</u>

[C]: <u>Restriction endonuclease - Stenotrophomonas sp. ZAC14D1\_NAIMI4\_6 | UniProtKB</u>

UniProt

[D]: <u>bsmAIR - BsmAI endonuclease - Geobacillus stearothermophilus (Bacillus stearothermophilus) | UniProtKB | UniProt</u>

[E]: RJR REBASE Enz 387 - BsmAI (neb.com)

[F]: <u>REBASE enz 387 seq 1312 - BsmAI Sequence Data (neb.com)</u>