



UNIWERSYTET  
MEDYCZNY  
W ŁODZI

UNIWERSYTET MEDYCZNY W ŁODZI

Wydział Farmaceutyczny

Rozprawa doktorska

Dziedzina: nauki medyczne i nauki o zdrowiu

Dyscyplina: nauki farmaceutyczne

**Wpływ 5',8-cyklo-2'-deoksy puryn na mechanizmy naprawy uszkodzeń  
zespolonych DNA w ekstraktach mitochondrialnych**

*Effect of 5',8-cyclo-2'-deoxypurines on the mechanism of repair of clustered DNA damage  
in mitochondrial extracts*

mgr inż. Karolina Boguszevska

Promotor: prof. dr hab. n. farm. Bolesław T. Karwowski

Zakład Bromatologii

Uniwersytetu Medycznego w Łodzi

Łódź, 2023



*Niniejszą rozprawę dedykuje mojemu tacie,*

*Przez którego*

*i Bez którego*

*Nie byłoby to możliwe*

*oraz*

*Wszystkim tym, którzy wierzyli we mnie, kiedy ja wątpiłam.*



## **Podziękowania**

Prezentowana rozprawa doktorska przygotowana została pod opieką naukową Pana prof. dr hab. n. farm. Bolesława T. Karwowskiego, któremu pragnę złożyć najserdeczniejsze podziękowania za okazaną pomoc, ojcowską opiekę, cierpliwość oraz cenne uwagi i wskazówki merytoryczne, które wpłynęły na ostateczny kształt niniejszej dysertacji.

Realizacja badań prezentowanych w ramach niniejszej rozprawy doktorskiej nie byłaby możliwa bez pracy zespołowej i wzajemnej pomocy. Dlatego dziękuję wszystkim pozostałym współautorom publikacji będących podstawą niniejszej rozprawy doktorskiej, w osobach Pani dr n. chem. Julii Kaźmierczak-Barańskiej i Pana mgr inż. Michała Szewczuka.

Dziękuję również wszystkim pracownikom Zakładu Bromatologii Wydziału Farmaceutycznego Uniwersytetu Medycznego w Łodzi za wsparcie i przyjazną atmosferę w pracy.



# Spis treści

<b>1. Wykaz publikacji będących podstawą rozprawy doktorskiej</b>	<b>- 8 -</b>
<b>2. Wykaz skrótów</b>	<b>- 10 -</b>
<b>3. Uzasadnienie podjętej tematyki badawczej</b>	<b>- 12 -</b>
3.1. <i>Uszkodzenia DNA</i>	- 12 -
3.1.1. Reaktywne formy tlenu	- 12 -
3.1.2. Oksydacyjne uszkodzenia DNA	- 17 -
3.1.3. 5',8-cyklo-2'-deoksypuryny	- 20 -
3.2. <i>Uszkodzenia zespolone DNA</i>	- 23 -
3.3. <i>Systemy naprawy uszkodzeń DNA</i>	- 25 -
3.3.1. Naprawa uszkodzeń DNA poprzez wycięcie zasady	- 26 -
3.3.2. Mitochondrialny system naprawy DNA poprzez wycięcie zasady	- 28 -
3.4. <i>Mitochondria – wstęp</i>	- 31 -
3.5. <i>Choroby mitochondrialne</i>	- 33 -
<b>4. Cele naukowe pracy</b>	<b>- 37 -</b>
<b>5. Realizacja celów naukowych – wyniki badań i dyskusja</b>	<b>- 39 -</b>
5.1. <i>Model badawczy</i>	- 39 -
5.2. <i>Analiza wpływu 5',8-cyklo-2'-deoksypuryn na mechanizmy naprawy uszkodzeń zespolonych DNA w ekstraktach mitochondrialnych – Publikacja II i III</i>	- 43 -
5.2.1. Ocena wpływu (5'S)-5',8-cyklo-2'-deoksyadenozyny (ScdA) i (5'R)-5',8-cyklo-2'-deoksyadenozyny (RcdA) na proces naprawczy uszkodzeń zespolonych przez ekstrakty cytoplazmatyczne pozyskane z linii komórkowych xrs5, BJ i XPC – Publikacja II	- 45 -
5.2.2. Ocena wpływu (5'S) i (5'R) 5',8-cyklo-2'-deoksyadenozyny (cdA) oraz 5',8-cyklo-2'-deoksyguanozyny (RcdG) na proces naprawczy uszkodzeń zespolonych przez ekstrakty mitochondrialne pozyskane z linii komórkowej xrs5 – Publikacja III	- 49 -
5.3. <i>Wpływ 5',8-cyklo-2'-deoksyadenozyny na mutagenność w modelu bakteryjnym Escherichia coli – Publikacja IV</i>	- 52 -
<b>6. Podsumowanie wyników i wnioski</b>	<b>- 55 -</b>
<b>7. Materiał badawczy</b>	<b>- 59 -</b>
7.1. <i>Oligonukleotydy</i>	- 59 -
7.2. <i>Linie komórkowe</i>	- 60 -
<b>8. Metody badawcze</b>	<b>- 62 -</b>
8.1. <i>Analiza jednoniciowych oligonukleotydów</i>	- 62 -
8.2. <i>Przygotowanie oligonukleotydów do badań systemów naprawczych z wykorzystaniem eukariotycznych ekstraktów komórkowych</i>	- 62 -
8.3. <i>Przygotowanie ekstraktów komórkowych</i>	- 63 -

8.4. Analiza aktywności enzymatycznej białek odpowiedzialnych za poszczególne etapy naprawy uszkodzeń zespolonych DNA zawierających 5',8-cyklo-2'-deoksypuryny	- 63 -
8.5. Przygotowanie oligonukleotydów do badań systemów naprawczych z wykorzystaniem modelu prokariotycznego	- 66 -
8.6. Analiza mutagenności badanych uszkodzeń zespolonych zawierających 5',8-cyklo-2'-deoksyadenozynę	- 66 -
<b>9. Streszczenie w języku polskim</b>	<b>- 68 -</b>
<b>10. Streszczenie w języku angielskim</b>	<b>- 71 -</b>
<b>11. Spis rycin i tabel</b>	<b>- 74 -</b>
<b>12. Bibliografia</b>	<b>- 75 -</b>
<b>13. Kopie publikacji będących podstawą rozprawy doktorskiej</b>	<b>- 95 -</b>
13.1. Publikacja I	- 95 -
13.2. Publikacja II	- 126 -
13.3. Publikacja III	- 196 -
13.4. Publikacja IV	- 241 -
<b>14. Oświadczenia osoby ubiegającej się o stopień doktora</b>	<b>- 257 -</b>
<b>15. Oświadczenia współautorów</b>	<b>- 260 -</b>
<b>16. Wykształcenie i całkowity dorobek naukowy osoby ubiegającej się o stopień doktora</b>	<b>- 265 -</b>



## 1. Wykaz publikacji będących podstawą rozprawy doktorskiej

Poniżej przedstawiono wykaz publikacji naukowych stanowiących podstawę rozprawy doktorskiej pt. "Wpływ 5',8-cyklo-2'-deoksypuryn na mechanizmy naprawy uszkodzeń zespolonych DNA w ekstraktach mitochondrialnych". Sumaryczny IF (*ISI Journal Citation Reports*) cyklu zgodny z rokiem opublikowania jest równy **13,849**, natomiast punktacja MNiSW/MEiN cyklu zgodnie z rokiem opublikowania wynosi **290**.

### **Publikacja I**

Boguszewska K., Szewczuk M., Kaźmierczak-Barańska J., Karwowski B.T.,

*The Similarities Between Human and Bacteria in the Context of Structure, Genome and Base Excision Repair* [w]: *Molecules*, 2020, 25 (12), 2857, 1-30, doi: 10.3390/molecules25122857

IF<sub>2020</sub>=**3,060**, MNiSW<sub>2019</sub>=**100 pkt**

### **Publikacja II**

Boguszewska K., Karwowski B.T., Kaźmierczak-Barańska J.,

*The Usefulness of Autoradiography for DNA Repair Proteins Activity Detection in the Cytoplasm towards Radiolabeled Oligonucleotides Containing 5',8-Cyclo-2'-deoxyadenosine* [w:] *Chemosensors*, 2022, 10 (6), 204, doi: 10.3390/chemosensors10060204

IF<sub>2022</sub>=**4,229**, MEiN<sub>2022</sub>=**20 pkt**

### **Publikacja III**

Boguszewska K., Kaźmierczak-Barańska J., Karwowski B.T.,

*The Influence of 5',8-Cyclo-2'-deoxypurines on the Mitochondrial Repair of Clustered DNA Damage in Xrs5 Cells: The Preliminary Study* [w:] *Molecules*, 2021, 26 (22), 7042, 10.3390/molecules26227042

IF<sub>2021</sub>=**4,411**, MEiN<sub>2021</sub>=**100 pkt**

### **Publikacja IV**

Boguszewska K., Kaźmierczak-Barańska J., Karwowski B.T.,

*Mutagenicity of a bi-stranded clustered DNA lesion containing (5'S) or (5'R) 5',8-cyclo-2'-deoxyAdenosine in Escherichia coli model* [w:] *Acta Biochimica Polonica*, 2022, 69 (4), 865-869, doi: 10.18388/abp.2020\_6382

IF<sub>2022</sub>=**2,149**, MEiN<sub>2022</sub>=**70 pkt**



## 2. Wykaz skrótów

APE1	Endonukleaza AP
BER	Szlak naprawy DNA przez wycięcie zasady
CAT	Katalaza
CDL	Uszkodzenia zespolone DNA
DDR	Szlak odpowiedzi komórkowej na uszkodzenia DNA
DSB	Pęknięcie podwójnej nici DNA
ETC	Łańcuch transportu elektronów
FEN1	Endonukleaza Flap
Gpx	Peroksydaza glutationowa
GSH	Glutation
HRR	Szlak naprawy pęknięć dwuniciowych DNA przez rekombinację homologiczną
IMM	Wewnętrzna błona mitochondrialna
LET	Liniowy współczynnik przenoszenia energii
LP-BER	Long-patch BER
Miejsce AP	Miejsce apurynowe/apirymidynowe
MMEJ	Szlak naprawy DNA poprzez łączenie końców za pośrednictwem mikrohomologii
MMR	Szlak naprawy źle sparowanych zasad azotowych
mtDNA	Mitochondrialny DNA
MTS	Sygnal kierowania białek do mitochondriów
nDNA	Jądrowy DNA
NER	szlak naprawy DNA poprzez wycięcie nukleotydów
OGG1	Glikozylaza 8-oxoguaniny 1
OMM	Zewnętrzna błona mitochondrialna
OXPHOS	Fosforylacja oksydacyjna
Pol	Polimeraza DNA
Prdx	Peroksyredoksyna
RcdA	(5'R)-5',8-cyklo-2'-deoksyadenozyna
RcdG	(5'R)-5',8-cyklo-2'-deoksyguanozyna
ROS	Reaktywne formy tlenu
ScdA	(5'S)-5',8-cyklo-2'-deoksyadenozyna
ScdG	(5'S)-5',8-cyklo-2'-deoksyguanozyna
SOD	Dysmutaza ponadtlenkowa
SP-BER	Short-patch BER
SSB	Pęknięcie pojedynczej nici DNA
STO	Syntetyczne terapeutyczne oligonukleotydy
Trx	Tioredoksyna
UDG	Glikozylaza uracyl DNA
XP	Xeroderma Pigmentosum



# Część teoretyczna

## 3. Uzasadnienie podjętej tematyki badawczej

### 3.1. Uszkodzenia DNA

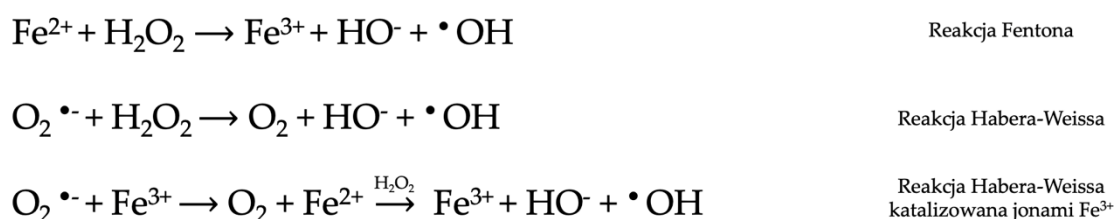
#### 3.1.1. Reaktywne formy tlenu

Reaktywne formy tlenu (*ang. reactive oxygen species, ROS*) są wysoce reaktywnymi cząsteczkami powstającymi w wyniku niepełnej redukcji tlenu. O ich wysokiej reaktywności decyduje obecność co najmniej jednego niesparowanego elektronu [1]. Około 5% całkowitego tlenu wdychanego z powietrzem jest przekształcane w ROS. Do najważniejszych z nich należą anionorodnik ponadtlenkowy ( $O_2^{\cdot-}$ ), rodnik wodoronadtlenkowy ( $HO_2^{\cdot}$ ), nadtlenek wodoru ( $H_2O_2$ ), rodnik hydroksylowy ( $\cdot OH$ ) i tlen singletowy ( $^1O_2$ ). ROS powstają w komórkach w wyniku działania czynników takich jak promieniowanie, stany zapalne i infekcje, choroby przewlekłe (np. urazy, nowotwory), związki chemiczne (np. pestycydy, benzopiren, podtlenek azotu), procesy metaboliczne (np. peroksydacja kwasów tłuszczowych) oraz zaburzenia metaboliczne (np. cukrzyca). Endogennie rodniki te powstają poprzez enzymatyczne układy komórkowe, takie jak reduktaza cytochromu P450, syntaza tlenku azotu lub w wyniku „wycieku elektronów” w ETC (*ang. electron transport chain*) [2,3]. Oddychanie komórkowe generuje około 90% ROS powstających w komórce [4]. Jonizacja i wzbudzenie molekuł w materii żywej to pierwsze ogniwo w łańcuchu przemian prowadzących do biologicznego efektu promieniowania jonizującego. Promieniowanie jonizujące może bezpośrednio uszkodzić biocząsteczkę poprzez jej jonizację i może generować wolne rodniki bezpośrednio w wyniku np. radiolizy wody, zaś powstałe rodniki wyzwalają łańcuch wtórnych reakcji biologicznych i generują kolejne generacje ROS.

Obecność wolnych rodników w komórce jest nierozdzielnie związana z jej metabolizmem. W warunkach fizjologicznych ROS utrzymywane są na odpowiednim poziomie. Nadmierna produkcja ROS i niedostateczna efektywność mechanizmów obrony antyoksydacyjnej może prowadzić do stanu zwanego stresem oksydacyjnym [5]. Stres oksydacyjny jest definiowany jako zaburzenie równowagi w kierunku zmian prooksydacyjnych w wyniku upośledzonej zdolności komórek do detoksykacji/kompensacji ogólnych uszkodzeń i nadprodukcji ROS. Jest to związane z nadprodukcją wolnych rodników w mitochondriach (ok. 2-3 nmol nadtlenków/min/mg białka), powstawaniem zaawansowanych produktów końcowych glikacji lub w wyniku aktywacji szlaku kinazy białkowej C, polioliu lub heksoaminy w odpowiedzi na podwyższony poziom glukozy [6,7]. Działanie rodników może obejmować niemal wszystkie biomolekuły występujące w organizmie m.in. modyfikacje białek, peroksydację lipidów [5]. Ich nadmiar prowadzić może do powstawania uszkodzeń DNA i zaburzenia

integralności jądrowego i mitochondrialnego DNA, które przy zmniejszonej aktywności układów antyoksydacyjnych wpływają na funkcje komórkowe i prowadzą do zaburzeń związanych ze starzeniem, degeneracją lub kancerogennością [5]. Kiedy produkcja rodników jest zbyt wysoka, funkcja i struktura mitochondriów są zaburzone, w tym integralność błony wewnętrznej. Ponadto bliskość genomu mitochondrialnego i łańcucha oddechowego może upośledzać integralność mtDNA, co prowadzi do zmniejszenia ogólnej aktywności mitochondriów wraz z wiekiem. Poziom tlenu w komórce jest kontrolowany przez specyficzne czynniki transkrypcyjne indukowane hipoksją (*ang. hypoxia induced factors, HIF*). Hamują one wytwarzanie ROS poprzez regulację syntezy acetylo-CoA, syntezy białek mitochondrialnych i mitofagii. Obniżony poziom O<sub>2</sub> prowadzi do aktywacji HIF, co z kolei hamuje produkcję ROS lub stymuluje produkcję zmiataczy wolnych rodników [8].

Ze względu na charakter ROS oraz ich losowe powstawanie i rozmieszczenie, powstałe uszkodzenia DNA mają głównie charakter izolowany [9]. Ostatecznie w przypadku stałej ekspozycji i/lub wysokiego stężenia ROS aktywowany zostaje proces zaprogramowanej śmierci komórki. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> nie stanowi bezpośredniego zagrożenia dla komórki ze względu na swoją umiarkowaną aktywność (potencjał utleniania 0,87-1,8 V w zależności od wartości pH), ale w pewnych warunkach może przekształcić się w wysoce reaktywny, krótko żyjący •OH (8,7·10<sup>-9</sup> s) o wysokim potencjale utleniającym (2,8 V) [10]. Rodnik •OH jako produkt radiolizy wody jest odpowiedzialny za większość oksydacyjnych uszkodzeń DNA. Może reagować z atomem węgla C5 lub atomem węgla z grupy metylowej obecnej w pirymidynach; atomem C8 w przypadku puryn lub grupą aminową adenin [11]. Rodnik •OH może występować w komórkach również jako produkt uboczny metabolizmu ksenobiotyków lub produkt reakcji Habera-Weissa katalizowanej jonami metali przejściowych, takich jak Fe, Cu, Cd. Proces ten poprzedzają 2 etapy: przeniesienie elektronu z jonu metalu (reakcja Fentona) oraz przeniesienie jednego elektronu z O<sub>2</sub><sup>•-</sup> (reakcja Habera-Weissa, Rycina 1).



**Rycina 1. Schemat reakcji Habera-Weissa katalizowanej jonami metali przejściowych.**

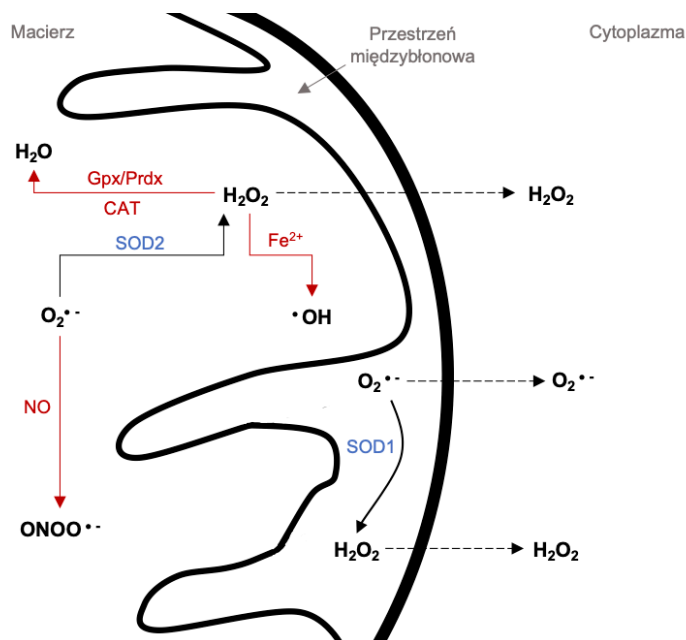
Żelazo jest pierwiastkiem niezbędnym dla prawidłowego funkcjonowania komórki. W warunkach fizjologicznych jest ono w znacznym stopniu sekwestrowane przez białka wiążące żelazo, takie jak transferyna lub ferrytyna. W warunkach patologicznych może dojść do niekontrolowanego uwalniania żelaza np. w przypadku talasemii lub hemochromatozy [12,13]. Zbyt wysoki poziom jonów żelaza

obserwuje się też u pacjentów cierpiących na choroby genetyczne (np. zespół Downa), choroby neurodegeneracyjne i niedokrwienne [12,14–16].

Właściwe stężenie przeciwutleniaczy jest niezbędne do utrzymania podstawowych funkcji komórek (prolifracji, różnicowania, produkcji energii) oraz funkcjonowania całych narządów, których aktywność może zmieniać się w zależności od wewnątrzkomórkowego stężenia ROS. W przypadku nadprodukcji ROS lub niewystarczającej ilości zmiataczy wolnych rodników wewnątrzkomórkowa homeostaza redoks zostaje zakłócona. Aby temu zapobiec organizmy wytworzyły szereg mechanizmów antyoksydacyjnych, które obejmują następujące przeciwutleniacze [17]:

- Enzymatyczne:
  - dysmutaza ponadtlenkowa (*ang. superoxide dismutase, SOD*),
  - katalaza (*ang. catalase, CAT*),
  - tioredoksyna (*ang. thioredoxin, Trx*),
  - peroksyredoksyna (*ang. peroxiredoxin, Prdx*),
  - hemeoksygenazę-1 (*ang. hemoxygenase-1, HO-1*),
  - peroksydaza glutationowa (*ang. glutathione peroxidase, Gpx*),
  - reduktaza glutationowa (*ang. glutathion reductase, GR*),
  - S-transferaza glutationowa (*ang. glutathione S-transferase, GST*),
- Nieenzymatyczne (o niskiej masie cząsteczkowej):
  - witamina A,
  - kwas askorbinowy (witamina C),
  - $\alpha$ -tokoferol (witamina E),
  - $\beta$ -karoten,
  - kwas moczowy,
  - glutation (*ang. glutathion, GSH*).

Najczęściej badanymi enzymami przeciwutleniaczami w kontekście mitochondriów są SOD, CAT i Gpx [14,17,18]. ROS powstają w mitochondriach głównie w wyniku reakcji  $O_2$  z elektronami pochodzącymi z kompleksu I i III ETC [7]. IMM jest nieprzepuszczalny dla  $O_2^{\bullet-}$ , dlatego aniony tworzone przez kompleks I kierowane są do macierzy mitochondrialnej, a kompleks III może kierować pewną ich ilość także do przestrzeni międzybłonowej, gdzie może zostać przekształcony do  $O_2$  i  $H_2O_2$  przez SOD1 lub SOD2 (Rycina 2) [3].



Rycina 2. Schematyczne przedstawienie sygnalizacji ROS w ludzkich mitochondriach.

SOD stanowi „pierwszą linię obrony” przed ROS w mitochondriach [4]. Co ciekawe, dostępne wyniki wskazują, że u pacjentów z trisomią chromosomu 21 (zespół Downa) poziomy SOD1 są podwyższone w różnych typach komórek i narządów, a gen *SOD1* został zidentyfikowany jako zaangażowany w degenerację tkanki nerwowej w pacjentów z zespołem Downa [19]. Co ciekawe, nadekspresja genu *SOD1* może prowadzić do wzrostu poziomu ROS w komórce.  $O_2^{\bullet-}$  może również reagować z tlenkiem azotu (NO) tworząc peroksyazotyn ( $ONOO^{\bullet-}$ ), który blokuje konwersję  $O_2^{\bullet-}$  do  $H_2O_2$ .

$H_2O_2$  może przedostawać się przez błonę do cytoplazmy, a w obecności jonów metali ( $Fe^{2+}$ ) może generować rodnik hydroksylowy ( $\bullet OH$ ).  $H_2O_2$  może również ulegać przekształceniu do  $O_2$  i  $H_2O$  w reakcji katalizowanej przez CAT lub Gpx/GSH [4]. Gpx wykorzystuje GSH, aby umożliwić przemianę  $H_2O_2$  do  $H_2O$ . GSH jest następnie regenerowany przez GR. Przyjmuje się, że GSH jest głównym przeciwutleniaczem dla całej komórki, jednak w mitochondriach występuje w małych ilościach. System Prdx/Trx działa podobnie — Prdx redukuje  $H_2O_2$  do  $O_2$  i wykorzystuje Trx do samoregeneracji [4]. Obecność wolnych rodników w komórce jest naturalnym zjawiskiem związanym z metabolizmem tlenowym. Zarówno spadek, jak i nadmierny wzrost poziomu ROS w komórce jest szkodliwy, ponieważ są one ważnym czynnikiem sygnalizacyjnym. Zbyt niski poziom ROS może hamować proliferację lub różnicowanie komórek, podczas gdy nadmierne ich ilości mogą powodować hiperproliferyzację [20].

Stres oksydacyjny indukuje peroksydację lipidów, w efekcie której powstają reaktywne produkty peroksydacji lipidów, m.in. 4-hydroksy-2-nonanal (4-HNE). 4-HNE jest produkowany głównie w mitochondriach i jest uważany za biomarker stresu oksydacyjnego. Może tworzyć addukty



z DNA, białkami i fosfolipidami błonowymi, zwłaszcza w mitochondriach [21]. Badania pokazują, że takie addukty prowadzą do karcynogenezy, zmniejszonej integralności błony, zmniejszonej aktywności ETC i apoptozy (np. 4-HNE może tworzyć masywne addukty HNE-DNA i/lub wiązać się ze wszystkimi zasadami azotowymi (reaguje z największą wydajnością z G i C). Addukt 4-HNE i G można usunąć z DNA za pomocą BER, NER lub HR [21]. W przypadku nDNA, 4-HNE-dG odgrywa kluczową rolę w śmierci komórek nowotworowych powodując mutację białka p53 [21]. Dokładna rola 4-HNE-dG w mtDNA nie została jeszcze opisana, ale interakcja 4-HNE z makrocząsteczkami mitochondrialnymi jest uważana za potencjalny cel terapii przeciwnowotworowej.

Podobne procesy powstawania i neutralizacji wolnych rodników zachodzą u bakterii tlenowych, gdzie ROS również odgrywają ważną rolę w metabolizmie i powstają w wyniku działania czynników stresowych (np. ekspozycji na antybiotyki) [22]. Komórka *E. coli* zawiera zestaw enzymów wychwytyjących wolne rodniki – trzy rodzaje SOD (Fe-SOD, Mn-SOD, CuZn-SOD), dwa rodzaje CAT oraz reduktazę wodoronadtlenku alkilu (Ahp, która redukuje H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> do H<sub>2</sub>O). Enzymy te regulują wewnątrzkomórkowe stężenia ROS, ale w przypadku dodatkowych, egzogennych czynników stresowych i wyższych poziomów ROS są niewystarczające. Bakterie mają zatem dwa układy neutralizujące egzogeny stres oksydacyjny (OxyR i SoxRS) [23]. ROS powodują poważne konsekwencje dla bakterii. Upośledzają strukturę lipidów, DNA lub białek, co może prowadzić do nagromadzenia ROS i późniejszej śmierci komórki. Wspomniany wcześniej 4-HNE jest mutageny zarówno w komórkach ssaków, jak i bakterii [21]. W warunkach stresu oksydacyjnego poziomy HNE mogą wzrosnąć do 50 μM i tworzyć addukty z DNA [24]. W odpowiedzi na takie uszkodzenie może zostać uruchomiony system SOS, który jest głównym systemem aktywowanym w przypadku działania promieniowania na bakteryjne DNA. W obecności ROS bakterie i mitochondria doznają porównywalnych uszkodzeń i uruchamiane są zbliżone mechanizmy obronne.

Stres oksydacyjny jest powszechnie uznawany za epigenetyczny czynnik starzenia. Antyoksydacyjne mikroskładniki zawarte w żywności odgrywają kluczową rolę w zmniejszaniu odpowiedzi zapalnej w populacji osób starszych [20]. Zdolność enzymatyczna przeciwutleniaczy komórkowych zmniejsza się wraz z wiekiem, dlatego osoby starsze są bardziej podatne na choroby związane z podwyższonym stresem oksydacyjnym w komórkach [25,26]. Co ważne, stosowanie suplementacji związkami o działaniu antyoksydacyjnym musi być dostosowane do wieku, ponieważ przyswajanie i metabolizm przeciwutleniaczy takich jak wit. C lub E zmienia się w różnych okresach życia [27]. Guarnieri i in. wykazali, że spożywanie antyoksydantów zmniejsza poziom uszkodzeń DNA i/lub poprawia efektywność mechanizmów naprawy DNA [28]. Ponadto niedobory tych mikroelementów mogą prowadzić do powstawania uszkodzeń DNA podobnych do tych powstałych w wyniku promieniowania (pęknięcia nici DNA lub chromosomów) [20,29]. Nieenzymatyczne

antyoksydanty wpływają bezpośrednio (wit. C i E) lub pośrednio (selen, cynk) na aktywność systemów obronnych komórki [30–33]. Niewystarczające spożycie witaminy C prowadzi do wzrostu poziomu uszkodzeń oksydacyjnych DNA [34,35]. Witamina C obniża poziom ROS i jednocześnie regeneruje utlenioną formę witaminy E do postaci zredukowanej, która dzięki temu może przyjąć elektron i tym samym hamować peroksydację lipidów. Ponadto, wit. E może neutralizować szkodliwe działanie  $H_2O_2$  na DNA oraz obniżać stres oksydacyjny wynikający z innych mutagennych czynników środowiskowych zawartych np. w dymie tytoniowym. Wit. E jest dobrze znanym zmiataczem ROS, który chroni DNA przed uszkodzeniami wywołanymi promieniowaniem UV [36]. Może zapobiegać powstawaniu pirymidynowych dimerów cyklobutanu w wyniku działania promieniowania UVA (340-400 nm) w komórkach skóry człowieka. Zastosowanie wit. E (0,1 mM) przed lub po napromieniowaniu (dawką w zakresie 5-40 J/cm<sup>2</sup>) skutkuje niższym poziomem utleniania zasad i uszkodzeń DNA. Ponadto badania wykazują, że  $\alpha$ -tokoferol chroni DNA komórek raka wątroby przed zmianami oksydacyjnymi będącymi skutkiem promieniowania jonizującego [37]. Poziom 8-OHdG (8-hydrokso-2'-deoksyguanozyna) wzrasta po napromieniowaniu dawką 5 cGy, jednak efekt ten jest odwracalny dzięki wzbogaceniu środowiska w wit. E, co wskazuje na jej właściwości genoprotekcyjne. Witamina E neutralizuje również nadtlenki, a jej działanie jest synergistyczne z wit. C, selenem i cynkiem. Selen w postaci selenocysteiny (SeCys) jest obecny w centrum aktywnym selenoprotein, w tym GPX, którego główną funkcją jest neutralizacja  $H_2O_2$  i nadtlenków organicznych. Ponadto, selen może hamować tworzenie adduktów DNA m.in. cisplatyny, karboplatyny, polichlorowanego bifenyłu lub 7,12-dimetylobenz[ $\alpha$ ]antracenu i zmniejsza liczbę pęknięć lub utraty chromosomów wynikających z czynników rakotwórczych. Ponadto selen prawdopodobnie wspomaga naprawę oksydacyjnych uszkodzeń DNA [38]. Cynk jest pierwiastkiem kluczowym dla ogólnego dobrostanu organizmu ludzkiego i stabilności jego genomu. Zn odgrywa rolę kofaktora enzymów antyoksydacyjnych (np. Zn/Cu-SOD), które katalizują reakcję przekształcenia  $O_2^{\bullet-}$  do  $H_2O_2$  i  $O_2$ , a także enzymów związanych z naprawą DNA, takich jak glikozylaza 8-oksoguaninowa 1 (OGG1), endonukleaza apurynowa/apirymidynowa (APE1) czy poli[ADP-ryboza] polimeraza 1 (PARP-1) [39–41]. Niedobór Zn zmniejsza aktywność PARP-1, a tym samym skuteczność naprawy DNA [20]. Cynk jest również częścią domeny wiążącej DNA białka supresorowego p53, które jest odpowiedzialne za zatrzymanie cyklu komórkowego. 50% niedobór Zn prowadzi do dysfunkcji p53 uniemożliwiając w ten sposób naprawę DNA przed rozpoczęciem cyklu replikacji i w konsekwencji wpływa na odpowiedź naprawczą DNA [42].

### 3.1.2. Oksydacyjne uszkodzenia DNA

Poprawna sekwencja podjednostek nukleozydowych w łańcuchu DNA ma wpływ na wiele procesów zachodzących w komórce, w tym replikację materiału genetycznego, transkrypcję RNA

i pośrednio na syntezę białek. Uszkodzenie DNA może być spowodowane wieloma czynnikami, w tym procesami metabolicznymi, w których mogą uwalniać się ROS, reaktywne formy azotu, produkty peroksydacji lipidów i inne. Uszkodzenia oksydacyjne DNA generowane są minimum 10 000 razy dziennie w organizmie *Homo sapiens*, a ich poziom jest wyższy w mtDNA niż w nDNA [43]. Przyczyn tego zjawiska można doszukiwać się w m.in. lokalizacji mtDNA w bliskiej odległości wewnętrznej błony mitochondrialnej, gdzie generowana jest duża ilość ROS; braku histonów, które w przypadku nDNA wchodzi w skład chromatyny wraz z białkami niehistonowymi; braku intronów, co powoduje konieczność każdorazowej ekspresji całego genomu; rozdzieleniu łańcucha H w trakcie replikacji, co czyni go bardziej podatnym na działanie czynników mutagennych; niższej niż w jądrze aktywności SOD, która odpowiada za konwersję nadmiaru  $O_2^{\bullet-}$  do  $H_2O_2$  i  $O_2$ .

Do chwili obecnej zidentyfikowano ponad 100 różnych typów uszkodzeń oksydacyjnych [44]. Wśród nich wyróżnia się utlenianie zasad i/lub fragmentów cukrów, pęknięcia pojedynczej/podwójnej nici (*ang. single-/double-strand breaks*, SSB/DSB), miejsca bezzasadowe/apurynowe/apirymidynowe (AP), modyfikacje związane z purynami, pirymidynami, cukrami, mutacje strukturalne zasad, sieciowanie DNA-białko, delecje i/lub translokacje fragmentów chromosomów. Kumulacja takich uszkodzeń może prowadzić do zmian informacji genetycznej, a w konsekwencji do mutagenezy i apoptozy komórek [45]. Modyfikacje zasad azotowych są częściowo pożądane, gdyż wspomagają procesy molekularne zachodzące w komórce. Przykładem może być metylacja cytozyny prowadząca do powstania 5-metylocytozyny, która jest jednym z elementów komórkowej kontroli poziomu ekspresji genów. Jeśli uszkodzenie pojawi się w obszarze odpowiedzialnym za kodowanie genów kluczowych dla poprawnego funkcjonowania komórki (np. genów supresji nowotworowej) wynikająca z niego mutacja może być fatalna w skutkach, np. upośledzić funkcje komórki czy prowadzić do transformacji nowotworowej. Obecnie, również czynniki środowiskowe, w tym zanieczyszczenia żywności, mają ogromny wpływ na poziom uszkodzeń DNA pojawiających się w ludzkich komórkach. Promieniowanie UV (UV-A: 380-320 nm, UV-B: 320-290 nm, UV-C: 290-190 nm), promieniowanie jonizujące (promieniowanie  $X$ ,  $\gamma$ ,  $\beta$ , cząsteczki  $\alpha$ ) oraz genotoksyczne związki chemiczne, takie jak chlorek winylu, nadtlenek wodoru czy wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne (występujące np. w dymie) to tylko niektóre czynniki, które mogą wchodzić w interakcje z elementami ludzkiego organizmu na poziomie molekularnym i w wielu przypadkach prowadzić do poważnych chorób [46]. Uszkodzenia DNA można podzielić na endogenne i egzogenne, które z chemicznego punktu widzenia są identyczne. Uszkodzenia endogenne powodowane m.in. przez wstawienie niewłaściwej zasady podczas replikacji i/lub przez produkty procesów metabolicznych (np. ROS i RNS) obejmują m.in. kompleksy DNA-topoizomeraza, SSB, deaminacje/utlenianie/metylacje zasad i miejsca AP [47].

Uszkodzenia egzogenne są powodowane przez czynniki zewnętrzne, m.in. promieniowanie, wysoką temperaturę, toksyny pochodzenia roślinnego, mutageny aromatyczne czy radio- i chemioterapię.

Uszkodzenia DNA można podzielić na uszkodzenia pojedynczych nukleotydów (np. 7,8-dihydro-8-okso-2'-deoksyguanozyna, 8-oxo-dG), uszkodzenia zaburzające strukturę (np. wiązania krzyżowe między niciami DNA lub w obrębie jednej nici DNA, *ang. intrastrand/interstrand crosslinking*) lub uszkodzenie szkieletu DNA (np. miejsce pozbawione zasady lub pęknięcie obu nici) [9,48–50]. Przyjmuje się, że najczęściej występujące uszkodzenia związane są z modyfikacją struktury zasad azotowych. Powyższe może prowadzić do zaburzenia i/lub wypaczenia geometrii przestrzennej podwójnej helisy DNA [51]. Główne produkty utleniania obecne w komórkowym DNA wymieniono w Tabeli 1.

**Tabela 1.** Rodzaje oksydacyjnych modyfikacji zasad nukleinowych obecnych w komórkowym DNA [48,52]

Zasada	Produkt modyfikacji w DNA
Tymina	5,6-dihydroksy-5,6-dihydrotymina
	5-hydroksy-5-metylohydantoina
	5-hydroksymetylouracyl
	5-formylouracyl
Cytosyna	5-hydroksycytozyna
	5,6-dihydroksy-5,6-dihydrouracyl
	5-hydroksyhydantoina
	1-karbamilo-3,4-dihydroksy-2-oksoimidazolidyna
	5-hydroksymetylocytozyna
	5-formylocytozyna
Guanina	5-karboksycytozyna
	8-hydroksyguanina
	8-okso-7,8-dihydroguanina
	2,6-diamino-4-hydroksy-5-formamidopirymidyna
Adenina	2,2,4-triamino-5(2H)-oksazolone
	8-okso-7,8-dihydroadenina
	4,6-diamino-5-formamidopirymidyna
	Inozyna

Ponadto, można wyróżnić trzy główne typy uszkodzeń DNA: izolowane, tandemowe i zespolone uszkodzenia DNA (*ang. clustered DNA lesions, CDL*) [53]. Uszkodzenia tandemowe występują jako dwa sąsiadujące ze sobą uszkodzone nukleotydy generowane przez pojedyncze zdarzenie rodnikowe, np.  $\cdot\text{OH}$  i utleniacze jednoelektronowe.

Najczęściej utlenianą zasadą jest guanina (G) (powstaje  $10^5$  razy na dobę/na komórkę) ze względu na jej niską energię jonizacji [45]. Najbardziej powszechnym uszkodzeniem guaniny jest mutagenna 7,8-dihydro-8-okso-2'-deoksyguanozyna (8-oxo-dG, której dziennie powstaje do  $10^5$  w ludzkim DNA

na jedną komórkę) i jej forma enolowa 8-hydrokso-2'-deoksyguanozyna (8-OHdG). 8-oxo-dG źle paruje z adeniną (A), co w następnym cyklu replikacyjnym może prowadzić do transwersji G::C→A::T. 8-oxo-dG może być dalej utleniana do postaci 2,6-diamino-4-hydrokso-5-formamidopirymidyny (FapyG) [54]. Ten typ uszkodzenia DNA jest wygodnym wskaźnikiem całkowitej puli uszkodzeń oksydacyjnych DNA, efektywności naprawy i oceny ogólnego poziomu komórkowego stresu oksydacyjnego [45]. Sekwencje bogate w pary GC, np. w miejscach wiązania czynnika transkrypcyjnego czy telomery (TTAGGG), wydają się być najbardziej podatne na uszkodzenia, a obecność 8-oxo-dG może zmienić profil ekspresji powiązanych z nimi genów [55]. 8-oxo-dG jest dobrze opisana i często stosowana w badaniach nad systemami naprawczymi w komórkach ze względu na swoją stabilność chemiczną. Adenina (A) ulega podobnym przemianom, jednak wydajność tworzenia 8-oxo-7,8-dihydroadenina (8-oxo-A) i 4,6-diamino-5-formamidopirymidyny (FapyA) jest mniejsza. 8-oxo-A i FapyA prowadzą do transwersji A::T→G::C. Kolejnym przykładem jest 5',8-cyklo-2'-deoksyadenozyna (cdA) występująca w sekwencji TATA ograniczająca interakcję białek z tą sekwencją, co również prowadzi do zahamowania transkrypcji genów [56]. Glikol tyminowy jest najczęstszą zmianą T, która blokuje aktywność polimerazy podczas replikacji [57]. Inne przykłady uszkodzeń T to 5,6-dihydrotymina (DTH) i 5-hydroksymetyluracyl (5HmU). Podczas gdy DTH nie został opisany jako cytotoksyczny lub mutageny, 5HmU powoduje transycje T::A→G::C. 5HmU powstaje w wyniku utleniania 5-metylocytozyny (5-mC) i może wprowadzać nieprawidłowe wzorce metylacji DNA, co w konsekwencji prowadzi do wyciszenia genów, zaburzenia organizacji chromatyny i nieprawidłowego przebiegu naprawy DNA [17]. Produktami utleniania C są 5-hydrokso-2'-dezoksycytydina, która prowadzi do transycji C::G→T::A oraz 5-metylocytozyna (5-mC), która poza potencjałem tworzenia uszkodzeń DNA, posiada funkcję regulatora genów [44].

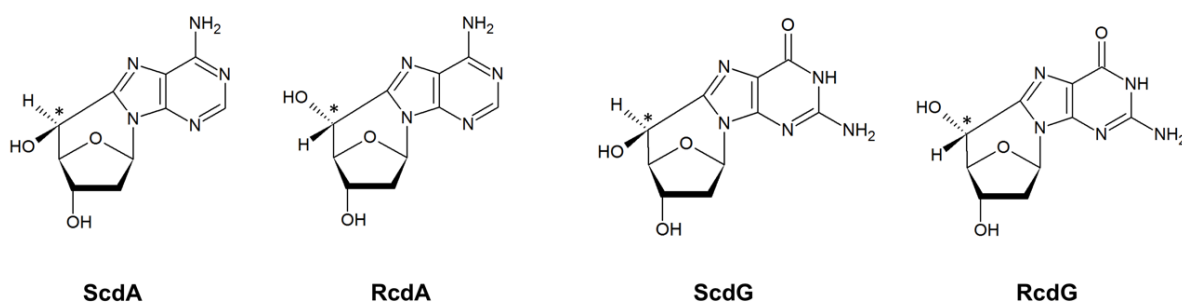
Najczęstsze endogenne uszkodzenia to miejsca SSB i AP (~600 komórka/godz.), 8-oxo-dG (~200 komórka/godz.), glikol tyminowy (~100 komórka/godz.) i produkty deaminacji cytydyny, tj. dU (192 komórka/godz.) [58,59]. Jak wykazali Ward i in., ekspozycja na promieniowanie jonizujące i siarczan bleomycyny może być śmiertelna dla komórek ssaków, tworząc odpowiednio 10<sup>3</sup> i 150 SSB, podczas gdy w wyniku działania H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> wykryto 4·10<sup>5</sup> SSB [60]. Ward i in. zaproponowali, że różnice w śmiertelności komórek zależne są od przestrzennego rozkładu uszkodzeń w duplesie DNA.

### 3.1.3. 5',8-cyklo-2'-deoksypuryny

Do szkodliwych czynników uszkadzających składniki komórkowe należy zaliczyć promieniowanie jonizujące. Wyróżnia się dwa rodzaje promieniowania o różnym zakresie energii: Low-LET (*ang. linear transfer energy*) poniżej 10 keV/mm (promieniowanie X i  $\gamma$ , protony) i High-LET powyżej 10 keV/mm (ciężkie jony, cząsteczki  $\alpha$ ). Przyjmuje się, że w wyniku działania promieniowana High-LET może powstać nawet do 25 skumulowanych uszkodzeń na krótkim fragmencie DNA

(1-2 skręty helisy) [61,62]. Śmiertelna dawka 4 Gy może wygenerować około 5000 pęknięć pojedynczej nici (SSB), 160 pęknięć podwójnej nici DNA (DSB), 600 wiązań crosslinkowych lub ~5000 uszkodzeń zasad DNA [63]. Nawet dawki poniżej 1 Gy mogą generować powyższe ilości uszkodzeń DNA w postaci pojedynczych jak również zespolonych uszkodzeń DNA [64].

5',8-cyklo-2'-deoksypuryny (cdPu) zawierają dwie zmodyfikowane podjednostki (zasadę azotową i resztę cukrową nukleozydu purynowego) w obrębie jednego nukleozydu/nukleotydu wytwarzane w wyniku pojedynczego zdarzenia radiacyjnego [49]. CdPu powstają w wyniku utworzenia wiązania kowalencyjnego między C5' i C8. Powstanie dodatkowego wiązania wynika z oderwania jednego atomu wodoru przez  $\bullet\text{OH}$  z grupy 5'-CH<sub>2</sub>. CdPu zwiększają sztywność struktury DNA w porównaniu z bardziej elastycznymi strukturami takimi jak 8-oxo-dG [65–67]. Dodatkowe wiązanie usztywnia strukturę związku poprzez zahamowanie rotacji wokół wiązania glikozydowego, co w konsekwencji zwiększa sztywność sąsiedniej części DNA i w rezultacie zniekształca strukturę dwuniciowej helisy DNA [68]. Obecność cdPu w dsDNA może prowadzić do zahamowania ekspresji genów lub mutagenyzy transkrypcyjnej [66,69,70], hamować replikację i transkrypcję, ale także znacząco utrudnia procesy naprawy DNA [71]. Ponadto występowanie cdPu może prowadzić do aberracji chromatycznych i omijania takich fragmentów podczas replikacji, co skutkuje delecjami i niestabilnością genetyczną [72]. CdPu występują w dwóch formach diastereoizomerycznych – (5'S) i (5'R) (Rycina 3), które wykazują różne działanie biologiczne [66,73–79].



**Rycina 3. Struktury chemiczne badanych 5',8-cyklo-2'-deoksypuryn.**

(5'S)-5',8-cyklo-2'-deoksyadenozyna (ScdA), (5'R)-5',8-cyklo-2'-deoksyadenozyna (RcdA), (5'S)-5',8-cyklo-2'-deoksyguanozyna (ScdG), and (5'R)-5',8-cyklo-2'-deoksyguanozyna (RcdG).

Częstotliwość powstawania indukowanych promieniowaniem cdPu w DNA ludzkich monocytów analizowano m.in. metodą HPLC-MS/MS. Wyniki wskazały na powstawanie, odpowiednio, 20 cząsteczek cdG (5',8-cyklo-2'-deoksyguanozyna) i 4 cząsteczki cdA (5',8-cyklo-2'-deoksyadenozyna) na 10<sup>9</sup> normalnych nukleozydów na Gy [38]. Inne wyniki wskazują, że na każde 10<sup>6</sup> nukleozydów DNA przypada 0,01 izomeru (5'R) i 0,1 izomeru (5'S) cdA [80]. Trudność jednoznacznego oszacowania ilości

powstających cdPu wynika z faktu, iż wyniki ilościowych pomiarów w dużej mierze zależą od techniki badawczej, dokładnej dawki promieniowania i badanych komórek (m.in. ich rodzaju i wieku), dlatego też wyniki podobnych analiz mogą różnić się nawet w badaniach prowadzonych w tym samym laboratorium [81,82].

Większość badań koncentruje się na wpływie cdPu na szlaki naprawy jądrowej [83–86]. Wyniki pokazują, że zdolność naprawy komórkowej zmienia się w zależności od rodzaju cdPu (tj. cdA/cdG, postaci diastereomerycznej (5'S lub 5'R) oraz odległości między uszkodzeniami w obrębie klastra) [80]. Co ciekawe, diastereoizomer (5'R) jest naprawiany w jądrze komórki wydajniej niż (5'S) zarówno dla cdA, jak i cdG, co wskazuje na znaczenie biologiczne stereochemii cdPu [15]. Ponadto, diastereoizomery cdPu wpływały odmiennie na aktywność białek biorących udział w BER wobec innych uszkodzeń obecnych w obrębie CDL [66,87]. Obecności cdPu wpływa również na obniżoną wydajność procesów naprawy i replikacji *Escherichia coli* ze względu na niezdolność większości polimeraz do ominięcia cdPu [70,78,84]. Ponadto, cdPu może potencjalnie obniżać aktywność enzymów restrykcyjnych, upośledzając w ten sposób zdolność prokariotów do obrony przed obcym materiałem genetycznym np. pochodzenia wirusowego [88]. Ważne jest pełne poznanie i zrozumienie funkcji cdPu, ich znaczenia biologicznego, wpływu na strukturę DNA oraz kluczowe aspekty przeżycia komórki, takie jak naprawa uszkodzonego materiału genetycznego. Istotne jest również sprawdzenie, czy uzyskane obserwacje są potwierdzone niezależnie od wykorzystanego modelu komórkowego.

Badania Brooksa i in. wykazały, że cdPu nie są naprawiane przez BER ze względu na brak w komórce znanych glikozylaz specyficznych dla cdPu [89]. Co ciekawe, nowe doniesienia wykazały, że BER może usuwać ScdA z genomu, ale lokalizacja zmiany jest kluczowa dla prawidłowego działania enzymów [90]. Głównym szlakiem wykorzystywanym przez komórki ssaków do usuwania uszkodzeń tego typu z DNA jest system NER. CdPu są usuwane z DNA odpowiednio 40 i 150 razy wolniej niż addukty cisplatyny [14]. Co ciekawe, diastereoizomery (5'R) cdA i cdG wykazują większe powinowactwo do białek maszynarii NER i są szybciej wycinane z DNA niż diastereoizomery (5'S) [9,16]. Mechanizm naprawy zachodzi dwojako—jako globalna naprawa genomu (*ang. global genome repair*, GGR) i jako naprawa podczas transkrypcji (*ang. transcriptional repair*, TCR) odnosząca się do uszkodzonego DNA, który jest aktywnie transkrybowany. GGR-NER obejmuje liczne białka, np. kompleksy białkowe XPC/HR23B lub XPE/DDR (XP, *Xeroderma pigmentosum*; C, E — grupy komplementacyjne C, E; białko naprawy wycinania UV RAD23). W wyniku działania NER fragment DNA o długości 27–32 nukleotydów zawierający uszkodzenie zostaje wycięty i zrekonstruowany [91]. Problem pojawia się, gdy białka systemu NER są uszkodzone lub nieaktywne. Defekty systemu NER w populacji ludzkiej są związane z mutacjami w genach kodujących enzymy tego systemu naprawczego, co wiąże się ze zwiększonym ryzykiem wystąpienia chorób takie jak *Xeroderma Pigmentosum* (XP),

zespół Cockayne'a (CS) lub trichotiodystrofia (TTD) [92,93]. Problemy zdrowotne pacjentów z XP różnią się stopniem nasilenia i czasem wystąpienia. Główne objawy kliniczne XP to wrażliwość na światło UV, nienormalnie cienka skóra i zwiększone ryzyko raka skóry, zwłaszcza w obszarach narażonych na działanie światła słonecznego. Wśród innych objawów opisano również zaćmę i zmiany neurologiczne [94,95]. U pacjentów z XP defekt w układzie NER prowadzi do akumulacji uszkodzeń DNA, wynikających z nich mutacji, nieprawidłowego funkcjonowania komórek, nasilenia kancerogenezy i przedwczesnej śmierci [93,96]. Obecność mutacji w genach różnych białek szlaku NER determinuje istnienie siedmiu grup komplementarnych, od XPA do XPG. Grupa XPC charakteryzuje się nieprawidłowym funkcjonowaniem GGR-NER. Białko XPC jest głównym białkiem odpowiedzialnym za inicjację GGR-NER – rozpoznaje uszkodzenia DNA, które znacząco zniekształcają helisę DNA [93]. Wyniki przedstawione przez D'Errico i in. wskazują, że obecność XPC może również stymulować naprawę DNA poprzez system BER i działać jako kofaktor w naprawie uszkodzeń oksydacyjnych stymulując aktywność glikozylazy OGG1 [97,98].

CdPu stały się atrakcyjnym celem badań ze względu na ich potencjalne wykorzystanie w diagnostyce nowotworów i ocenie skuteczności leczenia [75]. Masi i in. zaobserwowali podwyższone poziomy cdPu w tkankach pacjentów z nieswoistym zapaleniem jelit, gdzie poziom zmian w tkankach objętych stanem zapalnym był o około 20–40% wyższy niż w tkankach zdrowych. Ponadto autorzy wykazali, że diastereoizomer (5'R) jest prawdopodobnie naprawiany wydajniej niż (5'S) na podstawie niższych poziomów wykrytych w badanych próbkach [99].

### 3.2. Uszkodzenia zespolone DNA

Szczególną grupę stanowią uszkodzenia zespolone DNA (CDL). Definiuje się je jako obecność 2 lub więcej uszkodzeń w obrębie 1-2 skrętów helisy DNA [100]. Obecność CDL w DNA może hamować procesy naprawcze i/lub prowadzić do zwiększenia częstości powstawania DSB [101,102]. Izolowane DSB, badane od ponad 70 lat, są już stosunkowo dobrze poznane. Nie można tego samego powiedzieć jednak o miejscach LMDS (*ang. local multi-damage sites*) lub CDL złożonych z różnych typów uszkodzeń, zwłaszcza w kontekście odpowiedzi komórkowej [9,49,61,103]. Znaczenie CDL dostrzegli Ward i Goodhead i in., podczas gdy Prize i in. zidentyfikowali ich obecność i opisali ich znaczenie w *Escherichia coli* [104–106]. Dodatkowo potwierdzono, że CDL są indukowane w komórkach ssaków [105,107]. CDL składają się w dużej mierze z pojedynczych uszkodzeń DNA, które są rozpoznawane i usuwane przez system BER lub bardziej złożony system NER w określonej kolejności i pojedynczo, aby uniknąć ryzyka błędów, pęknięć obu nici i dalszych mutacji [108–112]. Wykazano, iż obecność skumulowanych w ten sposób uszkodzeń obniża aktywność enzymów systemu BER [113]. Uszkodzenia są naprawiane pojedynczo, głównie przez SP-BER, aby uniknąć ewentualnych błędów



podczas wycinania całego fragmentu nukleotydów. W zależności od rodzaju i umiejscowienia uszkodzenia w obrębie klastra, naprawie może podlegać tylko jedno z nich. Jednoczesne nacięcie nici DNA w przypadku dwóch miejsc AP zlokalizowanych w pozycji +1 jest zahamowane ze względu na duże zmiany konformacyjne potrzebne w APE1 do nacięcia uszkodzonego DNA [85,109,114]. Jednak miejsca AP w pozycji -1 nie wymagają większych zmian w konformacji enzymu, co pozwala na poprawne działanie APE1. Badania wykazują, że w klastrach zawierających ScdA i miejsce AP naprawa jest hamowana dla miejsc AP położonych bliżej niż 8 zasad nukleinowych od ScdA [12]. Co więcej, aktywność enzymów biorących udział w pierwszych dwóch etapach szlaku BER (UDG i APE1) jest zmniejszona dla CDL zawierającego cdA [25]. Obecność dwóch uszkodzeń 8-oxo-dG zlokalizowanych w nici przeciwległej do miejsca AP obniżyła skuteczność naprawy tego ostatniego przez białka obecne w ekstraktach jądrowych [83,115]. Z drugiej strony, miejsca AP są zwykle nacinane wcześniej niż miejsca uszkodzonych zasad azotowych, gdy znajdują się w odległości 5 pz od siebie, a powstały SSB jest naprawiany jako pierwszy [108]. Ponadto, badania wykazały, że obecność cdA wpływa na działanie enzymów restrykcyjnych, białek naprawczych i/lub skuteczność naprawy DNA drugiej zmiany w obrębie CDL [66,86–88,116–120].

Wraz ze wzrostem ilości pojedynczych uszkodzeń skumulowanych na niewielkim fragmencie DNA wzrasta „trudność” ich naprawy. Występowanie cdPu jako części CDL wpływa na strukturę helisy i w konsekwencji na przebieg naprawy DNA towarzyszących uszkodzeń [66,68,74,86,100].

Efektywna naprawa uszkodzeń takich jak miejsca AP w obrębie CDL zawierającego cdPu zależy od wzajemnej odległości i względnego położenia między uszkodzeniami, co wykazano dla białek naprawczych w ekstraktach jądrowych (NE) komórek xrs5, jako dobrze ugruntowanym modelu eksperymentalnym [66,83,84,86,121,122]. Ponadto, zaobserwowano różnice w aktywności BER między diastereoizomerami (5'S) i (5'R) oraz między purynami (cdA i cdG). Inne badania wykazały wzrost aktywności białek odpowiedzialnych za pierwsze etapy naprawy BER (UDG i hAPE1) [119]. Może to wskazywać na istotny wpływ cdPu na rozpoznawanie złożonych uszkodzeń DNA przez enzymy szlaku BER. Przedstawione wyniki wskazują, że cdG zwiększała aktywność badanych enzymów, zaś dla cdA aktywność enzymatyczna była różna w zależności od wzajemnego rozmieszczenia uszkodzeń w obrębie CDL, przy czym odległość pięciu par zasad pomiędzy uszkodzeniami zapewniała efektywne działanie enzymów. Jednocześnie zmiany w strukturze DNA wywołane przez cdPu mogą wpływać na szybszą rekrutację białek do miejsca uszkodzenia, jego rozpoznawanie i sprawniejszą naprawę [123].

Uwzględniając powyższe, przedmiotem niniejszej rozprawy doktorskiej stały się 5',8-cyklo-2'-deoksy puryny obecne w obrębie uszkodzeń zespolonych DNA w genomie mitochondrialnym, który przez wzgląd na bliskość łańcucha oddechowego jest szczególnie narażony na działanie ROS

i powstawanie uszkodzeń oksydacyjnych takich jak dU i miejsca AP, za naprawę których odpowiada głównie system naprawy uszkodzeń przez wycięcie zasady BER.

### 3.3. Systemy naprawy uszkodzeń DNA

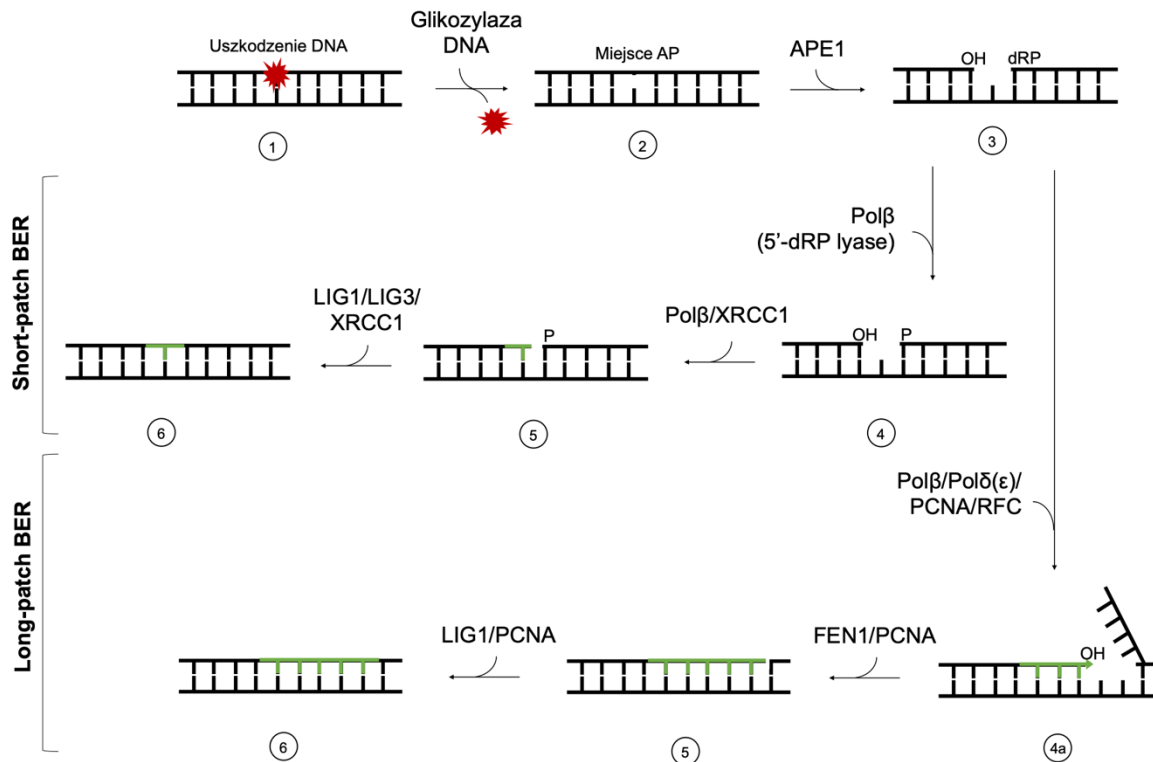
Każda żywa komórka jest stale narażona na wiele czynników, zarówno wewnętrznych, jak i zewnętrznych, które wchodzą w interakcje z jej materiałem genetycznym. Produkty metabolizmu komórkowego, ROS, czynniki środowiskowe, zanieczyszczenia żywności, promieniowanie jonizujące i chemioterapeutyki mogą powodować uszkodzenia DNA ( $2-7 \cdot 10^4$  zmian tworzących się dziennie/na komórkę ludzką) [124]. Uszkodzenia niewykryte i/lub nienaprawione przez komórkową maszynę naprawczą mogą blokować transkrypcję genów, zaburzać translację i prowadzić do mutacji co może skutkować przekazaniem powstałych zmian kolejnym pokoleniom w trakcie podziału komórkowego. Aby temu zapobiec komórka posiada wyspecjalizowane systemy naprawy DNA, które muszą być stale aktywne, wykrywać i niwelować skutki uszkodzeń. Komórki eukariotyczne wykształciły system zapewniający integralność genomu, zwany szlakiem odpowiedzi na uszkodzenia DNA (*ang. DNA damage response*, DDR). Podczas DDR progresja cyklu komórkowego zostaje zablokowana i aktywowane zostają mechanizmy naprawy DNA specyficzne dla rodzaju wykrytego uszkodzenia. Wyróżnia się sześć głównych mechanizmów naprawy DNA. Bezpośrednia naprawa (*ang. direct repair*, DR) uszkodzeń zachodzi dzięki działaniu specyficznych enzymów, które nie wymagają matrycy w postaci komplementarnej nici DNA. Przykładem są fotolizy, które rozdzielają powstałe dimery pirymidynowe [125], alkilacja zasad azotowych odwracana przez alkilotransferazy oraz pęknięcia pojedynczych nici (bez zmian na końcach nici), które naprawiane są przez bezpośrednie działanie ligaz. Pozostałe procesy naprawcze pociągają za sobą wycięcie uszkodzonego i wstawienie nowego fragmentu łańcucha DNA. System NER (*ang. nucleotide excision repair*) zdolny jest do usuwania dużych uszkodzeń zaburzających strukturę helisy np. cdPu i adduktów ksenobiotyk-DNA [126]. Aktywność systemu NER nie została jednak do tej pory zidentyfikowana w mitochondriach [127]. Mechanizm naprawy źle sparowanych zasad azotowych (*ang. mismatch repair*, MMR) koryguje błędy polimerazy powstałe podczas replikacji DNA i na podstawie komplementarnej nici wstawia poprawny nukleozyd [128]. Najpoważniejsze uszkodzenia DNA w postaci pęknięć obu nici DNA oraz „crosslinków” są naprawiane poprzez łączenie niehomologicznych końców DNA (*ang. non-homologous end joining*, NHEJ) lub rekombinację homologiczną (*ang. homology recombination repair*, HR), która jest niezbędna do naprawy mtDNA w roślinach i drożdżach, ale nie potwierdzono jej działania w ludzkich mitochondriach [129]. Mechanizmy te są dobrze poznane w przypadku zmian izolowanych, natomiast naprawa CDL wymaga dalszych badań [123]. System BER koryguje głównie uszkodzenia oksydacyjne pojedynczych nukleotydów (np. depurynacja, deaminacja cytozyny, oksydacja guaniny) poprzez wycięcie uszkodzonej zasady [130]. Podczas gdy NER usuwa duże uszkodzenia DNA (w tym cdPu),



wiązania fosfodiesterowego przez endonukleazę FEN1 – usunięcie starego fragmentu DNA zawierającego miejsce AP. (6) SP-BER i LP-BER: połączenie nowego fragmentu nici DNA ze starym przez ligazę.

Jest to wieloetapowy proces obejmujący rozpoznanie uszkodzenia, wycięcie zmiany (tworzenie miejsca AP), kolejne nacięcie nici (tworzenie luki), wbudowanie nieuszkodzonego nukleotydu (wypełnienie luki) i ponowne połączenie nici (Rycina 4) [133].

System BER opiera się na identyfikacji i wycięciu zmodyfikowanej zasady azotowej oraz wstawieniu w jej miejsce poprawnej zasady. Do miejsca uszkodzenia rekrutowane są specyficzne białka naprawcze mające na celu związanie się z uszkodzonym miejscem DNA. Kompleksy enzymatyczne składają się z różnych białek w zależności od typu komórki, rodzaju uszkodzenia i fazy cyklu komórkowego. Poprawny przebieg procesu BER zapewnia szereg enzymów naprawczych. Glikozylazy DNA znajdują uszkodzone miejsce i rozszczepiają wiązanie  $\beta$ -N-glikozydowe pomiędzy zasadą a dezoksyrybozą. Tworzy to miejsce AP rozpoznawane przez endonukleazę AP [134]. Znane są różne glikozylazy, z podziałem na glikozylazy monofunkcyjne hydrolizujące wiązania  $\beta$ -N-glikozydowe oraz  $\beta,\gamma$ -glikozylazy dwufunkcyjne, które dodatkowo mogą usuwać miejsca AP (na drodze  $\beta$ -eliminacji), co skutkuje luką w nici DNA długości jednego nukleotydu (utworzenie SSB). Przykładem glikozylaz monofunkcyjnych może być uracylowa glikozylaza DNA (ang. *uracil DNA glycosylase*, UDG), która odnajduje i wycina 2'-deoksyurydyne z jedno- lub dwuniciowej cząsteczki DNA. Endonukleaza AP hydrolizuje wiązanie fosfodiesterowe w kierunku 5' od miejsca AP, a tym samym rozcina nić DNA. Utworzony w ten sposób wolny koniec 3'-OH pozwala polimerazie  $\beta$  (Pol $\beta$ ) na dobudowanie brakującego nukleotydu. Ostatecznie, powstałe fragmenty łańcucha są łączone dzięki działaniu ligazy [51,131,132,134]. W przypadku SP-BER zastępowany jest pojedynczy nukleotyd, zaś w przypadku LP-BER zastępowany jest dłuższy fragment nici od 2 do 12 zasad. Przed ligacją konieczny jest dodatkowy krok – „odcięcie” fragmentu „starej nici” przez endonukleazę FEN1. Tym sposobem następuje „wymiana” fragmentu łańcucha DNA na nowy, a uszkodzenie zostaje naprawione (Rycina 5). System BER ma za zadanie ochronę genomu przed uszkodzeniami. Z drugiej strony błędy mogą również wystąpić w wyniku nieprawidłowego działania polimerazy podczas szlaku BER. Polimeraza może błędnie sparować zasadę naprzeciwko pierwotnego miejsca uszkodzenia, co często pozostaje niewykryte i skutkuje mutacjami [135]. Zdarza się to średnio  $3 \cdot 10^{-4}$  razu na parę zasad w trakcie jednej rundy replikacji [51].



**Rycina 5. Schemat naprawy SP-BER i LP-BER.**

Główne etapy naprawy to (1) rozpoznanie uszkodzenia przez glikozylazy DNA, (2) wycięcie uszkodzonej zasady i utworzenie miejsca AP, (3) nacięcie nici, (4) enzymatyczne trawienie końców nici, (4a) enzymatyczne trawienie końców i przemieszczenie nici, (5) synteza DNA (wypełnianie luk) i (6) ligacja.

### 3.3.2. Mitochondrialny system naprawy DNA poprzez wycięcie zasady

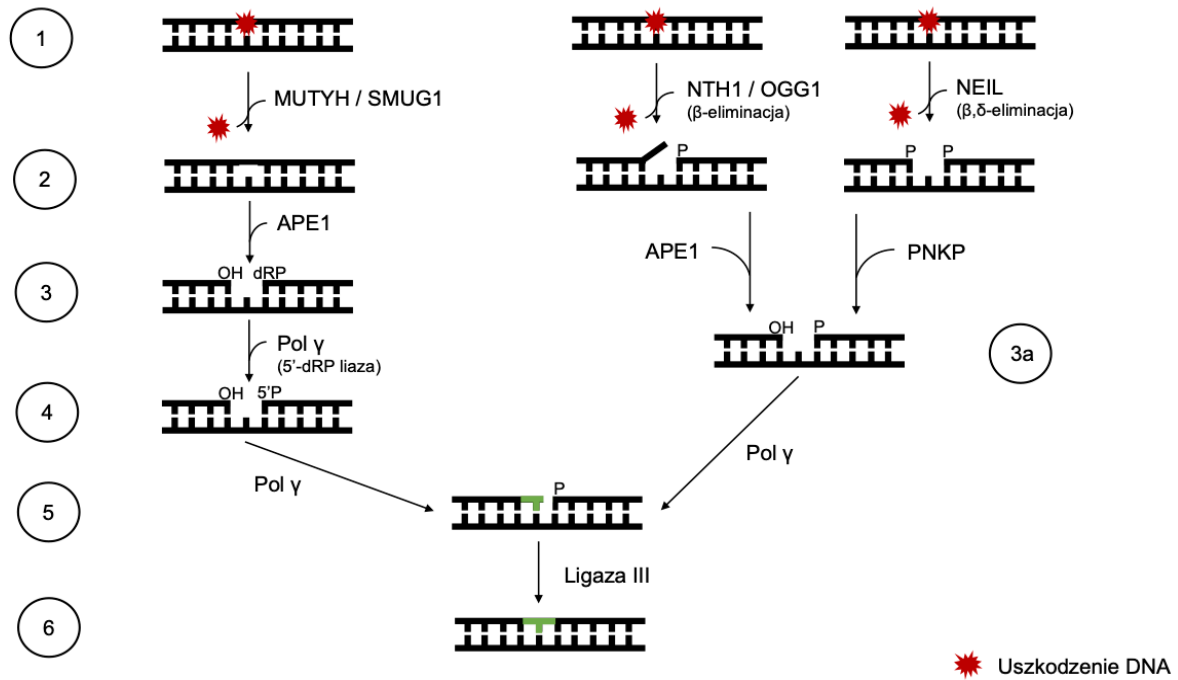
W mtDNA udowodniono działanie jedynie kilku ze znanych systemów naprawczych [127,133,136–138]: bezpośrednia rewersja uszkodzeń (DR), naprawa błędnego sparowania zasad (MMR), naprawa pęknięć dwuniciowych przez rekombinację homologiczną (ang. *homology recombination repair*, HRR), naprawę pęknięcia pojedynczej nici (ang. *single-strand break repair*, SSBR); łączenie końców za pośrednictwem mikrohomologii (ang. *microhomology-mediated end joining*, MMEJ) [127,139]; tolerancja uszkodzeń poprzez syntezę DNA na podstawie uszkodzonej nici (ang. *translesion synthesis*, TLS) oraz system naprawy poprzez wycięcie zasady BER [140]. System BER został dobrze opisany w ciągu ostatnich kilku dekad. Jest to wysoce konserwatywny system naprawczy [127]. Chociaż mtBER jest najlepiej scharakteryzowanym z systemów naprawczych w mitochondriach, wiele pytań w dalszym ciągu pozostaje bez odpowiedzi. Warto zauważyć, że proces naprawy mtDNA jest wolniejszy niż nDNA i wszelkie defekty w jego działaniu mogą spowodować poważne konsekwencje dla całej komórki [43]. Co ciekawe, bakteryjny system BER odpowiada mitochondrialnemu mimo różnic w jego przebiegu w zależności od gatunku bakterii i środowiska, w którym żyje bakteria [141]. Ten system naprawczy ma kluczowe znaczenie dla utrzymania stabilności genetycznej, zwłaszcza w kontekście uszkodzeń oksydacyjnych. Enzymy odpowiedzialne za naprawę DNA w mitochondriach

i bakteriach wykazują wspólne cechy i funkcje [142]. Co więcej, bakterie są ewolucyjnie starsze niż mitochondria, a większość bakteryjnych białek biorących udział w szlaku BER posiada homologi w ludzkich mitochondriach.

Glikozylazy mitochondrialne są kodowane przez nDNA, a te z nich zawierające sygnał kierowania do mitochondriów (*ang. mitochondria targeting signal, MTS*) są translokowane do mitochondriów [132,143]. Co ciekawe, niektóre badania pokazują, że białka naprawcze są importowane do mitochondriów tylko w odpowiedzi na sygnały stresowe [130]. Przykładami mitochondrialnych monofunkcyjnych enzymów są glikozylaza uracylowego DNA (UDG), która znajduje i wycina uracyl (U) z cząsteczki jedno- lub dwuniciowego DNA (ssDNA lub dsDNA) oraz glikozylaza MUTYH, która usuwa niepoprawnie sparowane z 8-oxo-dG reszty adeniny. UDG to jednofunkcyjna glikozylaza szeroko stosowana jako enzym modelowy do badań systemów naprawczych DNA [144–146]. Hydrolizuje wiązanie N-glikozydowe między dezoksyrybozą a zasadą, uwalniając w ten sposób zasadę z DNA [51,143]. Endonukleaza AP (APE1) hydrolizuje wiązanie fosfodiesterowe 5' od miejsca AP na drodze hydrolizy nici DNA generując SSB z fosforanowymi końcami 3'-hydroksylu i 5'-dezoksyrybozy [147]. Dwufunkcyjne glikozylazy, takie jak endonukleaza III homolog 1 (NTH1), przeprowadzają oba etapy – rozpoznanie i usunięcie zmiany oraz rozszczepienie miejsca AP. Jednak do prawidłowego przetworzenia końców nici potrzebne są również APE1 i kinaza polinukleotydowa 3'-fosfataza (PNKP). Powstały w ten sposób wolny koniec 3'-OH umożliwia polimerazie DNA  $\gamma$  (Pol $\gamma$ ) dobudowanie do nici brakującego nukleotydu. Pol $\gamma$  jest nadal powszechnie uznawana za jedyną (z 17) ssaczą polimerazę działającą w mitochondriach [148,149]. Przebieg procesu naprawczy BER jest zbliżony w mitochondriach i w jądrze komórki (Rycina 6).

W przypadku SP-BER wstawiany jest pojedynczy nukleotyd, natomiast w przypadku LP-BER wstawiany jest dłuższy fragment. Przed ligacją nici fragment ten jest odcinany przez specyficzną endonukleazę 1 (FEN1) przy pomocy egzo/endonukleazy G (EXO1) [130]. Badania ostatnich lat ujawniły alternatywny szlak dla LP-BER. Nie obejmuje działania FEN1, a zamiast tego wykorzystuje helikazę/nukleazę replikacji DNA 2 (DNA2). DNA2 może stymulować Pol $\gamma$  samodzielnie lub w koordynacji z FEN1 [150,151]. Ostatecznie fragment łańcucha DNA pierwotnie zawierający uszkodzenie zostaje „zastąpiony” nowym. Ostatnim etapem mechanizmu BER jest połączenie nowego fragmentu ze „starą” nicią poprzez działanie ligazy [130]. Początkowo sądzono, że w mitochondriach występuje tylko wariant SP-BER, jednak nowsze badania potwierdziły działanie LP-BER m.in. na podstawie usuwania 2-dezoksyrybolaktenu (dL), który wiąże się kowalencyjnie z Pol $\gamma$  i blokuje szlak SP-BER. Eksperymenty z wykorzystaniem dL wykazały, iż jest on usuwany z mtDNA przez endonukleazę FEN1, która jest kluczowym elementem szlaku LP-BER [150]. Mechanizm LP-BER

pozwala na naprawę bardziej złożonych uszkodzeń, takich jak uszkodzenia tandemowe i/lub uszkodzenia zespolone [49].



**Rycina 6. System naprawy SP-BER w mitochondriach.**

(1) Pierwszym krokiem jest działanie glikozylaz DNA. W zależności od rodzaju uszkodzenia do miejsca uszkodzenia rekrutowane są różne glikozylazy: monofunkcyjne – MUTYH, SMUG1 lub dwufunkcyjne – NTH1, OGG1, NEIL. Glikozylaza DNA rozszczepia wiązanie  $\beta$ -N-glikozydowe i uwalnia uszkodzoną zasadę. (2) W przypadku glikozylaz jednofunkcyjnych powstaje miejsce AP. Dwufunkcyjne glikozylazy mają aktywność endonukleazy AP—tworzą lukę w nici bez udziału endonukleazy AP. (3) Miejsce AP jest nacinane przez endonukleazę AP (APE1). (3a) Miejsce AP jest przetwarzane przez APE1 lub PNKP. (4) Polimeraza DNA  $\gamma$  (Pol $\gamma$ ) przetwarza 5'-koniec nici. (5) Luka w nici jest wypełniona prawidłowym nukleotydem przez Pol $\gamma$ . (6) Nici jest ligowana przez ligazę DNA III [43].

Ze względu na swoje zaangażowanie w najbardziej podstawowe funkcje mitochondriów, mtDNA dostarcza wielu informacji o warunkach stresowych oddziałujących na komórki. Ponadto, biorąc pod uwagę, że mitochondria są odpowiedzialne za oddychanie komórkowe, każde uszkodzenie mtDNA lub innych elementów mitochondrialnych może spowodować długotrwałe uszkodzenia wielonarządowe, a tym samym prowadzić do zwiększonego ryzyka śmiertelności [152]. Wiedza w zakresie działania systemów naprawczych DNA stale się zwiększa. Chociaż coraz więcej elementów mechanizmu BER jest dobrze opisanych, procesy te kryją w dalszym ciągu wiele tajemnic. Pomimo znajomości struktury prawie wszystkich elementów systemu BER, sposób ich interakcji i działania w dalszym ciągu nie został w pełni poznany.

### 3.4. Mitochondria – wstęp

Mitochondria to organelle pochodzenia bakteryjnego obecne we wszystkich komórkach eukariotycznych [142]. Komórki eukariotyczne posiadają od kilku do kilkunastu tysięcy mitochondriów, które stanowią nawet 12% ich objętości [140]. Obecne w cytoplazmie niemal każdej komórki wytwarzają energię ze składników odżywczych, łącząc utlenianie pirogronianu i kwasów tłuszczowych z łańcuchem transportu elektronów w ramach procesów oddychania komórkowego zapewniającego energię w postaci ATP dla całej komórki. Mitochondria to wszechstronne organelle – oprócz utrzymywania komórki przy życiu poprzez dostarczanie energii, regulują reakcje redoks [53], biorą udział w szlakach sygnałowych związanych z apoptozą [153], regulują wrodzone reakcje immunologiczne [154], utrzymują homeostazę gospodarki wapnia [155] i syntezę klastrow żelazowo-siarkowych [156,157].

Mitochondria zawierają DNA występujące w postaci kolistej cząsteczki o masie cząsteczkowej  $10^7$  Da, która składa się z 16569 par zasad [43]. Jedna ludzka komórka zawiera od kilku do kilku tysięcy cząsteczek mtDNA. Liczba kopii mtDNA przypadająca na komórkę zależy od typu komórki w organizmie człowieka. Komórki energochłonne, takie jak mięsień sercowy, mają 4000–6000 kopii mtDNA na komórkę, podczas gdy komórki nerki, wątroby lub płuc mają mniej – 500–2000 kopii na komórkę. Informacje kodowane przez mtDNA odgrywają istotną rolę w biogenezie mitochondriów, utrzymaniu metabolizmu komórkowego i homeostazie energii komórkowej, gdyż mtDNA koduje białka niezbędne do produkcji energii [158]. Wszystkie 13 białek mitochondrialnych bierze udział w wytwarzaniu ATP w procesie fosforylacji oksydacyjnej (*ang. oxidative phosphorylation, OXPHOS*). Białka te są podjednostkami błonowymi łańcucha oddechowego: 7 z 45 podjednostek kompleksu I (NADH: oksydoreduktaza ubichinonu), 1 z 11 podjednostek kompleksu III (ubichinol: oksydoreduktaza cytochromu C), 3 z 14 podjednostek kompleksu IV (cytochrom C oksydaza) i 2 z 16 podjednostek kompleksu V (syntaza ATP) [159,160]. Większa część proteomu mitochondrialnego jest kodowana w jądrze komórki, ulega translacji do cytozolu i następnie jest transportowana do mitochondriów [161]. Ponadto, stres oksydacyjny może hamować funkcjonowanie rybosomów w cytozolu wpływając na ogólną biosyntezę białek [162]. Przyczyny kodowania podjednostek OXPHOS u ludzi przez mtDNA pozostają niejasne [43,154,158,163]. Istnieją jednak dwie hipotezy przedstawiające potencjalne przyczyny tego zjawiska. Jedna z nich mówi, że aby skutecznie regulować ETC, niektóre geny muszą ulegać ekspresji „na miejscu”. W przypadku zmian stanu redoks konieczna jest natychmiastowa regulacja kompleksów OXPHOS. Dlatego, gdy mtDNA jest obecny „na miejscu”, mitochondria mogą szybko regulować ekspresję białek, aby zapobiec nieprawidłowemu działaniu ETC, nadmiernej produkcji ROS i późniejszemu uszkodzeniu komórki [164]. Druga hipoteza podkreśla fakt, że większość białek kodowanych przez mtDNA to duże i hydrofobowe cząsteczki, których transport



przez błonę mitochondrialną byłyby utrudnione i najprawdopodobniej byłyby kierowane do retikulum endoplazmatycznego zamiast do mitochondriów [165]. Warto wspomnieć, że obie teorie nie wykluczają się wzajemnie, jednak dalsze badania w tym zakresie są konieczne, aby w pełni zrozumieć powody, dla których mitochondria potrzebują swojego materiału genetycznego [163].

Kluczowa rola mitochondriów w produkcji energii stanowi jednocześnie zagrożenie w kontekście powstawania uszkodzeń mtDNA. W szlaku OXPHOS wytwarzana jest znaczna ilość ROS o wysokim potencjale utleniającym. Intensywne procesy oksydacyjne są przyczyną licznych uszkodzeń mitochondrialnego materiału genetycznego, który ze względu na swoje położenie jest na nie szczególnie narażony, dlatego tempo mutagenezy w mtDNA może być nawet 10-20-krotnie wyższe niż w nDNA [43,127]. MtDNA wydaje się podatne na działanie wolnych rodników również ze względu na brak struktury chromatyny (ochrona histonów). Należy tu jednak wspomnieć o mitochondrialnym czynniku transkrypcyjnym A (TFAM) jako o białku zdolnym do upakowania mtDNA w nukleoid [163]. Nukleoid przypomina zwartą strukturę chromatyny, stąd zakłada się, że mtDNA jest osłonięte przed działaniem ROS przynajmniej do momentu rozluźnienia struktury przed replikacją lub transkrypcją. TFAM działa również w koordynacji z POLRMT podczas transkrypcji, aby ominąć uszkodzenia oksydacyjne (np. 8-oxo-dG), które w przeciwnym razie zahamowałyby proces [166]. Uważa się również, że TFAM jest powiązany z działaniem mtBER, co wydaje się prawdopodobne ze względu na bliskość IMM i upakowanie mtDNA w nukleoidzie [167]. Badania pokazują, że TFAM wiąże się również z DNA zawierającym 8-oxo-dG i hamuje działanie BER w mtDNA. Przepuszczalnie jest to niezbędny krok, aby zakres uszkodzeń w mitochondriach został „oszacowany” i nastąpił import odpowiednich białek naprawczych z cytozolu [130]. Nukleoidy znajdują się w macierzy mitochondrialnej w pobliżu wewnętrznej błony mitochondrialnej (*ang. inner mitochondrial membrane*, IMM). Wang i in. wykazali, iż niektóre białka osadzone w IMM (np. translokator nukleotydów adeninowych (ANT) i białka z I kompleksu ETC) są identyfikowane w nukleoidzie, co wskazuje, że struktury nukleoidów przylegają do IMM [168]. Do chwili obecnej zidentyfikowano około 20 białek obecnych w nukleoidach mitochondrialnych, w tym białka biorące udział w replikacji (np. mitochondrialna polimeraza DNA  $\gamma$  (Pol $\gamma$ ), replikacyjna helikaza DNA (Twinkle), mitochondrialne białko wiążące ssDNA (mtSSB)), transkrypcji (np. TFAM, polimeraza RNA zależna od DNA (POLRMT), mitochondrialny czynnik transkrypcyjny B2 (TFB2M), mitochondrialny czynnik wydłużania transkrypcji (TEFM)) i innych procesach (np. helikazy RNA, białka przetwarzające RNA, białka rybosomalne, białka opiekuńcze) [168,169]. Uważa się, że Pol $\gamma$  jest jedyną polimerazą w mitochondriach biorącą udział w procesie replikacji, który wskazywany jest jako jedno z głównych źródeł mutacji genomu mitochondrialnego (błędy występujące podczas replikacji mtDNA) [170].

Jednak Gustafsson i in. opisują Polγ jako polimerazę dokładną ( $<10^{-6}$  błędów na nukleotyd), co eliminuje Polγ jako główne źródło mutacji i zaprzecza wcześniejszym doniesieniom [163].

Mutacje genów mitochondrialnych muszą wystąpić dla co najmniej 60% kopii mtDNA, aby pojawiły się objawy kliniczne, przy czym już wcześniej mogą upośledzać produkcję energii i zdrowie całego organizmu [171]. DNA mitochondrialny jest narażony głównie na uszkodzenia oksydacyjne [124]. W mitochondriach w ciągu każdej minuty powstają 2-3 miliony nadtlenków w przeliczeniu na miligram białka [172]. Uszkodzenia powstałe w wyniku ich działania mogą przyczynić się do zmniejszenia sprawności energetycznej komórki. Z powodu mniejszej wydolności mitochondriów nastąpić może deficyt energetyczny, co obniża aktywność komórki i utrudnia jej adaptację w warunkach stresowych. Kumulacja oksydacyjnych uszkodzeń mtDNA może prowadzić do zmian w kodowanych białkach i tym samym do stanów patologicznych takich jak nowotwory, choroby neurodegeneracyjne, choroby układu krążenia, przyspieszone procesy starzenia się organizmu oraz przyczynić się do wystąpienia chorób mitochondrialnych, które stanowią dużą grupę zaburzeń genetycznych [173,174]. Dlatego też niezmiernie istotne jest poprawne i wydajne funkcjonowanie systemów naprawczych w mitochondriach, a w szczególności naprawy uszkodzeń oksydacyjnych przez system BER. Szczegółowe zrozumienie genetyki mitochondriów i mechanizmów naprawczych jest niezbędne do opracowania nowych terapii.

### 3.5. Choroby mitochondrialne

Mutacje pojawiające się w genach mitochondrialnych i/lub genach jądrowych kodujących białka mitochondrialne mają swój udział w rozwoju stanów patologicznych związanych z chorobami mitochondrialnymi [173,175], chorobą metaboliczną (jeśli enzymy naprawcze systemu BER są nieaktywne, może to zwiększać ryzyko otyłości i insulinooporności [43]), nowotworami, chorobami neurodegeneracyjnymi oraz przyspieszeniem procesu starzenia komórkowego [137], dlatego też są przedmiotem licznych badań [43,176,177]. Starzenie się i choroby związane z wiekiem również korelują ze wzrostem poziomu uszkodzeń mtDNA [178]. W ostatnich latach szczególne zainteresowanie budzi związek defektów systemu BER z chorobami neurodegeneracyjnymi. Dotychczasowe badania wskazują na związek między wyższym poziomem uszkodzeń DNA (np. wynikającym z nieaktywnego w wyniku mutacji białka OGG1) z chorobą Alzheimera [179] oraz między mutacjami w genach kodujących podjednostki kompleksu I ETC i chorobą Parkinsona [180–182]. Co ciekawe, ogólny stan mitochondriów może wskazywać na aktywną infekcję SARS-CoV-2 [183]. Stwierdzono, że u pacjentów z Covid-19 zaobserwowano degradację i utratę funkcji mitochondriów podobną do obserwowanej w trakcie starzenia organizmu. Ponadto podczas infekcji Covid-19 obserwowano gromadzenie się w komórce zwiększonej liczby uszkodzonych mitochondriów, co prowadziło do wyższego wskaźnika stanu zapalnego [183].

Choroby pochodzenia mitochondrialnego dotyczą około 1 osoby na 5000 i w dalszym ciągu stanowią wyzwanie terapeutyczne [43]. Upośledzają najbardziej energochłonne tkanki, takie jak serce, mięśnie, mózg, oczy, co objawia się neuropatiami, miopatiami, ślepotą, utratą słuchu, chorobami nerek czy wątroby [43]. Przykładem jest ataksja Friedreicha, która prowadzi do zwyrodnienia mięśnia sercowego i części układu nerwowego. Jej przyczyną jest mutacja w intronie genu *FXN* (znajdującym się na chromosomie 9) kodującym białko mitochondrialne – frataksynę, biorącą udział w metabolizmie żelaza. W przypadku wystąpienia mutacji transkrypcja tego genu jest zahamowana, co prowadzi do kumulacji żelaza w mitochondriach, zwiększonej generacji ROS i tym samym wyższego poziomu stresu oksydacyjnego. Przykładami chorób mitochondrialnych są dziedziczna neuropatia nerwu wzrokowego Lebera (*ang. Leber's hereditary optic neuropathy, LHON*), padaczka miokloniczna z nieprawidłowymi czerwonymi włóknami mięśniowymi (*ang. myoclonic epilepsy with ragged red fibers, MERRF*), neurogenna miopatia z ataksją i zwyrodnieniem barwnikowym siatkówki (*ang. neurogenetic myopathy, ataxia, retinitis pigmentosa, NARP*), zespół Leigha – encefalopatia mitochondrialna z kwasicą mleczanową (*ang. subacute necrotizing encephalomyelopathy, SNEM*) [184]. Pierwsza z chorób wywołana jest tranzycją w jednym z genów mtDNA (*ND1, ND4, ND6*) a w efekcie następuje inhibicja kompleksu I ATPazy. Mutacja prowadzi do dziedzicznej neuropatii nerwu wzrokowego LHON, która objawia się zanikiem nerwów wzrokowych i zwyrodnienia komórek siatkówki. U podstaw genetycznych zespołu MERRF leży mutacja A do G nukleotydu 8344, która jest przyczyną zahamowania transkrypcji genów kodujących enzymy kompleksu łańcucha oddechowego – reduktazy NADH-CoQ i oksydazy cytochromowej. Charakterystyczne objawy MERRF to postępująca padaczka miokloniczna, niskorosłość i zlepki mitochondriów widoczne podczas analizy jako tzw. czerwone poszarpane włókna. Zespół NARP jest rzadką chorobą mitochondrialną wywołaną przez punktową mutację w genie kodującym 6 podjednostkę mitochondrialnej syntazy ATP. Objawy choroby to m.in. napady drgawek, ośpienie, ataksja mózdkowa, neuropatia czuciowa czy też dysfunkcja pnia mózgu. SNEM może być wywołany mutacjami w nDNA, które wpływają na pracę mitochondriów. Choroba występuje w wielu postaciach w zależności od genu, który ulegnie mutacji. Mogą to być geny kodujące białka łańcucha oddechowego (*ND2, ND6, COX10, ATP6*) lub geny kodujące tRNA. Choroba rozwija się gwałtownie i obejmuje układ nerwowy, mięśniowy, a także wątrobę i nerki. NARP i zespół Leigha dotyczą częściowo tej samej mutacji w podjednostce syntazy ATP. Gdy mutacja występuje z częstotliwością <75% obserwuje się NARP. Gdy ta sama mutacja występuje w ponad 95% kopiach genu częściej prowadzi do rozwoju zespołu Leigha [185,186].

Mitochondria mogą zawierać zarówno zmutowane, jak i niezmutowane cząsteczki DNA (heteroplazmia), co może mieć daleko idący wpływ na funkcje komórkowe [43]. Konkretny objawy choroby i ich nasilenie w dużym stopniu zależą od stosunku uszkodzonych do nieuszkodzonych

cząsteczek mtDNA wewnątrz każdego mitochondrium. Ponadto próg heteroplazmii mtDNA różni się w zależności od rodzaju mutacji i rodzaju tkanki, która bierze udział w procesie patologicznym [43]. W rezultacie u pacjenta mogą występować niektóre tkanki z prawidłowym, a niektóre ze zmutowanym mtDNA. Powoduje to zmienne objawy i przebieg choroby, co utrudnia diagnozę [187]. Choroby dziedziczne diagnozuje się głównie na podstawie wywiadu rodzinnego ze względu na brak technik diagnostycznych, które byłyby w stanie poradzić sobie z tak wieloma zmiennymi w kontekście mutacji mtDNA. Pojawiają się nowe techniki np. sekwencjonowanie nowej generacji lub CRISPR/Cas9, które są obiecujące w kontekście badań nad chorobami mitochondrialnymi [188]. Choroby mitochondrialne są często związane z defektami syntezy ATP, dlatego częstymi objawami są osłabienie mięśni, defekty poznawcze i zwyrodnienie mózgu. Przykłady chorób związanych z dysfunkcjami mitochondrialnych mechanizmów naprawczych i procesów biochemicznych przedstawiono w Publikacji I.

Mutacje mtDNA prowadzące do upośledzenia przebiegu oddychania komórkowego przyczyniają się do propagacji fenotypu nowotworowego. Liczba kopii mtDNA została skorelowana z różnymi typami nowotworów – spadek ilości kopii mtDNA odnotowano w przypadku raka piersi, wątroby, płuc i nerek, podczas gdy w raku prostaty i głowy i szyi obserwuje się nadmierną liczbę kopii mtDNA [189–191]. Jednocześnie mitochondria komórek nowotworowych uważane są za potencjalne „cele” terapeutyczne m.in. działania chemio- i radioterapii [192]. Radioterapia jest szeroko stosowaną terapią przeciwnowotworową [193]. Jej działanie skupia się na indukcji złożonych uszkodzeń DNA w komórkach nowotworowych (w tym CDL, które zawierają DSB i uszkodzenia inne niż DSB) [123]. Kumulacja uszkodzeń prowadzi do śmierci uszkodzonych komórek, co jest w tym przypadku pożądanym efektem [194]. Niestety, w tym samym czasie uszkodzeniom mogą podlegać też zdrowe komórki. W szczególności dotyczy to komórek o podwyższonym stopniu proliferacji takich jak komórki mieszków włosowych i pnia szpiku kostnego. Zostają one uszkodzone w pierwszej kolejności, co objawia się jako charakterystyczny efekt uboczny u pacjentów poddanych terapii, czyli wypadanie włosów i obniżona odporność. Radioterapia wykazuje mniejszą skuteczność w komórkach nowotworowych z regionami niedotlenionymi; dlatego stosuje się kombinację radio- i chemioterapii w celu zwiększenia różnorodności i liczby powstających uszkodzeń DNA.

Znanych jest wiele rodzajów radiosensybilizatorów, jednak wciąż potrzebne jest opracowywanie nowych podejść terapeutycznych [123,195]. Przykładem leków nowej generacji są syntetyczne oligonukleotydy terapeutyczne (*ang. synthetic therapeutic oligonucleotides*, STO), np. AsiDNA (inhibitor polimerazy PARP), mRNA, siRNA, czy oligodeoksynukleotydy z niemetylowanym CpG, które mają odgrywać rolę w regulowaniu ekspresji genów, np. związanych z opornością na promieniowanie [195–200]. Dostarczanie STO do ich celów biologicznych (odpowiednich przedziałów jądrowych lub cytoplazmatycznych zawierających DNA i mRNA) jest procesem pełnym wyzwań [198,201].

Po pomyślnym wprowadzeniu do komórki, STO są obecne przez pewien czas w cytoplazmie, gdzie są podatne na szkodliwe działanie czynników, takich jak High-LET (np. cząstki  $\alpha$ ) i Low-LET (np. UV,  $\beta$ ,  $\gamma$ , promieniowanie rentgenowskie), ROS i chemioterapeutyków. Może to następnie prowadzić do powstania uszkodzeń w ich sekwencji i w rezultacie do dysfunkcji w ich działaniu terapeutycznym [202–204]. Dlatego ważne jest określenie w jaki sposób komórka przetwarza uszkodzenia DNA takie jak cdPu i CDL na poziomie cytoplazmy i czy białka biorące udział w BER są aktywne już na etapie ich biosyntezy.

Tło chorób mitochondrialnych jest bardzo złożone — diagnoza jest trudna ze względu na wiele zmiennych czynników, a badania eksperymentalne są trudne. Około 30% białek mitochondrialnych jest obecnych zarówno w mitochondriach, jak i w cytoplazmie i/lub jądrze, stąd wiele pytań dotyczących funkcji białek mitochondrialnych pozostaje bez odpowiedzi ze względu na trudności z ich wyizolowaniem z tej organelli. Bakteryjne pochodzenie mitochondriów jest ważne dla pełnego zrozumienia stanów patologicznych pojawiających się w wyniku mutacji mtDNA. Pełne poznanie działania mitochondrialnego systemu BER względem złożonych uszkodzeń DNA może znacznie przyczynić się do rozwoju terapii chorób wynikających z mutacji mtDNA i/lub niesprawnych systemów naprawy mtDNA. Dodatkowo, rozważenie cech wspólnych mitochondriów i bakterii na poziomie molekularnym może potwierdzić, iż wybór bakterii jako modelu eksperymentalnego może być przydatny w badaniach chorób wynikających z mutacji pojawiających się w genach mitochondrialnych i/lub genach jądrowych kodujących białka mitochondrialne. Uwzględniając powyższe przesłanki, prezentowana rozprawa doktorska przedstawia analizę wpływu 5',8-cyklo-2'-deoksypuryn na mechanizmy naprawy uszkodzeń zespolonych DNA w ekstraktach mitochondrialnych a także podejmuje próbę przełożenia wyników uzyskanych na podstawie analizy ekstraktów komórek eukariotycznych na potencjał mutagenny w komórkach bakteryjnych.

#### 4. Cele naukowe pracy

Celem niniejszej dysertacji była analiza wpływu 5',8-cyklo-2'-deoksypuryn na mechanizmy naprawy uszkodzeń zespolonych DNA przez białka zawarte w ekstraktach mitochondrialnych a także przełożenie wyników uzyskanych na podstawie analizy wyników uzyskanych dla ekstraktów komórek eukariotycznych na potencjał mutagenny w komórkach bakteryjnych.

Cel naukowy rozprawy został zrealizowany poprzez przeprowadzenie analiz całkowitej aktywności białek biorących udział w naprawie DNA poprzez wycięcie zasady z wykorzystaniem eukariotycznych modeli *in vitro* i komórek bakteryjnych.

Plan badawczy przedstawionej pracy doktorskiej obejmował:

- 1) Pozyskanie aktywnych ekstraktów komórkowych z trzech linii komórkowych (xrs5, BJ, XPC), w tym:
  - Hodowla komórkowa komórek linii Xrs5 (komórki jajnika chomika chińskiego) – Publikacja II i III,
  - Hodowla komórkowa komórek linii BJ (komórki ludzkich fibroblastów) – Publikacja II,
  - Hodowla komórkowa komórek linii XPC (komórki pozyskane ze skóry pacjenta z *Xeroderma Pigmentosum*) – Publikacja II,
  - Pozyskanie komórkowych ekstraktów mitochondrialnych i cytoplazmatycznych z badanych linii komórkowych, optymalizacja i walidacja metodyki pozyskiwania ekstraktów – Publikacja II i III,
  - Analiza ilościowa pozyskanych ekstraktów komórkowych – Publikacja II i III,
  - Ocena jakościowa pozyskanych ekstraktów komórkowych pod kątem całkowitej aktywności białek biorących udział w naprawie DNA poprzez wycięcie zasady – Publikacja II i III.
- 2) Analiza wpływu 5',8-cyklo-2'-deoksypuryn na proces naprawczy uszkodzeń zespolonych przez ekstrakty mitochondrialne pozyskane z wybranych linii komórkowych, w tym:
  - Optymalizacja i walidacja metodyki przygotowania modelowych oligonukleotydów do analiz [86]
  - Określenie wyjściowego poziomu aktywności enzymatycznej dla badanych procesów naprawczych do dalszych eksperymentów na podstawie ekstraktów jądrowych linii xrs5 [86],
  - Ocena wpływu (5'S)-5',8-cyklo-2'-deoksyadenozyny (ScdA) i (5'R)-5',8-cyklo-2'-deoksyadenozyny (RcdA) na proces naprawczy uszkodzeń zespolonych przez białka zawarte w ekstraktach cytoplazmatycznych pozyskanych z linii komórkowych xrs5, BJ i XPC – Publikacja II,
  - Ocena wpływu (5'S)-5',8-cyklo-2'-deoksyadenozyny (ScdA), (5'R)-5',8-cyklo-2'-deoksyadenozyny (RcdA), (5'S)-5',8-cyklo-2'-deoksyguanozyny (ScdG) i (5'R)-5',8-cyklo-2'-deoksyguanozyny (RcdG) na proces naprawczy uszkodzeń zespolonych przez białka zawarte w ekstraktach mitochondrialnych pozyskanych z linii komórkowej xrs5 – Publikacja III.

- 3) Zbadanie częstotliwości powstawania mutacji podczas procesów naprawczych uszkodzeń zespolonych DNA, w tym:
- Analiza literaturowa podobieństw ludzkich mitochondriów i bakterii w kontekście pochodzenia mitochondriów, materiału genetycznego, mechanizmu naprawy przez wycięcie zasady BER i białek biorących w niej udział – Publikacja I,
  - Optymalizacja i walidacja metodyki przygotowania plazmidów zawierających modelowe oligonukleotydy do analiz i wprowadzenie ich do komórki bakteryjnej – Publikacja IV,
  - Ocena wpływu (5'S)-5',8-cyklo-2'-deoksyadenozyny (ScdA) i (5'R)-5',8-cyklo-2'-deoksyadenozyny (RcdA) na proces naprawczy uszkodzeń zespolonych przez komórki bakteryjne *E.coli* – Publikacja IV,
  - Analiza porównawcza wpływu (5'S)-5',8-cyklo-2'-deoksyadenozyny (ScdA) i (5'R)-5',8-cyklo-2'-deoksyadenozyny (RcdA) na częstotliwość powstawania mutacji podczas procesów naprawczych uszkodzeń zespolonych DNA – Publikacja IV.

## 5. Realizacja celów naukowych – wyniki badań i dyskusja

### 5.1. Model badawczy

Przedstawiona praca skupia się na zbadaniu wpływu (5'S) i (5'R) 5',8-cyklo-2'-deoksyuracyny na proces naprawy uszkodzeń zespolonych DNA przez system BER. W moich badaniach uwzględniłam wpływ odległości między uszkodzeniami DNA zlokalizowanymi w obrębie uszkodzeń zespolonych oraz wpływ diastereoizomerów (5'S) i (5'R) cdPu na przebieg naprawy drugiego uszkodzenia zlokalizowanego w obrębie CDL (miejsce AP) przez białka z ekstraktów cytoplazmatycznych (CE) oraz mitochondrialnych (ME) uzyskanych z trzech eukariotycznych linii komórek xrs5, BJ oraz XPC [86,87,90].

Jako model eksperymentalny wykorzystałam syntetyczne dwuniciowe oligonukleotydy o długości 40 pz zawierające 2'-deoksyuracynę (dU, jako prekursor miejsca AP) i 5',8-cyklo-2'-deoksyuracynę: (5'S)-5',8-cyklo-2'-deoksyadenozynę (ScdA), (5'R)-5',8-cyklo-2'-deoksyadenozynę (RcdA), (5'S)-5',8-cyklo-2'-deoksyguanozynę (ScdG) i (5'R)-5',8-cyklo-2'-deoksyguanozynę (RcdG).

Uszkodzenia zlokalizowane były w obrębie dwu- (dsCDL) oraz jednoniciowych (ssCDL) uszkodzeń zespolonych w odległościach od 1 do 10 zasad nukleinowych (w odstępach co 3 pz) w kierunku 3'-końca i 5'-końca (Rycina 7). Badane oligonukleotydy zostały opisane liczbami odpowiadającymi odległości pz pomiędzy uszkodzeniami, a dodatnie i ujemne numery oznaczają kierunek na nici DNA:

- dsCDL:
  - ujemne (-) numery—dsDNA gdzie dU zlokalizowana jest w przeciwległej nici w kierunku 3' od cdPu;
  - dodatnie (+) numery—dsDNA gdzie dU zlokalizowane jest w przeciwległej nici w kierunku 5' od cdPu;
- ssCDL:
  - ujemne (-) numery—dsDNA gdzie dU zlokalizowane jest w tej samej nici w kierunku 5' od cdPu;
  - dodatnie (+) numery—dsDNA gdzie dU zlokalizowane jest w tej samej nici w kierunku 3' od cdPu.

Odległości między uszkodzeniami DNA zostały odpowiednio dobrane w celu uzupełnienia i porównania wyników z wcześniejszymi badaniami na ekstraktach jądrowych linii komórkowych xrs5, BJ i XPC [66,85,86,118]. Jak wspomniano wcześniej, cdPu nie stanowią substratu dla mechanizmu BER. W związku z tym badanie to koncentruje się na drugim uszkodzeniu w obrębie CDL (miejsce AP). Badania przeprowadzone przeze mnie w ramach rozprawy doktorskiej obejmowały analizę

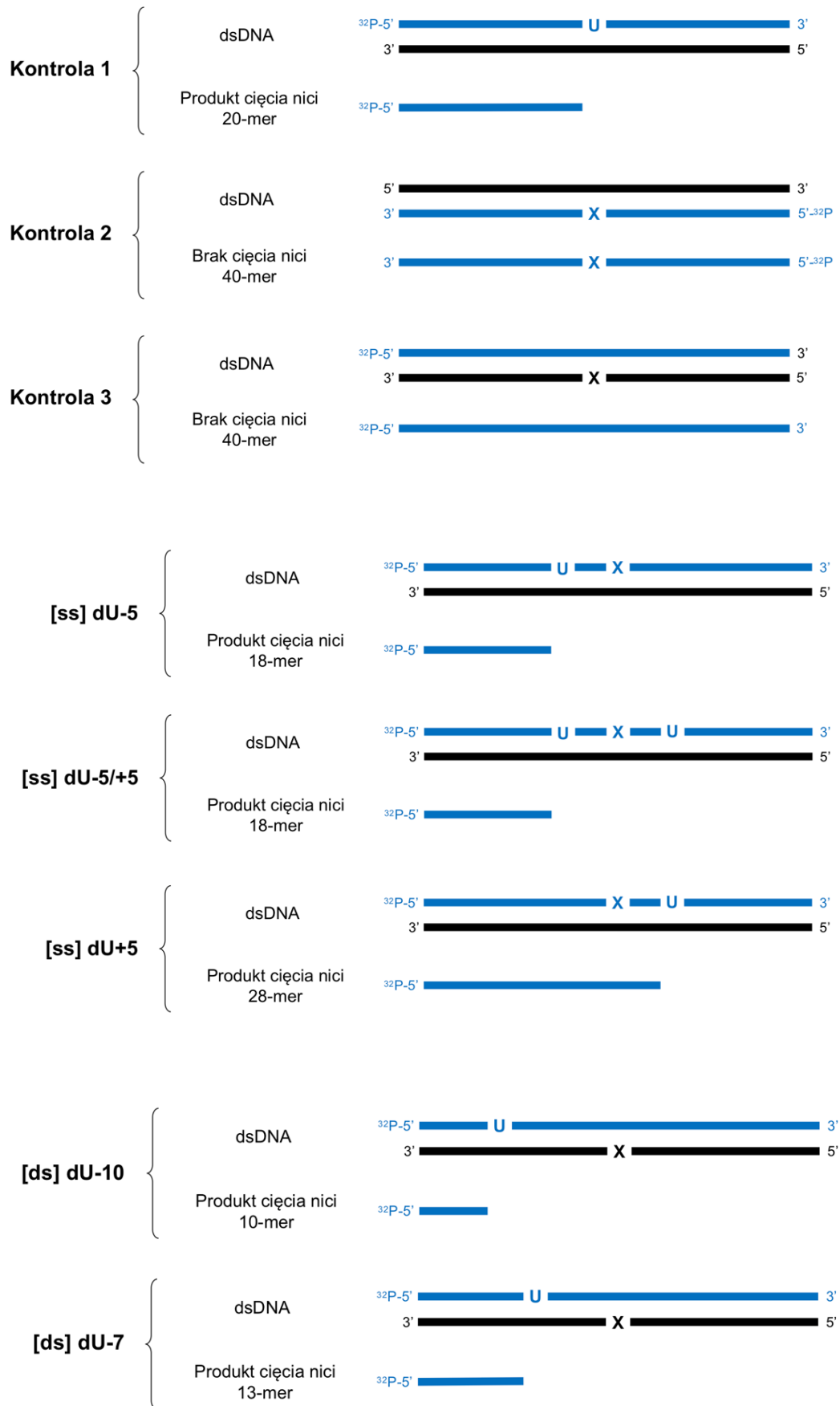


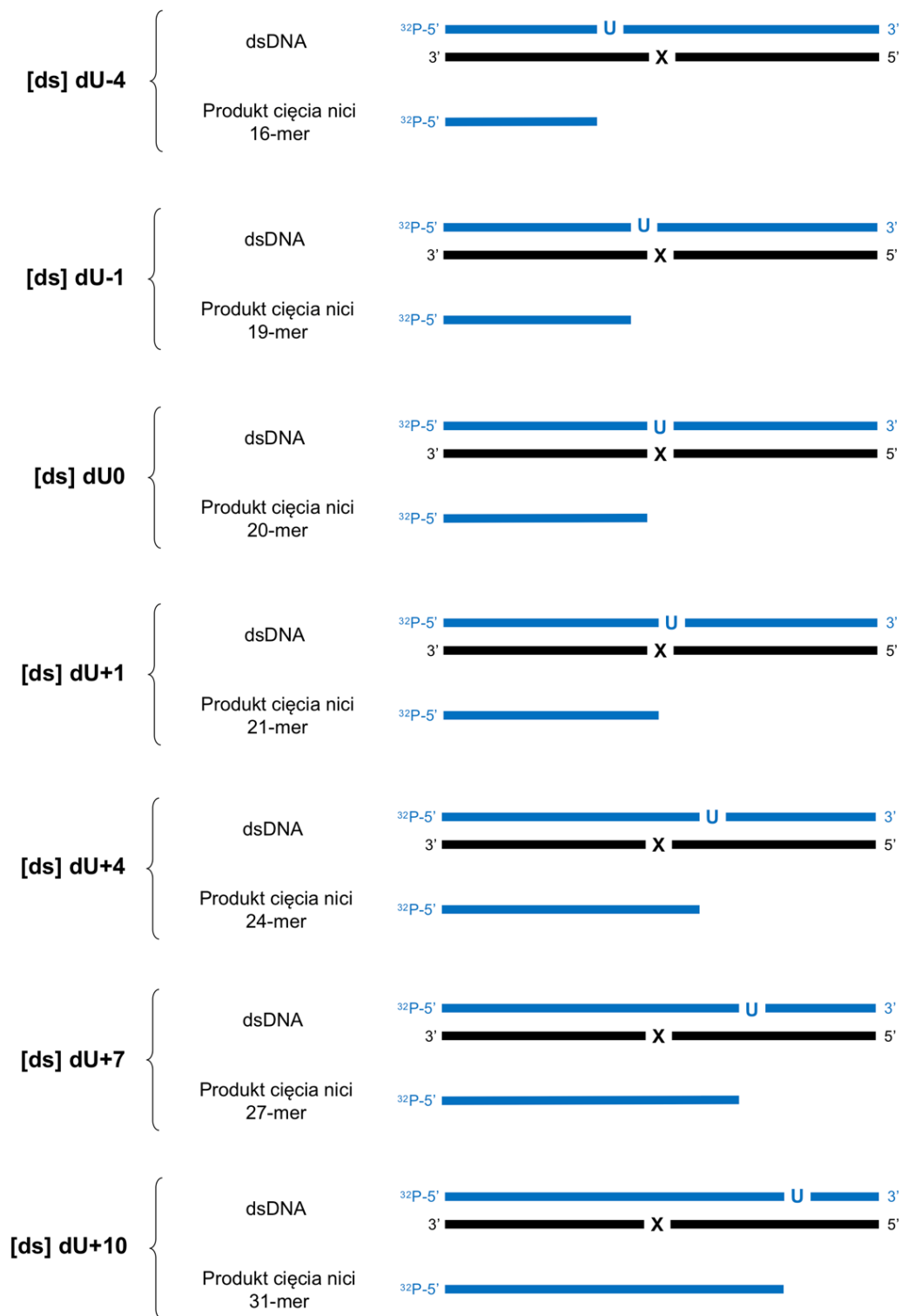
poszczególnych etapów procesu tj. wydajności nacięcia nici w miejscu uszkodzenia przez endonukleazy, późniejszej dobudowie/wstawieniu poprawnego nukleotydu przez polimerazy i końcowej ligacji nici przez ligazy.

Każdy etap przygotowania ds-oligonukleotydów został zweryfikowany poprzez ocenę skuteczności reakcji i czystości jej produktów z wykorzystaniem żeli poliakrylamidowych PAGE. Skuteczne znakowanie końca 5'-<sup>32</sup>P jednoniciowych oligonukleotydów i utworzenie dupleksów potwierdzono na nie denaturujących żelach poliakrylamidowych. Miejsca AP uzyskano w wyniku reakcji z glikozylazą UDG, która uwalnia uracyl z DNA powstały w wyniku deaminacji cytozyny (powstaje mutagenna para U::G) lub wbudowania dUMP do nici DNA (powstaje para U::A) [205]. Czystość dwuniciowych <sup>32</sup>P-oligonukleotydów zawierających miejsca AP oraz wydajne tworzenie miejsc AP zweryfikowano na denaturujących żelach poliakrylamidowych (PAGE).

Wcześniejsze badania wykazały, że ScdA i ScdG są stabilne podczas reakcji z jądrowymi ekstraktami komórkowymi i wybranymi glikozylazami [66,73,86]. Celem potwierdzenia stabilności oligonukleotydów zawierających ScdA, RcdA, ScdG i RcdG w warunkach eksperymentalnych zbadalam wpływ ekstraktu mitochondrialnego i cytoplazmatycznego dla kontrolnych oligonukleotydów zawierających cdPu jako pojedyncze zmiany (Kontrola 2). Aby zweryfikować, czy nie wystąpiły żadne dodatkowe interakcje między ekstraktem a dsDNA, analizie poddałam również nić natywną (Kontrola 3). Potwierdziłam, że dsDNA zawierające cdPu jest stabilne w warunkach eksperymentu do 120 min. Wynik ten jest spójny z wcześniejszymi eksperymentami prowadzonymi dla ekstraktów jądrowych [73,86,118]. Eksperymenty przeprowadziłam trzykrotnie, zgodnie z opisem w pkt. 8.4.

Pierwszym z badanych etapów naprawy bała szybkość rozcięcia nici zawierającej miejsce AP przez endonukleazy obecne w ekstrakcie ME lub CE. Endonukleazy wytwarzają SSB, które obserwowałam na radiogramie jako prążki odpowiadające fragmentom DNA o długościach od 10-meru dla pozycji dU-10 do 31-meru dla pozycji dU+10 (Rycina 7). Pojedyncze nukleotydy dobudowane w wyniku aktywności polimeraz obserwowałam jako prążki na żelach poliakrylamidowych (PAGE) świadczące o wydłużeniu DNA o 1-6 nukleotydów (opisane jako np. SSB+1, SSB+2 itd.). Nić, która uległa naprawie widoczna była jako prążek odpowiadający 40-merowi.





**Rycina 7. Model badawczy.**

Schematyczne przedstawienie badanych dwuniciowych oligonukleotydów (40 pz) z oznaczonymi końcami nici znakowanymi izotopem, lokalizacją uszkodzeń oraz produktami cięcia nici. U—reprezentuje położenie 2'-deoksyurydyny (dU); X—reprezentuje położenie 5',8-cyklo-2'-deoksy puryn (cdPu);  $^{32}\text{P}$ —reprezentuje koniec nici DNA znakowany izotopowo przy użyciu  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ ; niebieski kolor—reprezentuje nić dsDNA znakowaną izotopowo oraz odpowiadający jej produkt cięcia nici o określonej długości (obserwowane na autoradiogramie); czarny kolor—reprezentuje nić dsDNA nie znakowaną izotopowo (nie widoczną na autoradiogramie).

## 5.2. Analiza wpływu 5',8-cyklo-2'-deoksypuryn na mechanizmy naprawy uszkodzeń zespolonych DNA w ekstraktach mitochondrialnych – Publikacja II i III

Enzymy zaangażowane w proces naprawy BER w jądrze komórkowym, które niwelują pojedyncze, izolowane uszkodzenia DNA są hamowane, gdy to samo uszkodzenie jest częścią dwu- lub jednoniciowych uszkodzeń zespolonych. Wcześniejsze badania potwierdziły, że zmiana wzajemnego położenia uszkodzeń nawet o 1 nukleotyd może zmienić przebieg naprawy DNA lub go zatrzymać [86,90]. ScdA jest jednym z najlepiej przebadanych cdPu w kontekście badań uszkodzeń zespolonych DNA [66,73–78]. RcdA występuje w DNA w mniejszych ilościach niż ScdA [79]. Światło słoneczne może powodować nieodwracalną fotoizomeryzację ScdA do RcdA [206].

Warunki eksperymentalne ustalono na podstawie analiz optymalizacyjnych (doboru właściwych punktów pomiaru w czasie trwania reakcji enzymatycznych oraz doboru właściwego składu buforu reakcyjnego) z uwzględnieniem wcześniejszych badań [66,84,86,207]. Na tej podstawie przeprowadzono wstępne badania ogólnej aktywności białek biorących udział w systemie BER z wykorzystaniem ekstraktów jądrowych trzech eukariotycznych linii komórkowych: xrs5 (linia komórkowa jajnika chomika chińskiego wrażliwa na promieniowanie rentgenowskie; stosowana jako linia modelowa dla badań nad uszkodzeniami DNA), BJ (normalne ludzkie fibroblasty; stosowane jako linia referencyjna z nieuszkodzonymi systemami naprawy) i XPC (komórki otrzymane od pacjenta z *Xeroderma Pigmentosum* z grupy C uzupełniającej; stosowane jako model komórek z defektem systemu NER). Dokonano analizy poziomu poszczególnych aktywności enzymatycznych dla badanych etapów procesu naprawczego wykorzystując ekstrakty jądrowe linii xrs5 jako punkt wyjścia do analizy porównawczej aktywności białek biorących udział w naprawie DNA pomiędzy ekstraktami komórkowymi reprezentującymi pulę białek pochodzących z jądra komórki, cytoplazmy i mitochondrium [86]. Analizie poddano oligonukleotydy zawierające uszkodzenia oddalone od siebie od 0 do 10 pz (odstęp 3 pz) w kierunku 3' oraz 5' końca nici DNA, co pozwoliło opisać ogólne trendy efektywności przebiegu danego etapu naprawy BER katalizowanego przez białka zawarte w ekstraktach jądrowych linii komórkowej xrs5 (Tabela 2). Względne rozmieszczenie uszkodzeń zostało dobrane odpowiednio do porównania z wcześniejszymi badaniami prowadzonymi z wykorzystaniem ekstraktów jądrowych [66,85,86]. Do analizy z wykorzystaniem NE z komórek BJ i XPC wybrano oligonukleotydy zawierające uszkodzenia oddalone od siebie w zakresie od 0 do 4 pz w kierunku 3' oraz 5' końca nici DNA. Ten zakres odległości pomiędzy uszkodzeniami w obrębie CDL okazał się najbardziej problematyczny dla poprawności przebiegu naprawy BER w przypadku białek zawartych w NE komórek xrs5. Dokonane obserwacje pozwoliły mi opisać ogólne trendy efektywności przebiegu danego etapu naprawy BER w przypadku ekstraktów jądrowych komórek linii BJ i XPC (Tabela 3).

**Tabela 2.** Ogólne trendy aktywności białek zaangażowanych w proces naprawczy dsCDL zawierających (5'S)-5',8-cyklo-2'-deoksyadenozynę (ScdA), (5'R)-5',8-cyklo-2'-deoksyadenozynę (RcdA), (5'S)-5',8-cyklo-2'-deoksyguanozynę (ScdG) lub (5'R)-5',8-cyklo-2'-deoksyguanozynę (RcdG) w ekstraktach jądrowych linii xrs5 [86].

xrs5	ScdA	Rozcięcie nici	$dU+4 < dU-10 < dU-1 < dU0 \sim dU+10 < dU+1 < dU-4 < dU+7 < dU-7$
		Wydłużenie nici	$dU-10 < dU+4 < dU-7 < dU+7 < dU-4 < dU-1 < dU+10$
		Naprawa nici	$dU+4 < dU-4 < dU-1 < dU-10 < dU+7 < dU-7$
	RcdA	Rozcięcie nici	$dU+4 < dU+10 < dU-4 < dU+7 < dU-1 < dU+1 < dU0 < dU-10 < dU-7$
		Wydłużenie nici	$dU-4 < dU+4 < dU-7 < dU+7 < dU-1 < dU-10 < dU+10$
		Naprawa nici	$dU+4 < dU+7 < dU-7 < dU-1$
	ScdG	Rozcięcie nici	$dU-1 < dU+4 < dU+1 < dU+10 < dU+7 < dU0 < dU-4 < dU-10 \sim dU-7$
		Wydłużenie nici	$dU+4 < dU-7 < dU-10 < dU+7 < dU-1 < dU-4 < dU+10$
		Naprawa nici	$dU+4 < dU+10 < dU-1 < dU-4 < dU+7 < dU-10 < dU-7$
	RcdG	Rozcięcie nici	$dU+4 < dU-1 < dU-4 < dU+1 < dU+10 < dU+7 < dU0 < dU-7 < dU-10$
		Wydłużenie nici	$dU-10 < dU-7 < dU+4 < dU+7 < dU-4 < dU-1 < dU+10$
		Naprawa nici	$dU+10 < dU+4 < dU-1 < dU-4 < dU+7 < dU-7 < dU-10$

**Tabela 3.** Ogólne trendy aktywności białek zaangażowanych w proces naprawczy ssCDL i dsCDL zawierających (5'S)-5',8-cyklo-2'-deoksyadenozynę (ScdA) i (5'R)-5',8-cyklo-2'-deoksyadenozynę (RcdA) w ekstraktach jądrowych linii XPC i BJ [118].

			ScdA	RcdA
XPC	ssCDL	Rozcięcie nici	$dU+5 < dU-5/+5 \sim dU-5$	$dU+5 < dU-5 < dU-5/+5$
		Wydłużenie nici	$dU+5 < dU-5/+5 < dU-5$	
		Naprawa nici	brak	
	dsCDL	Rozcięcie nici	$dU+4 < dU-1 < dU-4 < dU0 < dU+1$	$dU+4 < dU-4 < dU-1 \sim dU+1 < dU0$
		Wydłużenie nici	$dU+4 < dU-1 < dU-4$	
		Naprawa nici	$dU-4 < dU-1$	$dU-1 < dU-4$
BJ	ssCDL	Rozcięcie nici	$dU+5 < dU-5/+5 < dU-5$	$dU+5 < dU-5 < dU-5/+5$
		Wydłużenie nici	$dU+5 < dU-5/+5 < dU-5$	
		Naprawa nici	$dU-5 < dU+5$	brak
	dsCDL	Rozcięcie nici	$dU+4 < dU-1 < dU+1 < dU0 < dU-4$	$dU+4 < dU-1 < dU-4 < dU+1 < dU0$
		Wydłużenie nici	$dU+4 < dU-1 < dU-4$	
		Naprawa nici	$dU-4 < dU-1$	

5.2.1. Ocena wpływu (5'S)-5',8-cyklo-2'-deoksyadenozyny (ScdA) i (5'R)-5',8-cyklo-2'-deoksyadenozyny (RcdA) na proces naprawczy uszkodzeń zespolonych przez ekstrakty cytoplazmatyczne pozyskane z linii komórkowych xrs5, BJ i XPC – Publikacja II

W ramach prowadzonych badań po raz pierwszy poddano analizie efektywność naprawy uszkodzeń zespolonych DNA zawierających miejsce AP i cdPu w ekstraktach cytoplazmatycznych. Zagadnienie to zostało zbadane poprzez sprawdzenie czy białka zaangażowane w przetwarzanie/naprawę uszkodzeń DNA są aktywne w cytoplazmie oraz czy aktywność tych białek różni się w zależności od miejsca występowania w komórce. Oceniono wydajność nacięcia nici dsDNA, późniejszą syntezę DNA, rekonstytucję i degradację nici dsDNA przez białka cytoplazmatyczne. Zbadano wpływ odległości pomiędzy uszkodzeniami występującymi w obrębie CDL oraz wpływ diastereoizomerów cdPu na proces naprawy dsDNA w cytoplazmie komórek linii xrs5, BJ i XPC. W zależności od formy diastereoizomerycznej cdA zaobserwowano odmienny wpływ na proces naprawy uszkodzeń DNA. Przyjęto, że obecność (5'S) i (5'R) cdG również wpływa odmiennie na działanie systemu BER. Z wcześniejszych badań wynika, że ScdG może blokować replikację i procesy naprawcze bakterii *E. coli* z powodu niezdolności polimerazy do ominięcia struktury ScdG obecnej w DNA [70,73]. Wpływ RcdG na te procesy jest znacznie rzadziej badany ze względu na problemy pojawiające się podczas syntezy RcdG i włączania jej do nici modelowych oligonukleotydów [73]. Dlatego też potrzebne są badania uwzględniające oba izomery cdG zlokalizowane w obrębie dsCDL oraz wpływ ich obecności na naprawę pozostałych uszkodzeń obecnych w klastrze.

Dokonano analizy optymalizacyjnej reakcji enzymatycznych w szlaku BER w celu doboru odpowiedniej ilości ekstraktu CE, którą ustalono na poziomie 50 µg białek. Aktywność enzymatyczna białek zaangażowanych w mechanizmy naprawcze w CE względem ds-oligonukleotydu zawierającego pojedyncze miejsce AP (Kontrola 1) przedstawiała się następująco: aktywność endonukleolityczna (tworzenie SSB w wyniku hydrolizy miejsca AP) po 1 minucie, aktywność polimeraz (dobudowa minimum 1 nukleotydu do naprawianej nici) po 5 min, oraz rekonstytucję nici DNA po 120 min inkubacji dsDNA z odpowiednim CE. Ponadto, zaobserwowano aktywność egzonukleolityczną po 5 min reakcji. Potwierdza to obecność białek egzonukleolitycznych w CE odpowiedzialnych m.in. za degradację obcego materiału genetycznego, a tym samym ochronę komórki w sytuacji wprowadzenia do komórki obcego DNA (np. w przypadku infekcji wirusowej). Obecność cdA w dsDNA wymuszała degradację DNA bardziej niż obecność cdG (wyjątki: RcdG/dU+4 > RcdA/dU+4 i RcdG/dU+7 > RcdA/dU+7). Poziom degradacji łańcucha kwasów nukleinowych był podwyższony o ok. 10% dla oligonukleotydów zawierających diastereoizomer (5'R) cdA i cdG w porównaniu z diastereoizomerami (5'S). Ilość jednostek 2'-deoksyrybonukleotydowych (dNU) uwolnionych z łańcucha DNA różniła się w zależności od względnej pozycji cdPu i SSB w obrębie CDL (od jednej do sześciu dNU). Ponadto, analiza wykazała, że im wyższy poziom degradacji nici, tym niższy poziom

rekonstrukcji uszkodzonej nici DNA. Przykładowo, najwyższy poziom aktywności egzonukleolitycznej odnotowano dla oligonukleotydów oznaczonych jako dU+1 przy najniższym poziomie rekonstrukcji docelowego dsDNA. Jak wykazały wcześniejsze badania, uszkodzenia zlokalizowane w pozycji +1 prz od cdPu nie były przetwarzane przez polimerazy jądrowe [86,117,118], w wyniku czego DNA zostało przekierowane na ścieżkę degradacji w cytoplazmie. Trendy obserwowane wcześniej dla naprawy zespolonych uszkodzeń DNA przez białka ekstraktów jądrowych pokrywają się z trendami obserwowanymi dla ekstraktów cytoplazmatycznych pochodzących z linii komórkowej xrs5 (Tabela 4), BJ i XPC (Tabela 5).

**Tabela 4.** Ogólne trendy aktywności białek zaangażowanych w proces naprawczy dsCDL zawierających (5'S)-5',8-cyklo-2'-deoksyadenozynę (ScdA), (5'R)-5',8-cyklo-2'-deoksyadenozynę (RcdA), (5'S)-5',8-cyklo-2'-deoksyguanozynę (ScdG) lub (5'R)-5',8-cyklo-2'-deoksyguanozynę (RcdG) w ekstraktach cytoplazmatycznych linii xrs5.

xrs5	ScdA	Rozcięcie nici	$dU+4 < dU-1 < dU+1 < dU-4 \sim dU0 < dU+7 < dU+10 < dU-10 < dU-7$
		Wydłużenie nici	$dU-10 < dU-7 < dU+4 < dU-4 < dU+7 < dU-1 < dU+10$
		Naprawa nici	$dU+10 < dU+4 < dU-1 < dU-4 < dU-10 < dU+7 < dU-7$
		Degradacja nici	$dU+7 < dU+4 < dU-1 < dU0 < dU+1 < dU-10$
	RcdA	Rozcięcie nici	$dU+4 < dU-1 < dU-4 < dU+1 < dU0 \sim dU+10 < dU+7 < dU-10 < dU-7$
		Wydłużenie nici	$dU-1 < dU+4 < dU-7 < dU-4 < dU+7 < dU-1 < dU+10$
		Naprawa nici	$dU-10 \sim dU-4 \sim dU+4 < dU-1 < dU+7 < dU-7$
		Degradacja nici	$dU-7 < dU+7 < dU+4 < dU-4 < dU-1 < dU0 < dU-10 \sim dU+1$
	ScdG	Rozcięcie nici	$dU-1 < dU+4 < dU+1 < dU+7 < dU+10 < dU0 \sim dU-7 < dU-4 < dU-10$
		Wydłużenie nici	$dU+4 < dU-4 < dU+7 < dU-1 < dU+10 < dU-7$
		Naprawa nici	$dU-4 < dU-7 < dU+7 < dU-10$
		Degradacja nici	$dU+7 \sim dU+10 < dU+4 < dU+1$
	RcdG	Rozcięcie nici	$dU-1 < dU+4 < dU+7 < dU+10 < dU+1 < dU-4 < dU-7 < dU0 < dU-10$
		Wydłużenie nici	$dU+4 < dU+7 < dU-7 \sim dU-1 < dU-4 < dU+10$
		Naprawa nici	$dU-1 < dU+4 < dU-4 < dU-10 < dU+7 < dU-7$
		Degradacja nici	$dU-4 < dU0 \sim dU+10 < dU+1 < dU-10 < dU+7 < dU+4$

**Tabela 5.** Ogólne trendy aktywności białek zaangażowanych w proces naprawczy ssCDL i dsCDL zawierających (5'S)-5',8-cyklo-2'-deoksyadenozynę (ScdA) i (5'R)-5',8-cyklo-2'-deoksyadenozynę (RcdA) w ekstraktach cytoplazmatycznych linii XPC i BJ.

			ScdA	RcdA
XPC	ssCDL	Rozcięcie nici	dU+5 < dU-5/+5 < dU-5	dU+5 < dU-5 < dU-5/+5
		Wydłużenie nici	dU+5 < dU-5/+5 < dU-5	
		Naprawa nici	dU-5	
		Degradacja nici	dU+5 < dU-5 < dU-5/+5	dU-5 < dU-5/+5 < dU+5
	dsCDL	Rozcięcie nici	dU-1 < dU+4 < dU+1 < dU0 < dU-4	dU+4 < dU-1 ~ dU0 < dU+1 < dU-4
		Wydłużenie nici	dU+4 < dU-1 < dU-4	dU+4 < dU-4 < dU-1
		Naprawa nici	brak	
		Degradacja nici	dU-1 < dU+1 ~ dU0 ~ dU+4 < dU-4	dU+4 < dU-4 < dU-1 < dU+1 < dU0
BJ	ssCDL	Rozcięcie nici	dU+5 < dU-5/+5 < dU-5	dU-5 < dU+5 ~ dU-5/+5
		Wydłużenie nici	dU+5 < dU-5/+5 < dU-5	
		Naprawa nici	dU-5	brak
		Degradacja nici	dU-5 < dU-5/+5 < dU+5	dU+5 < dU-5/+5 < dU-5
	dsCDL	Rozcięcie nici	dU+4 < dU-1 < dU+1 < dU-4 < dU0	dU+4 < dU-1 < dU+1 < dU0 < dU-4
		Wydłużenie nici	dU+4 < dU-1 < dU-4	
		Naprawa nici	dU+1	brak
		Degradacja nici	dU-1 < dU+1 < dU0	dU-1 < dU0 < dU+1

Przeprowadzone przeze mnie analizy wykazały, że białka o funkcji endonukleolitycznej są aktywne we wszystkich analizowanych CE względem dsDNA z dwuniciowym rozmieszczeniem CDL zawierającym cdPu i miejsce AP oddalonych od siebie w nici DNA w zakresie od 0 do 4 pz w kierunku 5' i 3'. Najniższą aktywność endonukleolityczną zaobserwowano dla oligonukleotydów oznaczonych dU+4 w przypadku wszystkich trzech badanych linii komórkowych i obu diastereoizomerów cdPu. Jest to zgodne z wcześniejszymi wynikami, w których miejsce AP znajdujące się w pozycji +4 [86,118] lub +5 [66] względem ScdA hamowało aktywność endonukleaz obecnych w NE. Ogólna aktywność endonukleaz w badanych ekstraktach CE była niższa dla dsDNA zawierającego (5'R) w porównaniu z (5'S). Komórkowe ekstrakty pozyskane z linii XPC wykazały aktywność endonukleolityczną nawet do 30% niższą w przypadku obecności RcdA w nici DNA dla oligonukleotydów oznaczonych dU0, dU-4 i dU+4, podczas gdy dla oligonukleotydów oznaczonych dU+1 i dU-1 poziomy były porównywalne między izomerami. Ekstrakty pozyskane z komórek BJ prezentowały odwrotny trend – obecność RcdA w nici DNA stymulowała hydrolizę nici DNA w miejscu AP nawet o 14% w porównaniu z obecnością ScdA. Ogólna aktywność endonukleolityczna była zbliżona w ekstraktach CE i NE



komórek linii xrs5 i XPC—pozycje dU-1 i dU+4 najsilniej hamowały działanie endonukleaz [86,118]. Wydajność hydrolizy nici dsDNA w miejscu AP różniła się w zależności od rozmieszczenia modelowych uszkodzeń i wzrastała w kolejności przedstawionej w Tabeli 5.

Polimeraza  $\beta$  (Pol $\beta$ ) „omija” RcdA podczas replikacji i naprawy DNA, jednak nie jest w stanie ominąć struktury ScdA [69]. Niniejsze badania wykazały, że Pol $\beta$  wydaje się wykazywać odwrotny trend względem cdG. W NE pozyskanym z komórek xrs5 aktywność polimeraz była o 8-20% niższa dla oligonukleotydów zawierających RcdA niż w obecności ScdA, co jest zgodne z obserwowaną efektywnością polimeraz obecnych w cytoplazmie komórek xrs5. Polimerazy w obecności RcdA/dU-4 i RcdA/dU-1 w dsDNA były o ok. 10% mniej aktywne niż dla 5'S [86]. Polimerazy obecne w CE linii komórkowej XPC wykazywały analogiczne trendy aktywności do tych zaobserwowanych dla komórek linii xrs5. Wydajność wydłużania nici DNA podlegającego naprawie po 30 minutach była najniższa dla oligonukleotydu oznaczonego dU+4 (w zakresie od 13 do 33%). Nowe jednostki dNU zostały włączone najefektywniej do nici oligonukleotydów zawierających (5'S) lub (5'R) cdA/dU-4 w CE pozyskanych z komórek linii BJ oraz XPC. Zaobserwowano włączenie więcej niż jednego dNU zarówno dla izomeru (5'S), jak i (5'R) (dobudowano cztery dNU do nici DNA w pozycjach dU-4 i dU+4), co sugeruje dominujące działanie mechanizmu LP-BER, który obserwowano również we wcześniejszych badaniach z udziałem ekstraktów jądrowych linii komórkowych xrs5 i XPC [86,118]. Może to wskazywać na obecność w cytoplazmie białek, które nie uległy translokacji do jądra lub na wyższą aktywność białek niezbędnych w przebiegu systemu LP-BER w cytoplazmie [208]. Aktywność polimeraz w CE była podobna lub nawet wyższa niż w NE badanych linii komórkowych. Należy zauważyć, że różne powtórzenia eksperymentalne wykazały wydłużenie nici DNA w różnym stopniu, co świadczy o konieczności dokładniejszej analizy warunków wymaganych do aktywacji mechanizmu LP-BER względem DNA zawierającego cdPu.

Eksperymenty wykonane w ramach niniejszej rozprawy doktorskiej są pierwszymi, które opisują efektywność procesu naprawy dsDNA zawierającego CDL z cdPu przez białka zawarte w CE. Diastereoizomery cdA (5'S) i (5'R) mogą mieć odmienny wpływ biologiczny na komórkę [66,73–79]. Porównując wyniki uzyskane dla ekstraktów NE i CE pozyskanych z linii XPC i xrs5 wykazałam, że system BER naprawia uszkodzenia w sąsiedztwie ScdA z wyższą wydajnością niż w sąsiedztwie RcdA. Prawdopodobnie wynika to z faktu, że izomer (5'R) zniekształca helisę DNA w większym stopniu niż (5'S) [209] oraz że zmiany zlokalizowane w kierunku 3'-końca przeciwległej nici dla dsCDL i kierunku 5'-końca tej samej nici dla ssCDL są efektywniej procesowane przez białka jądrowe zaangażowane w mechanizm BER, co potwierdzają również wcześniejsze badania [66]. Ogólne trendy wcześniej oznaczone dla ekstraktów jądrowych pokrywają się z tymi obserwowanymi dla ekstraktów cytoplazmatycznych pochodzących z komórek linii xrs5, BJ i XPC [86,118].

W przypadku CDL zawierającego uszkodzenia w pozycjach dU0 oraz dU+1 nie zaobserwowano wbudowywania nowych nukleotydów do nici DNA, a tym samym późniejszej rekonstrukcji. Jest to zbieżne z wynikami wcześniejszych badań z wykorzystaniem NE—dla oligonukleotydów oznaczonych dU0 i dU+1 (dla obu diastereoizomerów cdA) etap ligacji fragmentów naprawianej nici nie był zaobserwowany [66,86]. Aktywność białek zaangażowanych w naprawę DNA była wyższa dla oligonukleotydów zawierających ScdA niż RcdA (wyjątki: RcdA/dU-1 > ScdA/dU-1 i RcdA/dU+4 > ScdA/dU+4), co odpowiada obserwacjom dokonanych dla białek zaangażowanych w naprawę w NE [86]. W przypadku cdG aktywność białek zaangażowanych w naprawę DNA była wyższa dla oligonukleotydów zawierających RcdG niż ScdG z wyjątkiem ScdG/dU-10 > RcdG/dU-10. Efektywność rekonstrukcji nici DNA zawierającej cdG i miejsce AP w pozycjach dU-4 i dU+4 była zbliżona do tej zaobserwowanej dla oligonukleotydów zawierających w swojej sekwencji cdA—ScdG/dU-4 naprawiany był 2,7-raza wydajniej niż ScdG/dU+4. Odwrotnie, w przypadku RcdG, wartość ta była 1,7-krotnie wyższa dla RcdA/dU-4 niż RcdA/dU+4, podczas gdy były one porównywalne w przypadku obecności cdA w nici DNA. Ogólny trend aktywności białek zaangażowanych w procesy naprawy BER w ekstraktach cytoplazmatycznych był zgodny z trendem opisanym dla ekstraktów jądrowych. Wykazano, że całkowita efektywność naprawy nici DNA była niższa w CE w porównaniu z NE [86]. Wyniki analiz potwierdziły, iż rozmieszczenie zmian i diastereoizomer cdPu wpływają na efektywność naprawy miejsca AP występującego w obrębie CDL zawierającego cdPu w wyniku aktywności białek obecnych w ekstraktach cytoplazmatycznych badanych eukariotycznych linii komórkowych.

#### *5.2.2. Ocena wpływu (5'S) i (5'R) 5',8-cyko-2'-deoksyadenozyny (cdA) oraz 5',8-cyko-2'-deoksyguanozyny (RcdG) na proces naprawy uszkodzeń zespolonych przez ekstrakty mitochondrialne pozyskane z linii komórkowej xrs5 – Publikacja III*

Głównym elementem niniejszej pracy było zbadanie całkowitej aktywności dwóch etapów szlaku naprawy DNA mtBER (nacięcia nici wynikające z całkowitej aktywności endonukleolitycznej mitochondriów i wydłużenia nici poprzez dobudowę nowych nukleotydów katalizowaną przez polimerazy) w obecności CDL zawierającego miejsce AP i cdPu w niciach DNA. Mutacje powstające w wyniku działania ROS na genom pojawiają się w mtDNA przy niższym stężeniu ROS niż w nDNA [43]. Eksperymenty na kardiomiocytach szczurów pokazują, że poddanie komórek działaniu H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> może prowadzić do spadku aktywności kompleksów I, III i IV o 50% w ciągu 10 min [171]. Wiedza o tym, jak obecność cdPu wpływa na naprawę mitochondrialnego DNA może prowadzić do nowych zastosowań w medycynie i/lub rozwoju nowych farmaceutyków ze względu na diagnostyczny potencjał cdPu [75,210,211].

Analiza obejmowała ocenę cdA i cdG, postaci diastereomerycznej cdPu oraz odległości pomiędzy cdPu a miejscem AP (1–7 par zasad w kierunku końca 3' i 5' nici DNA) pod kątem ich aktywności naprawczej w ekstraktach mitochondrialnych (ME) komórek xrs5 (linia komórkowa jajnika chomika chińskiego wrażliwa na promieniowanie rentgenowskie). Na podstawie analizy literaturowej określiłam, iż jest to pierwsza tego typu analiza wpływu zarówno (5'S), jak i (5'R) cdPu na mitochondrialny przebieg naprawy drugiego uszkodzenia zlokalizowanego w obrębie CDL (prawdopodobnie z powodu trudności z chemiczną syntezą RcdG). Przeprowadzono weryfikację aktywności enzymatycznej ME, która została potwierdzona kwalifikując otrzymany ME do dalszych etapów badań.

Uzyskane wyniki wykazały, iż względna odległość między pojedynczą zmianą (miejscem AP) zlokalizowaną na jednej nici a cdPu zlokalizowanym na nici komplementarnej wpływa na zdolność naprawy pierwszego z uszkodzeń zgodnie z trendami przedstawionymi w Tabeli 6.

**Tabela 6.** Ogólne trendy aktywności białek zaangażowanych w proces naprawczy dsCDL zawierających (5'S)-5',8-cyklo-2'-deoksyadenozynę (ScdA), (5'R)-5',8-cyklo-2'-deoksyadenozynę (RcdA), (5'S)-5',8-cyklo-2'-deoksyguanozynę (ScdG) lub (5'R)-5',8-cyklo-2'-deoksyguanozynę (RcdG) w ekstraktach mitochondrialnych linii xrs5.

xrs5	ScdA	Rozcięcie nici	$dU+4 < dU-1 < dU+7 \sim dU0 < dU+1 < dU-4 < dU-7$
		Wydłużenie nici	$dU+4 < dU+7 < dU-4 < dU-1 < dU-7$
	RcdA	Rozcięcie nici	$dU+4 < dU+7 < dU-1 < dU-4 \sim dU+1 \sim dU-7 < dU0$
		Wydłużenie nici	$dU+4 < dU+7 < dU-4 < dU-1 < dU-7$
	ScdG	Rozcięcie nici	$dU-1 < dU+4 < dU+1 < dU-7 \sim dU+7 < dU-4 < dU0$
		Wydłużenie nici	$dU+4 < dU+7 < dU-1 < dU-4 < dU-7$
	RcdG	Rozcięcie nici	$dU-4 < dU+1 \sim dU+4 < dU+7 < dU-1 < dU0 < dU-7$
		Wydłużenie nici	$dU+4 < dU-7 < dU-1 < dU-4 < dU0 < dU+7$

Badania uwzględniały analizę całkowitej aktywności endonukleolitycznej mitochondriów, której wynikiem jest nacięcie nici DNA w miejscu AP. Prawie wszystkie badane oligonukleotydy zostały nacięte po 30 min inkubacji z ME z ok. 80-92% wydajnością. Wyjątki stanowiły wyniki uzyskane dla ScdG/dU-1, ScdA/dU+4 i RcdA/dU+4, gdzie po 6h osiągnięto wydajność na poziomie ok. 50-60%, przy czym była ona niższa dla oligonukleotydów zawierających cdG niż dla tych zawierających cdA. Co ciekawe, aktywność endonukleaz względem Kontroli 1 (z pojedynczym miejscem AP) była niższa (71,92% po 30 min) niż ta odpowiadająca dupleksom zawierającym dwuniciowe CDL. Wskazuje to, iż obecność cdA w CDL stymuluje aktywność endonukleaz. Wyniki wydają się być zgodne z faktem, że główna endonukleaza biorąca udział w BER, APE1, musi pozostawać związana z dsDNA podczas hydrolizy nici w miejscu AP. Miejsce AP w pozycji dU+4 hamuje aktywność endonukleolityczną ME,

co jest zgodne z wcześniejszymi obserwacjami dla NE i CE [66,86]. Efektywność nacięcia przeciwległej nici była wyższa dla oligonukleotydów zawierających RcdA lub ScdG niż dla tych zawierających ScdA lub RcdG w swojej sekwencji. Jest to sprzeczne z wcześniej badanym NE, gdzie obecność ScdA w dsDNA zwiększała poziom cięcia w miejscu AP w większym stopniu niż obecność RcdA [86]. Pozwala to stwierdzić, że obecność ScdA w mtDNA jest mniej korzystna niż obecność RcdA dla przebiegu reakcji enzymatycznego rozcinania nici DNA w miejscu AP przez endonukleazę APE1 lub inne enzymy wykazujące aktywność endonukleolityczną (glikozylazy DNA/liazy AP np. NEIL1, OGG1, NTH). Aktywność endonukleolityczna białek w ME była o ok. 20% niższa w porównaniu z wcześniej badanymi ekstraktami jądrowymi (NE) [86]. Co więcej, hydroliza miejsca AP trwała dłużej w przypadku ME (30 min) niż NE (1 min) [86]. Większość białek mitochondrialnych zaangażowanych w naprawę DNA jest translokowana do mitochondriów dopiero po wykryciu uszkodzenia mtDNA przez komórkę. Jednym ze znanych przykładów jest APE1, który jest „przechowywany” i w razie potrzeby translokowany z przestrzeni międzybłonowej do macierzy mitochondrialnej. Prawdopodobnie mniejsza ilość APE1 jest obecna w mitochondriach z nieuszkodzonym DNA [212]. Dlatego też może upłynąć więcej czasu, zanim uszkodzone mtDNA zostanie rozpoznane i wycięte z genomu mitochondrialnego. Przeprowadzone przez mnie badania dotyczyły komórek w stanie homeostazy (bez zewnętrznych czynników uszkadzających hodowlę komórkową), co mogło skutkować małą ilością białek o aktywności endonukleolitycznej obecnych w ME. Miejsca AP zlokalizowane w mtDNA w kierunku końca 5' i 3' nici DNA od cdPu były hydrolizowane ze zbliżoną wydajnością. Jest to sprzeczne z wynikami dotyczącymi NE linii komórkowej xrs5, w przypadku której miejsca AP zlokalizowane w kierunku końca 5' od cdPu w nici DNA były hydrolizowane mniej efektywnie [86].

Przeprowadzono analizę całkowitej aktywności polimeraz obecnych w ME komórek linii xrs5. Polimerazy odgrywają kluczową rolę w replikacji i naprawie materiału genetycznego zarówno w jądrze, jak i mitochondriach, jednak pula polimeraz mitochondrialnych różni się od puli jądrowej. Oprócz najlepiej scharakteryzowanej mitochondrialnej polimerazy replikacyjnej  $\gamma$  (Pol $\gamma$ ), w mitochondriach wykryto również inne polimerazy np. polimeraza  $\beta$  (Pol $\beta$ ), PrimPol, podjednostka polimerazy  $\zeta$  Rev3 (PolZ), polimeraza  $\theta$  (PolQ) [148]. Badania przeprowadzone przez Bohra i in. wykazały, że Pol $\beta$  była bardziej skuteczna podczas procesu naprawy w wypełnianiu jednonukleotydowej luki powstałej po wycięciu uszkodzenia niż Pol $\gamma$  [213].

Aktywność polimeraz została wykryta dla większości badanych oligonukleotydów. Wyjątek stanowiły oligonukleotydy oznaczone dU0 i dU+1 dla których nie zaobserwowano syntezy DNA, co jest zgodne z wcześniejszymi wynikami uzyskanymi z wykorzystaniem NE i CE. Wydajność polimerazy dla Kontroli 1 osiągnęła 35,16% po 6 h, co w przypadku NE osiągnięto po 30 min [86].

Co ciekawe, dla RcdG/dU0 zaobserwowano dobudowanie jednej jednostki dNU we wszystkich powtórzeniach eksperymentalnych. Może to wskazywać na działanie polimeraz, takich jak PrimPol zdolnych do omijania złożonych uszkodzeń DNA takich jak cdPu. Dla większości badanych oligonukleotydów wykazano dobudowanie 1 dNU, co może wskazywać, że SP-BER jest głównym szlakiem naprawczym w mitochondriach dla analizowanego modelu dsCDL. Ponadto, wyniki uzyskane dla ScdG/dU-1 i RcdG/dU-7 zaobserwowano wstawienie 2 dNU. Taka różnica w odległości i pomiędzy izomerami może wynikać z faktu, że (5'R) i (5'S) mogą wymuszać różne zmiany strukturalne podwójnej helisy. W przypadku eksperymentów z ekstraktem jądrowym, również odnotowano dobudowę 2 dNU (dla oligonukleotydów oznaczonych RcdA/dU-7, RcdA/dU+10, RcdG/dU+10, ScdG/dU+10 i RcdG/dU-4) [86].

Ogólny trendy aktywności polimeraz obserwowane dla ME są zbieżne z trendami obserwowanymi dla NE—uszkodzenia DNA zlokalizowane w obrębie CDL w stronę końca 5' nici od cdPu stanowią gorszy substrat dla polimeraz mitochondrialnych niż te zlokalizowane w stronę końca 3'. Diastereoizomery cdPu mają różny wpływ na syntezę DNA podczas naprawy genomu, co wykazano w przedstawionych badaniach. Ogólna efektywność dobudowy nowych nukleotydów była do 8% wyższy dla RcdA niż ScdA (z wyjątkiem ScdA/dU+4) i 21–66% wyższa dla ScdG niż RcdG (z wyjątkiem ScdG/dU+7). Obserwacje te mogą wskazywać na zdolność polimeraz mitochondrialnych do ominięcia RcdA w nici DNA, co nie zostało zaobserwowane dla nici zawierającej ScdA. Co ciekawe, polimerazy wykazały odwrotną aktywność względem diastereoizomerów cdG, co zaobserwowano również we wcześniejszych badaniach z wykorzystaniem NE [86]. Różnica nawet jednego nukleotydu w odległości pomiędzy uszkodzeniami w obrębie CDL może w odmienny sposób wpłynąć na naprawę mtDNA. Ze względu na powyższe, ważne jest szczegółowe zbadanie mechanizmów naprawy tego typu uszkodzeń w genomie mitochondrialnym. Badania te nie są jednak powszechne również ze względu na trudności związane z pozyskaniem wystarczających ilości ekstraktów mitochondrialnych z komórek różnego typu.

### 5.3. Wpływ 5'8,-cyklo-2'-deoksyadenozyny na mutagenność w modelu bakteryjnym *Escherichia coli* – Publikacja IV

W ramach przedstawionej rozprawy doktorskiej dokonano oceny wpływu (5'S)-5',8-cyklo-2'-deoksyadenozyny (ScdA) i (5'R)-5',8-cyklo-2'-deoksyadenozyny (RcdA) na proces naprawczy uszkodzeń zespolonych przez komórki bakteryjne *E.coli* [214]. Następnie dokonano analizy porównawczej wpływu ScdA i RcdA na częstotliwość powstawania mutacji podczas procesów naprawczych uszkodzeń zespolonych DNA w komórkach bakteryjnych i ekstraktach mitochondrialnych komórek eukariotycznych linii xrs5. Analiza optymalizacyjna procesu została

przeprowadzona na podstawie wcześniejszych badań mechanizmów naprawczych w modelu bakteryjnym *E.coli* [70,78,84,215–219]. Mutacje wynikające z obecności CDL scharakteryzowałam na podstawie analizy sekwencji DNA otrzymanych w wyniku transformacji bakterii plazmidowym DNA zawierającym badane oligonukleotydy. Uzyskane wyniki wykazały, że częstość mutacji była znacznie wyższa dla badanych CDL niż dla oligonukleotydu nieposiadającego uszkodzeń i oligonukleotydów zawierających pojedyncze uszkodzenia (dU lub cdA). Ponadto, nie zaobserwowano wystąpienia mutacji dla oligonukleotydów zawierających izolowane uszkodzenia w dsDNA (Kontrola 1-3) – pojedyncze uszkodzenia (dU i cdA) zostały skutecznie usunięte przez bakteryjne systemy naprawy DNA a prawidłowa sekwencja DNA plazmidowego przywrócona. Odmienne sytuacja prezentowała się w przypadku obecności w DNA uszkodzeń zespolonych zawierających ScdA lub RcdA w jednej nici i dU w nici komplementarnej (odległość między uszkodzeniami  $\leq 4$  pz). W przeprowadzonych badaniach wykazałam, że obecność RcdA w DNA prowadziła do mniejszej częstości powstawania mutacji niż obecność ScdA. Ta obserwacja jest zgodna z wcześniejszymi badaniami CDL, w których RcdA było naprawiane efektywniej niż ScdA przez ekstrakty jądrowe i mitochondrialne z komórek eukariotycznych [86,117,118]. RcdA powoduje wygięcie podwójnej helisy DNA w większym stopniu niż ScdA, stąd enzymy naprawcze DNA efektywniej rozpoznają uszkodzenie i usuwają je z sekwencji plazmidu [209]. Ponadto, replikacja w *Escherichia coli* może być blokowana przez izomer (5'S) cdG i cdA, ale nie przez izomer (5'R) [69,70,72,78]. Z drugiej strony, wcześniejsze badania wykazały, że naprawa uszkodzeń w obrębie sekwencji zawierającej uszkodzenia zespolone zachodzi w określonej kolejności, aby zminimalizować prawdopodobieństwo powstawania potencjalnie śmiertelnych dla komórki pęknięć dwuniciowych [113,115,214] Uzyskane przeze mnie wyniki również mogą wskazywać na hierarchiczność w naprawie uszkodzeń DNA [115].

Wyniki pokazują, że odległość 4 pz pomiędzy uszkodzeniami w kierunku obu końców nici DNA jest wystarczająca do poprawnego usuwania dU i cdA z DNA. Oligonukleotydy oznaczone jako dU+4 i dU-4 dla obu diastereoizomerów nie wykazały zmian w sekwencji (w porównaniu z natywnym, nieuszkodzonym substratem). Jedyny wyjątek wystąpił w przypadku oligomeru zawierającego ScdA w jednej nici i dU zlokalizowanego 4 pz w kierunku końca 3' w komplementarnej nici (oznaczonego jako ScdA/dU-4) jako pojedynczy przypadek delecji 22 pz w miejscu ScdA. Ponadto, warto zauważyć, że pozycja dU+4 powodowała wiele istotnych trudności podczas naprawy dla komórek eukariotycznych, tj. zaburzone wydłużanie nici przez polimerazy, brak ligacji i degradację nici w przypadku eksperymentów z wykorzystaniem CE. Wydawać by się mogło, że w przypadku żywego organizmu, takiego jak omawiany model bakterii *E. coli* dU+4 nie jest problematyczne. Wykazano, iż najbardziej mutagenne warianty wśród badanych dupleksów to te oznaczone jako dU0, dU-1 i dU+1. Obserwacja najwyższego potencjału mutagennego dla CDL zawierających dU zlokalizowane 1 pz

w kierunku 5'-końca nici od cdA jest zgodna z wcześniejszymi badaniami [66,86,87,117,118,214,215]. Najczęstszą mutacją w przypadku ScdA/dU+1 była delecja dU::G (30,8%), zaś drugą najczęstszą mutacją była tranzycja U::G → T::A. Dla wariantu RcdA/dU+1 zaobserwowano odwrotne wyniki, gdzie najczęstszą mutacją była tranzycja U::G → T::A (36,4%), podczas gdy delecja pary dU::G była drugą najczęstszą mutacją w obszarze sekwencji zawierającej uszkodzenie zespolone. Dla wariantu ScdA/dU-1 najczęstszą mutację stanowiła delecja pary dU::G. W przypadku RcdA/dU-1 delecje dU::G i C::G zlokalizowane w pozycji +1 względem cdPu wykazywały jednakową częstość mutacji (22,2%). Zmiany zlokalizowane naprzeciwko siebie w obrębie CDL (pozycja dU0) powodowały delecje głównie w miejscu uszkodzenia oraz w pozycjach +1 i +2. Co ciekawe, zaobserwowano również delecje w odległości 4-5 pz od cdA w przypadku obu izomerów dla cdA/dU+1 [220]. Może to sugerować aktywność systemu naprawczego typu NER opartego o aktywność kompleksu UvrABC, który nacina nić DNA w odległości ok. 4 pz od uszkodzenia [221-224]. Do tej pory potwierdzono aktywność UvrABC jedynie względem ScdA i ScdG [70,225,226]. Częstość mutacji analizowana była w porównaniu z DNA zawierającym wyjściowo pojedyncze kontrolne uszkodzenie (dU). Ponadto dokonano oceny wpływu odległości między uszkodzeniami oraz diastereoizomerów cdA na efekt naprawy DNA przez komórki bakteryjne. Przedstawione wyniki wskazują, że CDL zawierające cdA zlokalizowane 0-1 pz od drugiego uszkodzenia (miejsca AP) są wysoce mutagenne dla *E. coli*. Uzyskane wyniki są zbieżne z obserwacjami dokonanymi dla ekstraktów uzyskanych z komórek eukariotycznych.

## 6. Podsumowanie wyników i wnioski

Każda komórka musi posiadać skuteczne systemy naprawcze, aby przeciwdziałać licznym uszkodzeniom DNA powstającym w wyniku działania czynników endo- i egzogennych, np. promieniowania, metabolitów, zanieczyszczeń [227]. W komórkach człowieka pojawia się około  $3 \cdot 10^{17}$  uszkodzeń DNA na godzinę [74]. Dlatego też dla przetrwania całego organizmu kluczowe jest rozpoznanie i naprawa powstających uszkodzeń. Uszkodzenia zespolone DNA są szczególnym ich rodzajem definiowanym jako obecność dwóch lub więcej zmian w obrębie 1-2 skrętów helisy DNA. Ten rodzaj uszkodzeń występuje pośrednio w efekcie oddziaływania promieniowania jonizującego na materiał genetyczny. Poziom RcdA i ScdA u ludzi mieści się w zakresie od 0,01 do 0,1 uszkodzeń na  $10^6$  nukleozydów DNA, podczas gdy dla RcdG i ScdG jest to odpowiednio 2 i 10 uszkodzeń na  $10^6$  nukleozydów DNA [79,211]. CdPu ze względu na swoją złożoną strukturę wpływają na strukturę przestrzenną DNA [66]. W konsekwencji, inne zmiany w obrębie CDL są mniej podatne na działanie białek naprawczych [66,74]. Wyniki przedstawione w niniejszej pracy uzupełniają wcześniejsze badania w tej dziedzinie i pokazują, że proces naprawy CDL wymaga dalszych, szczegółowych badań.

Szczegółowa wiedza o tym, jak rozkład uszkodzeń na nici DNA w obrębie CDL wpływa na efektywność procesów naprawczych, może mieć dalsze zastosowanie w radioterapii, np. przy określaniu terapeutycznej dawki promieniowania. CdPu są naprawiane głównie przez system NER, który jest nieaktywny w mitochondriach lub posiada defekty jak w przypadku trichotiodystrofii, syndromu Cockayne'a i skóry pergaminowej (*Xeroderma Pigmentosum*) [89,126]. Nagromadzenie cdPu, które obserwowane jest u pacjentów z XP może być przyczyną rozwoju i nasilenia objawów wynikających z defektu systemu NER [76,228]. Diastereoizomer (5'R) jest naprawiany wydajniej niż (5'S) zarówno w przypadku 5',8-cyklo-2'-deoksyadenozyny (cdA) jak i 5',8-cyklo-2'-deoksyguanozyny (cdG) wskazując na biologiczne znaczenie stereochemii cdPu [229]. Diastereoizomery (5'S) i (5'R) cdPu wpływają na system naprawczy BER w odmienny sposób, przy czym przyjmuje się, że nie stanowią one substratu dla tego systemu naprawczego ze względu na brak specyficznych glikozylaz wykrywających te struktury [73]. CdPu wpływają na geometrię helisy DNA w kierunku 5'-końca od zmiany i hamują aktywność systemu BER [67,68].

Badania pokazują, że w klastrach zawierających ScdA i miejsca AP naprawa jest hamowana dla miejsc AP zlokalizowanych w nici dsDNA bliżej niż osiem zasad nukleotydowych od ScdA [66]. Aktywność enzymów zaangażowanych w pierwsze dwa etapy etapów szlaku BER (UDG i APE1) jest zmniejszona dla CDL zawierającego cdA [87]. Aby zrozumieć potencjalne biologiczne konsekwencje obecności CDL w genomie, konieczne jest szczegółowe poznanie przebiegu naprawy CDL w komórkach o fizjologicznym poziomie enzymów naprawczych.



Mitochondrialna naprawa zespolonych uszkodzeń DNA zawierających cdPu nie jest dobrze poznana. Ze względu na techniczne trudności w badaniu wyłącznie mitochondrialnych frakcji białkowych wiele pytań dotyczących ich funkcji pozostaje bez odpowiedzi. Z drugiej strony, naprawa mtDNA ma kluczowe znaczenie dla metabolizmu energetycznego i przeżycia komórek. CdPu wpływają na zmiany struktury DNA, a ich obecność w mtDNA może prowadzić do upośledzenia mechanizmów molekularnych związanych z zachowaniem niezmienionej informacji genetycznej [66].

Badania przedstawione w ramach niniejszej pracy wykorzystują oligonukleotydy stanowiące model uszkodzeń zespolonych DNA. Badany układ uszkodzeń zawierał dU (będący prekursorem miejsca AP w eksperymentach wykorzystujących ekstrakty komórek eukariotycznych) oraz cdPu (ScdA/RcdA lub ScdG/RcdG) oddalonych od siebie w zakresie od 0 do 10 pz i zlokalizowanych w tej samej lub w przeciwległych niciach badanego modelu dsDNA. Do badań wykorzystano odpowiednie frakcje białkowe zawarte w ekstraktach komórkowych trzech linii komórkowych (xrs5, BJ, XPC).

Przeprowadzone przeze mnie badania wykazały wyraźne różnice w aktywności białek naprawczych w przypadku obecności diastereoizomerów (5'S) i (5'R) badanych uszkodzeń cdPu znajdujących się w obrębie CDL. Poszczególne etapy naprawy obserwowanej dla miejsca AP reprezentowane przez produkty reakcji enzymatycznych pozwoliły mi określić wpływ rodzaju cdPu, diastereoizomerów (5'S) i (5'R) oraz rozmieszczenia uszkodzeń na proces naprawy miejsca AP. Ze względu na niewielką liczbę badań nad białkami mitochondrialnymi zaangażowanymi w mtBER w kontekście uszkodzeń zespolonych DNA konieczne są dalsze, bardziej szczegółowe badania. Pomimo uzyskanych wyników, pozostaje niewyjaśnione, dlaczego obecność określonego izomeru poszczególnych cdPu w pewnych odległościach od innej zmiany w CDL ułatwia/umożliwia działanie enzymów naprawczych, zaś inne względne pozycje uszkodzeń w klastrze uniemożliwiają prawidłowy przebieg procesu naprawy DNA.

W ramach realizacji prac badawczych zaprezentowanych w niniejszej rozprawie doktorskiej:

- o Ustaliłam wyjściowy poziom aktywności enzymatycznej poszczególnych etapów procesu naprawy przez wycięcie zasady BER dla ekstraktów jądrowych komórek linii xrs5, BJ i XPC do dalszych eksperymentów obejmujących ekstrakty cytoplazmatyczne i mitochondrialne [86,118]. Wykazałam, iż wydajność nacięcia naprawianej nici (zawierającej miejsce AP) jest niższa, gdy w dsDNA obecne jest RcdA lub RcdG w porównaniu z ScdA lub ScdG. Wykazałam, iż aktywność endonukleaz jest porównywalna lub wyższa w obecności uszkodzeń zespolonych zawierających cdPu i miejsce AP niż dla kontrolnego oligonukleotydu zawierającego pojedyncze uszkodzenie (miejsce AP). W przypadku gdy przerwa o długości 1 nukleotydu wynikająca z trawienia miejsca AP przez endonukleazy znajduje się naprzeciwko cdPu (pozycja dU0) lub 1 pz w kierunku końca

- 5' nici (pozycja dU+1) aktywność polimeraz jest zablokowana, co skutkuje brakiem późniejszej naprawy uszkodzenia. Naprawa nici DNA zawierającej miejsce AP zachodzi efektywniej w obecności diastereoizomerów (5'S) niż (5'R) obu cdPu zlokalizowanych na przeciwległej nici DNA. Wykazałam, iż naprawa nici (końcowy etap procesu naprawy BER—odtworzenie poprawnej sekwencji zasad w wyniku ligacji fragmentów nici) jest utrudniona dla uszkodzeń znajdujących się  $\leq 10$  pz po stronie 5'-końca cdPu w porównaniu do tych zlokalizowanych  $\leq 10$  par zasad po stronie 3'-końca cdPu;
- Wykazałam, że białka zaangażowane w naprawę zespolonych uszkodzeń DNA są aktywne w ekstraktach cytoplazmatycznych, czyli bezpośrednio po ich biosyntezie a jeszcze przed ich translokacją do jądra lub mitochondrium. Wykazałam, iż całkowita wydajność naprawy jest niższa w ekstrakcie cytoplazmatycznym niż w jądrowym (niektóre białka naprawcze zyskują pełną aktywność dopiero po translokacji do miejsca docelowego działania np. jądra komórki). Wykazałam, iż zarówno w cytoplazmie jak i w mitochondriach skuteczna naprawa dsDNA zawierającego dwuniciowy model CDL zależy od pozycji i odległości pomiędzy cdPu a miejscem AP. Dokonałam oceny ogólnych trendów całkowitej aktywności białek naprawczych w cytoplazmie i wykazałam ich zbieżność z trendami opisanymi dla ekstraktów jądrowych komórek linii xrs5, BJ i XPC. Wykazałam różnice w ogólnej aktywności białek zaangażowanych w naprawę dsDNA (zawierających jedno- i dwuniciowe CDL obejmujące dwa uszkodzenia w obrębie CDL (cdPu i miejsce AP) oddalone do 7 zasad w kierunku 3' i 5' końca nici) pomiędzy izomerami (5'S) i (5'R) oraz pomiędzy cdA i cdG w ekstraktach cytoplazmatycznych linii komórkowych xrs5, BJ i XPC i ekstraktach mitochondrialnych linii xrs5. CdPu oraz miejsce AP zlokalizowane w przeciwległych niciach DNA naprzeciwko siebie lub oddalone o 1 pz (pozycja dU0 lub dU+1) w kierunku 5'-końca nici DNA wykazują hamujący wpływ na aktywność endonukleaz i polimeraz w eukariotycznych ekstraktach komórkowych komórek linii xrs5, BJ i XPC. Ponadto, zaobserwowałam wzmożoną degradację nici DNA badanych oligonukleotydów, w których uszkodzenia były zlokalizowane +1 pz od cdA w CDL (pozycja dU+1), co może wskazywać na konkurencyjne działanie białek biorących udział w naprawie i degradacji DNA w ekstraktach cytoplazmatycznych linii komórkowych xrs5, BJ i XPC;
  - Wykazałam zgodność trendów całkowitej aktywności enzymatycznej poszczególnych etapów naprawy systemu mtBER z trendami obserwowanymi w przypadku ekstraktów cytoplazmatycznych i jądrowych linii komórkowej xrs5. Wykazałam, że skuteczność początkowych etapów systemu naprawczego mtBER (rozcięcie i wydłużenie nici) zależy od odległości i kierunku między miejscem AP a cdPu w obrębie dwuniciowego CDL oraz od rodzaju i diastereomeru cdPu. Wykazałam, iż badane etapy mtBER przebiegały z niższą

- wydajnością w przypadku miejsc AP zlokalizowanych po stronie 5'-końca cdPu, w porównaniu z tymi po stronie 3'-końca cdPu. Wykazałam, iż całkowita aktywność endonukleolityczna ekstraktu mitochondrialnego komórek linii xrs5 była wyższa w przypadku obecności cdPu w CDL w porównaniu z pojedynczym uszkodzeniem (miejscem AP), a także w przypadku oligonukleotydów zawierających RcdA lub ScdG niż ScdA lub RcdG. Wykazałam, iż proces dobudowania nowych nukleotydów przez polimerazy w mtBER został zahamowany w przypadku naprawy miejsc AP zlokalizowanych w kierunku 5'-końca od cdPu, podczas gdy w przypadku naprawy miejsc AP zlokalizowanych w kierunku 3'-końca od cdPu został wzmocniony w porównaniu z pojedynczym uszkodzeniem (miejscem AP);
- Wykazałam, iż skutki uszkodzeń zespolonych zawierających cdA i dU umiejscowionych naprzeciwko siebie lub oddalonych o 1 pz zlokalizowanych w przeciwległych niciach DNA są zbieżne w przypadku eukariotycznych modeli *in vitro* oraz modelu bakteryjnego. Wykorzystując model bakteryjny *Escherichia coli* wykazałam, iż cdA zlokalizowane 0 lub 1 pz od dU w przeciwległej nici DNA w obrębie CDL prowadzi do powstania licznych mutacji. Obecność uszkodzeń zespolonych zawierających ScdA i dU w pozycji +1 powoduje większą ilość mutacji niż w przypadku RcdA, szczególnie delekcji  $\Delta dU:::G$ . Wykazałam, iż odległość 4 pz między cdA i dU w klastrze uszkodzeń DNA zapewnia wystarczającą „przestrzeń” do prawidłowego działania enzymów naprawczych. Uszkodzenia zostały usunięte z sekwencji oligonukleotydu i odzyskano prawidłową sekwencję zasad.

# Część doświadczalna

## 7. Materiał badawczy

### 7.1. Oligonukleotydy

Oligonukleotydy (40-mery) wykorzystane jako substraty do opisanych badań zostały zsyntetyzowane i oczyszczone w Centrum Badań Molekularnych i Makromolekularnych Polskiej Akademii Nauk w Łodzi przy użyciu syntezy Geneworld (K&A Laborgeraete GbR, Schaaflheim, Niemcy). Fosforoamidy nukleotydów zakupiono z ChemGenes Corporation (Wilmington, MA, USA). Fosforoamidowe pochodne cdPu zostały zsyntetyzowane zgodnie z procedurą opisaną przez Romieu et al. przez Prof. dr hab. n. farm. Bolesława Karwowskiego [230]. Oligonukleotydy zostały oczyszczone przy pomocy HPLC (kolumna C-18, Varian analytics z detekcją UV ( $\lambda = 260$  nm), Phenomenex (Synergi 4  $\mu\text{m}$  Fusion-RP 80Å, 250  $\times$  4.6 mm)). Sekwencje uzyskanych dwuniciowych oligonukleotydów zawierających uszkodzenia zespolone składające się z 2'-deoksyurydyny (dU) i 5',8-cyclo-2'-deoksyuryny (cdPu) przedstawia Tabela 7. Każdej z reszt dU przypisano numer opisujący jej odległość w parach zasad od cdPu. Reszta dU położona naprzeciwko cdPu opisana została jako dU0, zaś odległości od 1 do 10 pz opisane zostały odpowiednio jako dU-1/dU+1 aż do dU-10/dU+10. W przypadku modelu dwuniciowych uszkodzeń zespolonych (oznaczonych jako [ds]), numery dodatnie opisują dU położone w kierunku 5' końca przeciwległej nici, zaś numery ujemne opisują dU położone w kierunku 3' końca przeciwległej nici. W przypadku modelu jednoniciowych uszkodzeń zespolonych (oznaczonych jako [ss]), numery dodatnie opisują dU położone w kierunku 3' końca tej samej nici, zaś numery ujemne opisują dU położone w kierunku 5' końca tej samej nici. Kontrola 1 zawierała pojedyncze uszkodzenie (dU) w jednej nici, zaś Kontrole 2 i 3 zawierały pojedyncze uszkodzenie (cdPu) przy czym dla Kontroli 2 obserwowano nic zawierającą cdPu, a dla Kontroli 3 obserwowano nic natywną (nie zawierającą uszkodzeń). Wcześniejsze badania wykazały, iż temperatura mięknięcia badanych dupleksów utrzymuje się powyżej 70°C oraz iż dupleksy te są stabilne pod wpływem działania wybranych enzymów i jądrowych ekstraktów linii komórkowych xrs5, BJ i XPC co potwierdza stabilność oligonukleotydów w warunkach eksperymentu [74,86,118]. Dokonano również analizy stabilności dwuniciowych, matrycowych <sup>32</sup>P-oligonukleotydów pod wpływem ekstraktów cytoplazmatycznych i mitochondrialnych badanych linii komórkowych (Publikacja II i III).

**Tabela 7.** Lista sekwencji dwuniciowych oligonukleotydów wykorzystanych do badań z oznaczonymi pozycjami 2'-deoksyurydyny (dU) i 5',8-cylo-2'-deoksypuryn (cdPu).

Oligonukleotydy		Sekwencje
[ds]	Kontrola 1	5' -CTCTTGT CAGGAATATTGTCT <b>U</b> CTATGCTCCCACCAAAGGC-3' 3' -GAGAACAGTCCTTATAACAGAGATACGAGGGTGGTTTCCG-5'
	Kontrola 2/3	5' -GCCTTTGGTGGGAGCATAG <b>X</b> GACAATATTCCTGACAAGAG-3' 3' -CGGAAACCACCTCGTATCTCTGTTATAAGGACTGTTCTC-5'
	dU-10	5' -CTCTTGT CAG <b>U</b> AATATTGTCTCTATGCTCCCACCAAAGGC-3' 3' -GAGAACAGTCCTTATAACAG <b>X</b> GATACGAGGGTGGTTTCCG-5'
	dU-7	5' -CTCTTGT CAGGA <b>U</b> ATTGTCTCTATGCTCCCACCAAAGGC-3' 3' -GAGAACAGTCCTTATAACAG <b>X</b> GATACGAGGGTGGTTTCCG-5'
	dU-4	5' -CTCTTGT CAGGAATAT <b>U</b> GTCTCTATGCTCCCACCAAAGGC-3' 3' -GAGAACAGTCCTTATAACAG <b>X</b> GATACGAGGGTGGTTTCCG-5'
	dU-1	5' -CTCTTGT CAGGAATATTGT <b>U</b> TCTATGCTCCCACCAAAGGC-3' 3' -GAGAACAGTCCTTATAACAG <b>X</b> GATACGAGGGTGGTTTCCG-5'
	dU0	5' -CTCTTGT CAGGAATATTGTCT <b>U</b> CTATGCTCCCACCAAAGGC-3' 3' -GAGAACAGTCCTTATAACAG <b>X</b> GATACGAGGGTGGTTTCCG-5'
	dU+1	5' -CTCTTGT CAGGAATATTGTCT <b>U</b> TATGCTCCCACCAAAGGC-3' 3' -GAGAACAGTCCTTATAACAG <b>X</b> GATACGAGGGTGGTTTCCG-5'
	dU+4	5' -CTCTTGT CAGGAATATTGTCTCTA <b>U</b> GCTCCCACCAAAGGC-3' 3' -GAGAACAGTCCTTATAACAG <b>X</b> GATACGAGGGTGGTTTCCG-5'
	dU+7	5' -CTCTTGT CAGGAATATTGTCTCTATGC <b>U</b> CCCACCAAAGGC-3' 3' -GAGAACAGTCCTTATAACAG <b>X</b> GATACGAGGGTGGTTTCCG-5'
dU+10	5' -CTCTTGT CAGGAATATTGTCTCTATGCTCC <b>U</b> ACCAAAGGC-3' 3' -GAGAACAGTCCTTATAACAG <b>X</b> GATACGAGGGTGGTTTCCG-5'	
[ss]	dU-5	5' -CTCTTGT CAGGAATATTGTCTCT <b>X</b> TGCTCCCACCAAAGGC-3' 3' -GAGAACAGTCCTTATAACAGAGATACGAGGGTGGTTTCCG-5'
	dU-5/+5	5' -CTCTTGT CAGGAATATTGTCTCT <b>X</b> TGCT <b>U</b> CCACCAAAGGC-3' 3' -GAGAACAGTCCTTATAACAGAGATACGAGGGTGGTTTCCG-5'
	dU+5	5' -CTCTTGT CAGGAATATTGTCTCT <b>X</b> TGCT <b>U</b> CCACCAAAGGC-3' 3' -GAGAACAGTCCTTATAACAGAGATACGAGGGTGGTTTCCG-5'

U—określa położenie 2'-deoksyurydyny; X— określa położenie (5'S) lub (5'R) 5',8-cylo-2'-deoksypuryn; [ds]—dwuniciowe uszkodzenia zespolone (uszkodzenia położone na dwóch niciach); [ss]—jednociowe uszkodzenia zespolone (uszkodzenia położone na jednej nici).

## 7.2. Linie komórkowe

Hodowle komórkowe eukariotycznych linii komórkowych prowadzone były przez dr n. chem. Julię Kaźmierczak-Barańską w Zakładzie Bromatologii Uniwersytetu Medycznego w Łodzi zgodnie z procedurą i w warunkach opisanych w Publikacji II.

Linia komórkowa xrs5 (CRL-2348, ATCC) to linia komórek epitelialnych wrażliwych na promieniowanie X, pochodzących z jajnika chomika chińskiego. Dodatkowo, pozbawiona jest białka Ku80, co w przypadku przeprowadzonych badań pozwala uniknąć wiązania się tego białka do końców liniowego DNA lub w miejscu powstałego jednociowego pęknięcia nici (SSB).

Linia komórkowa BJ (CRL-2522, ATCC) to pierwotna linia ludzkich normalnych fibroblastów wyprowadzona z tkanki napletka noworodka. W przeprowadzonych badaniach została wykorzystana jako linia kontrolna posiadająca sprawne systemy naprawcze.

Linia komórkowa XPC (GM17420) to linia ludzkich fibroblastów pozyskanych od pacjenta cierpiącego na skórę pergaminową typu C (*Xeroderma Pigmentosum*). W przeprowadzonych badaniach linia ta wykorzystana została jako model komórek z uszkodzonym systemem naprawczym NER. Komórki zakupiono z Coriell Institute for Medical Research (Camden, New Jersey, USA). Kliniczne, komórkowe i molekularne dane dotyczące linii komórkowej dostępne są na życzenie u sprzedawcy. W porównaniu z normalnymi ludzkimi fibroblastami (linia BJ) komórki XP są nadwrażliwe na promieniowanie UV i/lub czynniki chemiczne, co skutkuje m.in. zwiększoną częstotliwością pęknięć chromosomów [98]. Ze względu na upośledzenie procesów naprawczych uszkodzenie utrzymuje się w komórce znacznie dłużej [93,231]. Dokonałam analizy ilościowej i oceny jakościowej pozyskanych ekstraktów komórkowych pod kątem całkowitej aktywności białek biorących udział w naprawie DNA poprzez wycięcie zasady (Publikacja II i III). Analiza potwierdziła ogólną aktywność endonukleaz, polimeraz i ligaz w przygotowanych ekstraktów komórkowych linii xrs5, BJ i XPC.

## 8. Metody badawcze

### 8.1. Analiza jednoniciowych oligonukleotydów

Analizy jakościowej oligonukleotydów dokonano poprzez oznaczenie masy cząsteczkowej oligonukleotydów na kwadrupolowym hybrydowym spektrometrze masowym z analizatorem czasu przelotu i jonizacją próbek Waters Synapt G2-Si HDMS. Analizy wykonane zostały w Centrum Badań Molekularnych i Makromolekularnych Polskiej Akademii Nauk w Łodzi. Obliczone i wykazane masy cząsteczkowe jednoniciowych oligonukleotydów przedstawiono w Tabeli 8. Analiza ilościowa (pomiar stężenia i obliczenie współczynników ekstynkcji oczyszczonych dwuniciowych oligonukleotydów) przeprowadzona została w ramach wstępnych badań mających na celu określenie poziomu aktywności enzymatycznej dla badanych procesów naprawczych na podstawie ekstraktów jądrowych linii xrs5, BJ i XPC celem dokonania późniejszej analizy porównawczej [86,118].

**Tabela 8.** Obliczone i wykazane masy cząsteczkowe badanych jednoniciowych oligonukleotydów.

<b>Oligonukleotyd</b>	<b>Masa obliczona</b>	<b>Masa wykazana</b>
Kontrola 1 (nić zawierająca dU)	12167,90	12168,25
Kontrola 1 (nić natywna)	12181,98	12182,42
Mtx-ScdA	12407,00	12408,30
Mtx-RcdA	12407,00	12407,30
Mtx-ScdG	12423,00	12423,30
Mtx-RcdG	12423,00	12424,00
dU(-5)-ScdA	12165,90	12166,50
dU(-5/+5)-ScdA	12166,89	12167,20
dU(+5)-ScdA	12180,90	12181,54

### 8.2. Przygotowanie oligonukleotydów do badań systemów naprawczych z wykorzystaniem eukariotycznych ekstraktów komórkowych

Przygotowanie dupleksów DNA zawierających cdPu w jednej nici oraz miejsce AP w nici komplementarnej (nić znakowana na 5'-końcu) wykonano zgodnie ze schematem przedstawionym na Rycinie 8A. Pierwszy etap znakowania izotopowego na 5'-końcu jednoniciowych 40-merów przeprowadzono przy użyciu kinazy polinukleotydowej T4 oraz [ $\gamma$ - $^{32}$ P]ATP, po czym  $^{32}$ P-oligonukleotydy poddano hybrydyzacji z odpowiednią nicią komplementarną. Dwuniciowe  $^{32}$ P-oligonukleotydy zawierające miejsce AP uzyskano w wyniku reakcji enzymatycznych z glikozylazą UDG, która rozpoznaje dU w sekwencji DNA i katalizuje jego usunięcie z nici. Utworzenie miejsc AP zostało zweryfikowane poprzez dodatkowe trawienie  $^{32}$ P-oligonukleotydów enzymem hAPE1 w celu wytworzenia 1 nukleotydowej przerwy w nici (SSB), co obserwowano na żelu poliakrylamidowym PAGE jako krótsze fragmenty DNA. Każdy etap przygotowania ds-oligonukleotydów został zweryfikowany poprzez ocenę skuteczności reakcji i czystości jej produktów na żelach

poliakrylamidowych PAGE. Skuteczne znakowanie końca 5'-<sup>32</sup>P jednoniciowych oligonukleotydów i utworzenie dupleksów potwierdzono na nie denaturujących żelach poliakrylamidowych. Czystość dwuniciowych <sup>32</sup>P-oligonukleotydów zawierających miejsca AP oraz wydajne tworzenie miejsc AP zweryfikowano na denaturujących żelach poliakrylamidowych PAGE. Dokładną charakterystykę zastosowanych metod badawczych, odczynników, aparatury i warunków reakcji oraz obrazy żeli poliakrylamidowych przedstawiono w Publikacjach II i III.

### *8.3. Przygotowanie ekstraktów komórkowych*

Ekstrakty jądrowe (NE) i ekstrakty cytoplazmatyczne (CE) zostały przygotowane z komórek w fazie wykładniczej wzrostu trzech linii komórek eukariotycznych: xrs5, BJ oraz XPC w Zakładzie Bromatologii Uniwersytetu Medycznego w Łodzi przez dr n. chem. Julię Kaźmierczak-Barańską. Ekstrakcję frakcji białek jądrowych i cytoplazmatycznych oraz ich analizę ilościową przeprowadzono zgodnie z procedurą przedstawioną w Publikacji II.

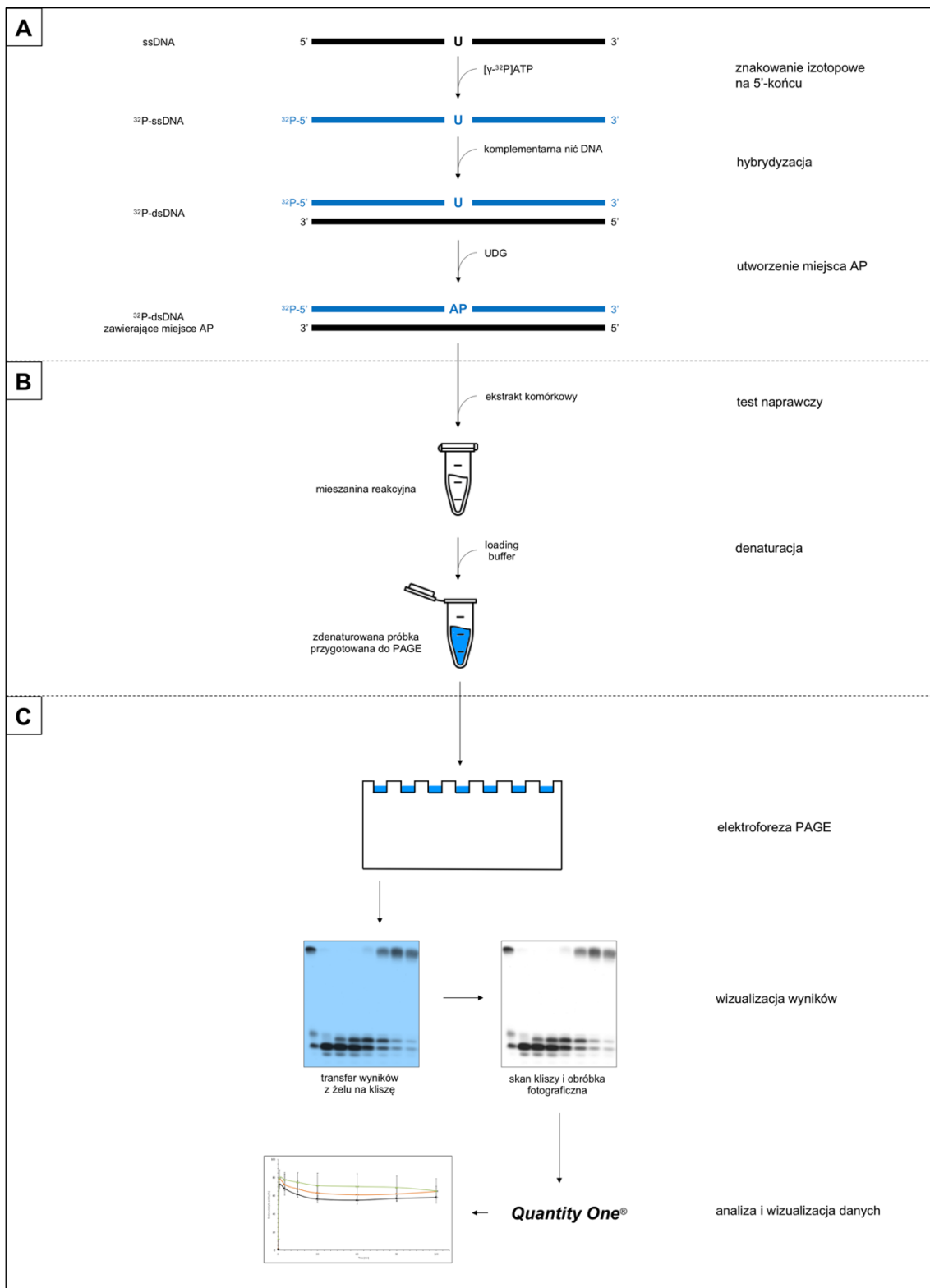
Ekstrakty mitochondrialne (ME) zostały przygotowane z komórek linii xrs5 w fazie wykładniczej wzrostu w Zakładzie Bromatologii Uniwersytetu Medycznego w Łodzi przez dr n. chem. Julię Kaźmierczak-Barańską. Ekstrakcję całych mitochondriów, przygotowanie ekstraktu frakcji białek mitochondrialnych oraz ich analizę ilościową przeprowadzono zgodnie z procedurą przedstawioną w Publikacji III.

### *8.4. Analiza aktywności enzymatycznej białek odpowiedzialnych za poszczególne etapy naprawy uszkodzeń zespolonych DNA zawierających 5',8-cyko-2'-deoksypuryny*

Celem dokonania analizy aktywności enzymatycznej białek odpowiedzialnych za poszczególne etapy naprawy uszkodzeń zespolonych DNA przeprowadzono szereg reakcji enzymatycznych śledząc ich przebieg w czasie do 120 min dla CE (punkty dokonywania pomiarów: 0, 1, 5, 15, 30, 60, 90 i 120 min) i do 6 h dla ME (punkty dokonywania pomiarów: 0, 0,5 i 6 h). Dupleksy <sup>32</sup>P-oligonukleotydów inkubowano z frakcjami białkowymi poszczególnych ekstraktów komórkowych (10 µg NE, 50 µg CE lub 20 µg ME). Ilość poszczególnych ekstraktów komórkowych wykorzystana do badań została zoptymalizowana eksperymentalnie. Produkty reakcji enzymatycznych analizowano na denaturujących żelach poliakrylamidowych PAGE i wizualizowano przy pomocy autoradiografii (Rycina 8B i 8C). Wszystkie eksperymenty przeprowadzono trzykrotnie, aby zapewnić spójność i wiarygodność wyników. Analizy ilościowej otrzymanych wyników dokonano na podstawie uzyskanych radiogramów przy pomocy oprogramowania Quantity One. Wydajność poszczególnych etapów systemu naprawczego w czasie (aktywność endonukleaz, polimeraz, egzonukleaz i całkowitej naprawy) analizowano na podstawie intensywności prążków widocznych na autoradiogramach. Poszczególne aktywności enzymatyczne wyrażono jako procent całkowitej intensywności wszystkich



prążków obecnych na radiogramie dla jednej próbki (każda próbka naniesiona do 1 studzienki żelu). Ponieważ aktywność naprawcza różnych partii ekstraktów komórkowych różniła się nieznacznie, otrzymane wyniki każdorazowo porównano z Kontrolą 1 (zawierającą miejsce AP jako pojedyncze uszkodzenie). Dokładną charakterystykę zastosowanych metod badawczych, odczynników, aparatury i warunków reakcji oraz obrazy żeli poliakrylamidowych przedstawiono w Publikacjach II i III.



**Rycina 8. Procedura badawcza określenia aktywności enzymatycznej białek odpowiedzialnych za poszczególne etapy naprawy uszkodzeń zespolonych DNA zawierających 5',8-cyklo-2'-deoksyuryny.**

**(A)** Przygotowanie oligonukleotydów zawierających miejsce AP. U—reprezentuje położenie 2'-deoksyurydyny (dU) będącej prekursorem miejsca AP; <sup>32</sup>P—reprezentuje koniec nici DNA znakowany izotopowo przy użyciu [γ-<sup>32</sup>P]ATP; AP—reprezentuje miejsce AP utworzone w wyniku hydrolizy wiązania N-glikozydowego w obrębie dU katalizowanej przez glikozylazę uracylu-DNA (UDG); niebieski kolor—reprezentuje nić dsDNA znakowaną izotopowo (obserwowaną na autoradiogramie); czarny kolor—reprezentuje nić dsDNA nie znakowaną izotopowo (nie widoczną na autoradiogramie). **(B)** Eksperyment naprawczy. **(C)** Wizualizacja wyników i analiza danych.

### 8.5. Przygotowanie oligonukleotydów do badań systemów naprawczych z wykorzystaniem modelu prokariotycznego

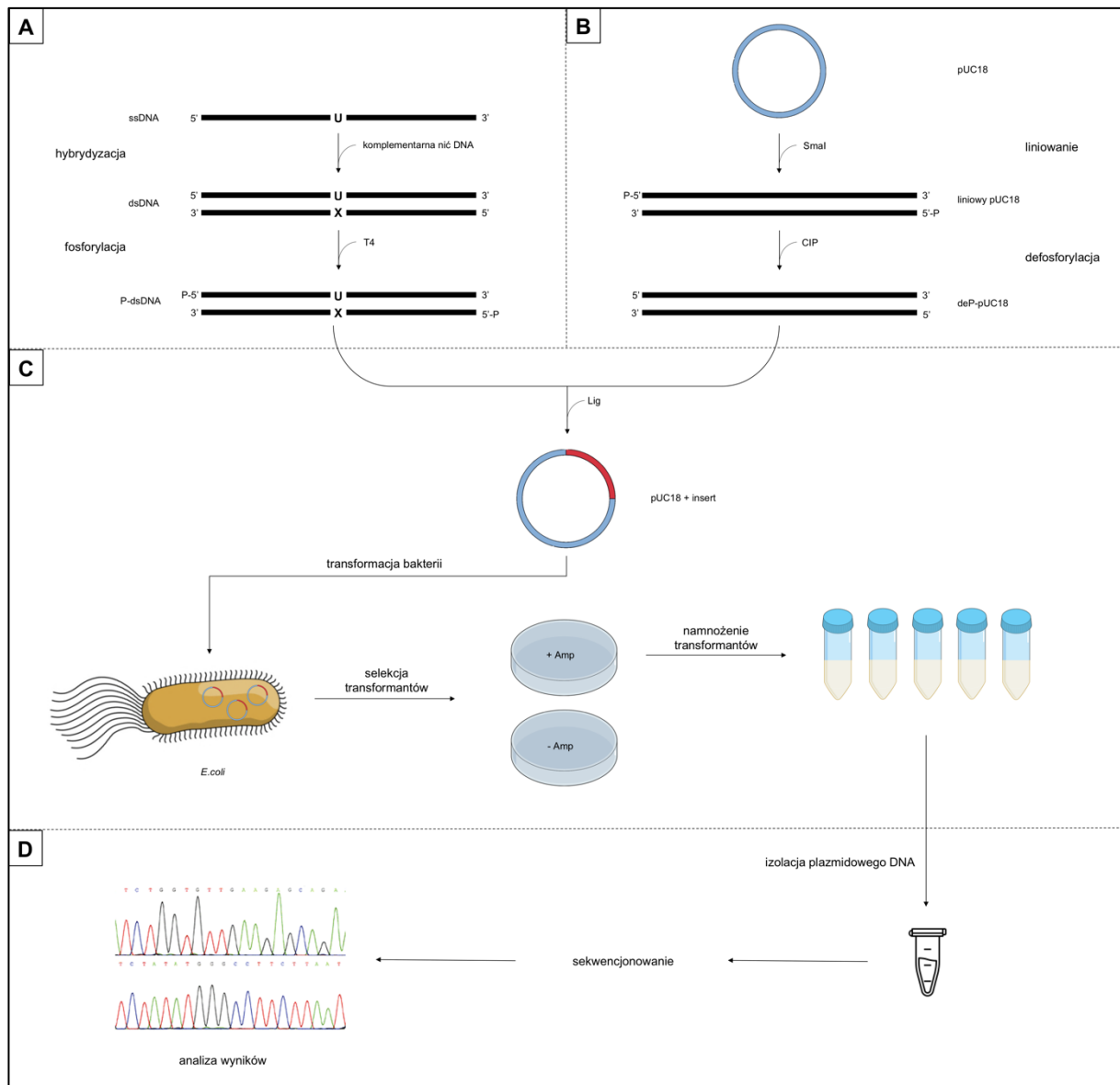
Przygotowanie dupleksów DNA (insertów) zawierających cdPu w jednej nici oraz dU w nici komplementarnej wykonano zgodnie ze schematem przedstawionym na Rycinie 9A. Jednonicowe, nie znakowane izotopowo oligonukleotydy hybrydyzowano z odpowiednią nicią komplementarną. Dwuniciowe oligonukleotydy fosforylowano na 5'-końcu przy pomocy kinazy polinukleotydowej T4 i oczyszczano z pozostałości białkowych. Kontrolne oligonukleotydy zawierały sekwencję natywną (nie posiadającą uszkodzeń), pojedynczą resztę dU (Kontrola 1) i pojedyncze cdA (diastereomery (5'S) i (5'R), oznaczone odpowiednio jako Kontrola 2 i 3).

Przygotowanie plazmidu zawierającego badane uszkodzenia zespolone DNA (5',8-cyklo-2'-deoksyadenozyna i dU) przeprowadzono zgodnie ze schematem przedstawionym na Rycinie 9B. Plazmid pUC18 liniowano za pomocą SmaI (rozpoznawane miejsce restrykcyjne: CCC/GGG, w obrębie polilinkera). Następnie, liniowy plazmid defosforylowano w reakcji katalizowanej przez cielącą jelitową fosfatazę alkaliczną CIP. Liniowy, defosforylowany plazmid oczyszczono i ligowano z przygotowanymi ds-oligonukleotydami. Dokładną charakterystykę zastosowanych metod badawczych, odczynników, aparatury i warunków reakcji przedstawiono w Publikacji IV.

### 8.6. Analiza mutagenności badanych uszkodzeń zespolonych zawierających 5',8-cyklo-2'-deoksyadenozynę

Elektrokompetentne komórki bakteryjne *E. coli* poddawano transformacji na drodze elektroporacji (1,8 mV ze stałą czasową ~ 5 ms) wprowadzając do komórki bakteryjnej plazmidy pUC18 zawierające odpowiedni insert zawierający poszczególne układy uszkodzeń zespolonych DNA. Transformacje dla wszystkich badanych insertów zostały wykonane trzykrotnie. Uzyskane transformanty selekcjonowano stosując płytki agarowe LB z dodatkiem ampicyliny. Pojedyncze kolonie wyhodowane na płytkach agarowych LB pobrano losowo do namnożenia (Rycina 9C). Dzięki temu namnożone transformanty zachowały jednorodność genetyczną pozwalającą na dalszą analizę. Przeprowadzono izolację plazmidowego DNA z uzyskanych transformantów oraz dokonano analizy ilościowej i jakościowej otrzymanego materiału. Wyniki sekwencjonowania plazmidowego DNA wyizolowanego z bakterii uzyskano komercyjnie w firmie Genomed S.A. Wyniki analizowano przy użyciu narzędzia online Needleman-Wunsch Global Alignment dla sekwencji nukleotydowych oraz programu FinchTV (Rycina 9D). Częstość wszystkich mutacji obliczono dzieląc liczbę mutacji znalezionych w oligonukleotydach przez całkowitą liczbę zsekwencjonowanych oligonukleotydów. Częstość poszczególnych rodzajów mutacji obliczono dzieląc liczbę wystąpień mutacji przez całkowitą liczbę zmutowanych sekwencji oligonukleotydowych.

Dokładną charakterystykę zastosowanych metod badawczych, odczynników, aparatury, warunków reakcji i hodowli bakteryjnej przedstawiono w Publikacji IV.



**Rycina 9. Procedura badawcza określenia mutagenności badanych uszkodzeń zespolonych zawierających 5',8-cyklo-2'-deoksyadenozynę.**

(A) Przygotowanie insertów. U—reprezentuje 2'-deoksyurydynę (dU); X—reprezentuje 5',8-cyklo-2'-deoksyadenozynę (cdA); (B) Przygotowanie plazmidu do ligacji z insertem. (C) Ligacja plazmidu z insertem oraz transformacja bakterii. (D) Sekwencjonowanie plazmidowego DNA transformantów oraz analiza wyników.

## 9. Streszczenie w języku polskim

Każda żywa komórka jest narażona w sposób ciągły na działanie wielu czynników, zarówno zewnętrznych jak i wewnętrznych, które oddziałują z jej materiałem genetycznym. Promieniowanie jonizujące, chemioterapeutyki, zanieczyszczenia żywności, ale także produkty metabolizmu komórkowego oraz reaktywne formy tlenu to czynniki potencjalnie wywołujące uszkodzenia DNA. Uszkodzenia te mogą powodować m.in. blokowanie ekspresji genów lub prowadzić do powstawania mutacji. Mutacje mogą prowadzić do zaburzenia poprawności i stabilności informacji genetycznej. Systemy naprawcze DNA muszą być stale aktywne, zdolne do wykrywania i niwelowania skutków uszkodzeń zanim dojdzie do przekazania wadliwej informacji genetycznej następnym pokoleniom. Skuteczność mechanizmów naprawczych zależy jest od wielu czynników m.in. rodzaju komórki i rodzaju uszkodzenia DNA. W sytuacji, gdy ilość uszkodzeń w genomie przekroczy próg efektywności naprawczej lub gdy systemy naprawy DNA nie funkcjonują prawidłowo może dojść m.in. do skierowania komórki na drogę kontrolowanej śmierci lub do niekontrolowanych podziałów prowadzących np. do rozwoju nowotworu.

Uszkodzenia zespolone DNA (*ang. clustered DNA damage, CDL*) definiowane jako obecność co najmniej 2 uszkodzeń w obrębie 1-2 skrętów helisy DNA mogą zwiierać różne rodzaje pojedynczych uszkodzeń, których zróżnicowane układy mogą wywoływać odmienne konsekwencje dla komórki.

System naprawy DNA poprzez wycięcie zasady (*ang. base excision repair, BER*), na którym skupiam się w niniejszej pracy jest najbardziej konserwatywnym systemem naprawczym obecnym w większości rodzajów komórek, od bakteryjnych po ludzkie. Specyficzne enzymy rozpoznają i usuwają uszkodzone nukleotydy/nukleozydy, po czym w wyniku działania szeregu enzymów wchodzących w skład systemu BER wstawiony zostaje poprawny nukleotyd lub fragment 2-10 nukleotydów. Przyjmuje się, że w mitochondriach za naprawę większości uszkodzeń odpowiada właśnie system BER.

5',8-cyklo-2'-deoksyipuryny (*ang. 5',8-cyclo-2'-deoxypurins, cdPu*) powstają w wyniku oddziaływania na komórkę promieniowania jonizującego generującego rodnik  $\cdot\text{OH}$ . To rodzaj złożonego uszkodzenia tandemowego zawierającego więcej niż jedną modyfikację w obrębie pojedynczego nukleotydu/nukleozydu. Obecność cdPu w strukturze DNA może prowadzić do upośledzenia procesów naprawczych. Gdy cdPu wchodzi w skład CDL wydajność mechanizmów naprawy komórek jest osłabiona, zwłaszcza w przypadku systemu BER. Ponadto, gdy CDL zawiera uszkodzenia DNA naprawiane przez różne mechanizmy skuteczność naprawy „prostszego” z nich może się znacząco zmniejszyć. W ramach prac będących podstawą niniejszej dysertacji wykorzystałam układ uszkodzeń zawierający miejsce apurynowe/apirymidynowe (*ang. apurinic/apyrimidinic site, miejsce AP*) oraz 5',8-cyklo-2'-deoksyipuryny.

Mitochondria stanowią kluczowy element utrzymania komórki przy życiu i zapewnienia jej odpowiedniego poziomu energii. Mitochondria są kluczowe dla procesów komórkowych, produkcji i utrzymania stanu homeostazy energii, oraz przeżycia komórek. Zachodzą w nich procesy oddychania tlenowego i produkcji trójfosforanu adenozyiny (*ang. adenosine triphosphate*, ATP) u eukariontów. Jednak fosforylacja oksydacyjna (*ang. oxidative phosphorylation*, OXPHOS) jest również źródłem reaktywnych form tlenu (*ang. reactive oxygen species*, ROS), które są zarówno ważne, jak i niebezpieczne dla komórki.

Mitochondria są niezwykle ciekawym elementem ludzkich komórek również ze względu na swoje pochodzenie. Przyjmuje się, iż mitochondria stanowią pozostałość po, wchłoniętym przez większą komórkę, symbioncie bakteryjnym, co umożliwiło rozwój pierwszych prymitywnych organizmów w kształtujących się wówczas na planecie warunkach tlenowych. Wiele argumentów przemawia za teorią endosymbiotyczną. Jednym z argumentów jest fakt, iż ludzkie mitochondria zawierają odrębny materiał genetyczny w postaci mitochondrialnego DNA. Jest ono szczególnie narażone na powstawanie uszkodzeń w wyniku aktywności ROS (m.in.  $O_2^{\cdot-}$ ,  $H_2O_2$ ,  $\cdot OH$ ) generowanych w trakcie oddychania komórkowego. Z tego względu poprawnie działające systemy naprawy mtDNA, wśród których głównym jest BER, są kluczowe dla zachowania funkcjonalności mitochondriów, a tym samym całej komórki. Mitochondria stanowią niezwykle ciekawy przedmiot badań w kontekście złożonych uszkodzeń DNA i ich wpływu na przebieg naprawy mtDNA. Mutageneza genomu mitochondrialnego może objawiać się stanami patologicznymi, takimi jak choroby mitochondrialne, neurodegeneracyjne i/lub sercowo-naczyniowe, przedwczesne starzenie się i nowotwory. Dodatkowo, w ostatnich latach mitochondria stanowią temat badań pod kątem ich udziału w chorobach cywilizacyjnych m.in. w zakresie metabolizowania składników pokarmowych takich jak tłuszcze (m.in. dieta ketogeniczna) czy ich udziału w reakcjach organizmu na ekspozycję na zimno praktykowaną przez coraz szersze grono osób celem zapobiegania wymienionym stanom patologicznym. Mimo tego, w dalszym ciągu brak badań, które uwzględniają zespolone uszkodzenia DNA zawierające cdPu oraz ich wpływ na przebieg procesów naprawczych w mtDNA. Badania w tym zakresie są kluczowe dla pełnego zrozumienia tych procesów oraz opracowania przyszłych terapii chorób u podstaw których leżą uszkodzenia mitochondriów na poziomie molekularnym.

Niniejsza dysertacja przedstawia zagadnienia dotyczące uszkodzeń DNA i skupia się na uszkodzeniach zespolonych DNA. Ponadto, rozprawa przedstawia holistyczne spojrzenie na podobieństwa ludzkich mitochondriów i bakterii (w kontekście mechanizmu naprawy przez wycięcie zasady BER), wskazując, że bakterie mogą stanowić interesujący model badawczy m.in. dla chorób mitochondrialnych. Zmiany aktywności białek biorących udział w systemie BER zbadano w oparciu o trzy eukariotyczne linie komórkowe: xrs5 – linia komórek epitelialnych wrażliwych na promieniowanie X pochodzących z jajnika chomika chińskiego, BJ – pierwotna linia ludzkich

normalnych fibroblastów wykorzystana jako linia kontrolna posiadająca sprawne systemy naprawcze, oraz XPC – linia ludzkich fibroblastów pozyskanych od pacjenta cierpiącego na skórę pergaminową typu C (*Xeroderma Pigmentosum*). Poziom wydajności systemu naprawczego BER określiłam względem układu uszkodzeń zawierającego jedno- i dwuniciowe CDL. Wykorzystany model badawczy zawierał miejsce AP oraz jedną z cdPu ((5'S),5',8-cyko-2'-deoksyadenozyna (ScdA), (5'R),5',8-cyko-2'-deoksyadenozyna (RcdA), (5'S),5',8-cyko-2'-deoksyguanozyna (ScdG) lub (5'R),5',8-cyko-2'-deoksyguanozyna (RcdG)) zlokalizowane w różnych odległościach od siebie w tej samej lub przeciwległej nici dsDNA. W prezentowanej pracy przeanalizowałam, czy obecność cdPu oraz względna odległość od „pojedynczej zmiany” (miejsca AP) w przeciwległej lub tej samej nici DNA wpływają na zdolność i efektywność jej naprawy. W badaniach uwzględniłam rodzaj cdPu, jej postać diastereoizomeryczną oraz wzajemną odległość uszkodzeń w zakresie do 10 pz. Celem ustalenia bazowego poziomu aktywności systemu naprawczego dokonałam analizy naprawy DNA zawierającego uszkodzenia zespolone przez jądrowy system naprawczy BER. Następnie, dokonałam analizy na poziomie cytoplazmy, aby określić czy białka biorące udział w naprawie DNA jądrowego i mitochondrialnego wykazują aktywność jeszcze przed translokacją do docelowego miejsca w komórce oraz jak obecność złożonych uszkodzeń takich jak cdPu wpływa na całkowitą aktywność białek zaangażowanych w naprawę BER na poziomie cytoplazmy. Następnie, podjęłam próbę analizy aktywności białek zaangażowanych w początkowe etapy systemu BER w mitochondriach komórek linii xrs5. Ostatnim etapem niniejszych badań było sprawdzenie efektów naprawy uszkodzeń w komórkach bakteryjnych i przełożenie wyników analizy wydajności systemu naprawczego na potencjał mutageny badanych uszkodzeń zespolonych.

Uzyskane przeze mnie wyniki stanowią podstawę do dalszych badań w kontekście opracowania i/lub ulepszania metod terapii wywołujących uszkodzenia DNA (np. radioterapia, chemioterapia, nowoczesne terapie wykorzystujące syntetyczne terapeutyczne oligonukleotydy) a także ze względu na ich potencjał diagnostyczny (cdPu jako biomarkery oksydacyjnych uszkodzeń DNA). Poznanie wpływu obecności cdPu, uszkodzeń powstających m.in. w wyniku promieniowania, na materiał genetyczny ma kluczowe znaczenie dla jego potencjalnie nowych zastosowań w medycynie, farmacji i naukach o żywności.

## 10. Streszczenie w języku angielskim

Each living cell is constantly exposed to many factors, both external and internal, that interact with its genetic material. Ionizing radiation, chemotherapeutics, food contamination, but also products of cellular metabolism, and reactive oxygen species (ROS) are factors that potentially cause DNA damage. DNA lesions may block gene expression or lead to mutagenesis. Mutations can subsequently lead to disturbances in the correctness and stability of genetic information. DNA repair systems must be constantly active, able to detect and eliminate the effects of DNA damage before the incorrect genetic information is passed on to the next generations. The efficiency of repair mechanisms depends on many factors, including the type of cell and the occurring type of DNA damage. When the number of DNA lesions in the genome exceeds its repair efficiency threshold or when DNA repair systems do not function properly, the cell may enter the path of controlled death or the path of uncontrolled cellular divisions leading to e.g., the development of cancer.

Clustered DNA damage (CDL), defined as the presence of at least 2 lesions within 1-2 turns of the DNA helix, may contain various types of single DNA lesions and consequences for the cell may differ according to the spatial arrangement of lesions.

In my doctoral research, I have focused on the base excision repair (BER) system which is the most conservative repair system in most cell types, from bacterial to human. Specific enzymes recognize and remove damaged nucleotides/nucleosides. It is followed by a series of enzymatic reactions leading to the insertion of the correct nucleotide or longer fragment of 2-10 nucleotides. It is assumed that the BER system is responsible for the repair of most DNA damage in the mitochondria.

5',8-cyclo-2'-deoxypurines (cdPu) are formed as a result of the ionizing radiation (generating  $\cdot\text{OH}$ ) impact on the cell. It is a complex case of DNA damage containing more than one modification within a single nucleotide. The presence of cdPu in the DNA structure may lead to impaired processes of DNA repair. When CDL contains cdPu, the efficiency of DNA repair mechanisms is impaired, especially in the case of the BER system. Moreover, when the CDL contains DNA lesions that are repaired by different mechanisms, the repair efficiency of the "simpler" lesion can be significantly reduced. As part of this dissertation, I used a CDL model containing an apurinic/aprimidinic site (AP site) and 5',8-cyclo-2'-deoxypurines.

Mitochondria are a key element in keeping the cell alive and providing it with an adequate level of energy. Mitochondria are crucial for cellular processes such as energy production, homeostasis, and cell survival. They carry out the processes of aerobic respiration and the production of adenosine triphosphate (ATP) in eukaryotes. However, oxidative phosphorylation (OXPHOS) is also a source of ROS, which are important and dangerous to the cell at the same time.



Mitochondria are an interesting element of human cells also due to their origin. It is assumed that mitochondria are a remnant of a bacterial symbiont absorbed by a larger cell, which enabled the development of the first primitive organisms in the aerobic conditions that were developing on the planet at that time. There are many arguments in favor of the endosymbiotic theory. One of the arguments is the fact that human mitochondria contain a separate genetic material in the form of mitochondrial DNA. It is particularly vulnerable to DNA damage generation caused by ROS activity (such as  $O_2^{\bullet-}$ ,  $H_2O_2$ ,  $\bullet OH$ ) formed during cellular respiration. For this reason, properly functioning mtDNA repair systems, the main one being BER, are crucial for maintaining the function of the mitochondria, and thus the entire cell. Mitochondria are an extremely interesting subject of research in the context of complex DNA damage and their impact on mtDNA repair. Mutagenesis of the mitochondrial genome can result in pathological conditions such as mitochondrial, neurodegenerative, and/or cardiovascular diseases, premature aging, and cancer. In addition, in recent years, mitochondria have been the subject of research in terms of their participation in civilization diseases, e.g., in the field of metabolizing nutrients such as fats (e.g., ketogenic diet) or their participation in the body's reactions to exposure to cold practiced by an increasing number of people to prevent the above-mentioned pathological conditions. Despite this, studies that consider complex DNA damage containing cdPu and their impact on mtDNA repair processes are scarce. Researching this area is crucial to fully understand these processes and to develop new therapies for diseases linked to mitochondrial DNA damage at the molecular level.

This dissertation focuses on clustered DNA damage. In addition, the dissertation presents a holistic view of the similarities between human mitochondria and bacteria (in the context of the BER excision repair system) and points out that bacteria might be an interesting research model for mitochondrial diseases. Changes in the overall activity of proteins involved in the BER system were investigated based on three eukaryotic cell lines: xrs5 - a cell line of X-ray sensitive epithelial cells derived from Chinese hamster ovary, BJ - a primary cell line of human normal fibroblasts used as a control with efficient repair systems, and XPC - human fibroblasts obtained from a patient suffering from type C Xeroderma Pigmentosum. The performance level of the BER repair system was determined relative to a single- and double-stranded CDL. The model oligonucleotides used in this study contained an AP site and one of cdPu ((5'S)-5',8-cyclo-2'-deoxyadenosine (ScdA), (5'R)-5',8-cyclo-2'-deoxyadenosine (RcdA), (5'S)-5',8-cyclo-2'-deoxyguanosine (ScdG) or (5'R)-5',8-cyclo-2'-deoxyguanosine (RcdG)) located at different interlesion distances on same or opposite dsDNA strand. I have analyzed whether the presence of cdPu and their relative distance from a single lesion (AP site) on the opposite or the same DNA strand affect the ability to effectively repair the latter. The type of cdPu, its diastereomeric form, and the mutual distance between lesions in the range of up to 10 bp were taken under consideration.

To determine the baseline level of the repair system activity, I optimized and investigated the repair of CDL by the BER nuclear repair system. Next, I performed an analysis at the cytoplasmic level to determine whether the proteins involved in nuclear and mitochondrial DNA repair present enzymatic activity even before translocation to the target site in the cell and how the presence of complex damage such as cdPu affects the overall protein activity. I have performed the analysis of the activity of proteins involved in the initial stages of the BER system in the mitochondrial extracts of *xrs5* cells. Moreover, I have investigated the mutagenic potential of the model CDL lesions and assessed trend correlations between the procaryotic and eukaryotic models of DNA repair.

The results of the study presented in this dissertation may be the basis for further research in the context of improving existing therapies that cause DNA damage, such as radiotherapy, and/or chemotherapy, but also developing modern therapies (e.g., synthetic therapeutic oligonucleotides) as well as due to their diagnostic potential (cdPu as biomarkers of oxidative DNA damage). Understanding the impact of cdPu occurrence in DNA is crucial for its potential applications in medicine, pharmacy, and food science.

## 11. Spis rycin i tabel

Rycina 1. Schemat reakcji Habera-Weissa katalizowanej jonami metali przejściowych.	- 13 -
Rycina 2. Schematyczne przedstawienie sygnalizacji ROS w ludzkich mitochondriach.	- 15 -
Rycina 3. Struktury chemiczne badanych 5',8-cyklo-2'-deoksypuryn.	- 21 -
Rycina 4. Schemat systemu naprawczego BER.	- 26 -
Rycina 5. Schemat naprawy SP-BER i LP-BER.	- 28 -
Rycina 6. System naprawy SP-BER w mitochondriach.	- 30 -
Rycina 7. Model badawczy.	- 42 -
Rycina 8. Procedura badawcza określenia aktywności enzymatycznej białek odpowiedzialnych za poszczególne etapy naprawy uszkodzeń zespolonych DNA zawierających 5',8-cyklo-2'-deoksypuryny.	- 65 -
Rycina 9. Procedura badawcza określenia mutagenności badanych uszkodzeń zespolonych zawierających 5',8-cyklo-2'-deoksyadenozynę.	- 67 -
Tabela 1. Rodzaje oksydacyjnych modyfikacji zasad nukleinowych obecnych w komórkowym DNA [49,53]	- 19 -
Tabela 2. Ogólne trendy aktywności białek zaangażowanych w proces naprawczy dsCDL zawierających (5'S)-5',8-cyklo-2'-deoksyadenozynę (ScdA), (5'R)-5',8-cyklo-2'-deoksyadenozynę (RcdA), (5'S)-5',8-cyklo-2'-deoksyguanozynę (ScdG) lub (5'R)-5',8-cyklo-2'-deoksyguanozynę (RcdG) w ekstraktach jądrowych linii xrs5 [87].	- 44 -
Tabela 3. Ogólne trendy aktywności białek zaangażowanych w proces naprawczy ssCDL i dsCDL zawierających (5'S)-5',8-cyklo-2'-deoksyadenozynę (ScdA) i (5'R)-5',8-cyklo-2'-deoksyadenozynę (RcdA) w ekstraktach jądrowych linii XPC i BJ [119].	- 44 -
Tabela 4. Ogólne trendy aktywności białek zaangażowanych w proces naprawczy dsCDL zawierających (5'S)-5',8-cyklo-2'-deoksyadenozynę (ScdA), (5'R)-5',8-cyklo-2'-deoksyadenozynę (RcdA), (5'S)-5',8-cyklo-2'-deoksyguanozynę (ScdG) lub (5'R)-5',8-cyklo-2'-deoksyguanozynę (RcdG) w ekstraktach cytoplazmatycznych linii xrs5.	- 46 -
Tabela 5. Ogólne trendy aktywności białek zaangażowanych w proces naprawczy ssCDL i dsCDL zawierających (5'S)-5',8-cyklo-2'-deoksyadenozynę (ScdA) i (5'R)-5',8-cyklo-2'-deoksyadenozynę (RcdA) w ekstraktach cytoplazmatycznych linii XPC i BJ.	- 47 -
Tabela 6. Ogólne trendy aktywności białek zaangażowanych w proces naprawczy dsCDL zawierających (5'S)-5',8-cyklo-2'-deoksyadenozynę (ScdA), (5'R)-5',8-cyklo-2'-deoksyadenozynę (RcdA), (5'S)-5',8-cyklo-2'-deoksyguanozynę (ScdG) lub (5'R)-5',8-cyklo-2'-deoksyguanozynę (RcdG) w ekstraktach mitochondrialnych linii xrs5.	- 50 -
Tabela 7. Lista sekwencji dwuniciowych oligonukleotydów wykorzystanych do badań z oznaczonymi pozycjami 2'-deoksyurydyny (dU) i 5',8-cyklo-2'-deoksypuryn (cdPu).	- 60 -
Tabela 8. Obliczone i wykazane masy cząsteczkowe badanych jednoniciowych oligonukleotydów.	- 62 -

## 12. Bibliografia

1. Sarniak, A.; Lipińska, J.; Tytman, K.; Lipińska, S. Endogenous Mechanisms of Formation of Reactive Oxygen Species (ROS). *Postępy Hig Med Dosw* **2016**, *70*, 1150–1165, doi:10.5604/17322693.1224259.
2. Bazinet, L.; Doyen, A. Antioxidants, Mechanisms, and Recovery by Membrane Processes. *Crit Rev Food Sci Nutr* **2017**, *57*, 677–700, doi:10.1080/10408398.2014.912609.
3. Jastroch, M.; Divakaruni, A.S.; Mookerjee, S.; Treberg, J.R.; Brand, M.D. Mitochondrial Proton and Electron Leaks. *Essays Biochem* **2010**, *47*, 53–67, doi:10.1042/BSE0470053.
4. Gao, L.; Laude, K.; Cai, H. Mitochondrial Pathophysiology, Reactive Oxygen Species, and Cardiovascular Diseases. *Veterinary Clinics North America Small Animal Practice* **2008**, *38*, 137–154, doi:10.1038/jid.2014.371.
5. Kalisz, O.; Wolski, T.; Gerkowicz, M.; Smorawski, M. Reaktywne Formy Tlenu [RTF] Oraz Ich Rola w Patogenezie Niektórych Chorob. *Annales Universitatis Mariae Curie-Skłodowska. Sectio DD:Medicina Veterinaria* **2007**, *62*, 87–99.
6. Panieri, E.; Santoro, M.M. ROS Homeostasis and Metabolism: A Dangerous Liaison in Cancer Cells. *Cell Death Dis* **2016**, *7*, e2253, doi:10.1038/cddis.2016.105.
7. Inoue, M.; Sato, E.F.; Nishikawa, M.; Park, A.-M.; Kira, Y.; Imada, I.; Utsumi, K. Mitochondrial Generation of Reactive Oxygen Species and Its Role in Aerobic Life. *Curr Med Chem* **2005**, *10*, 2495–2505, doi:10.2174/0929867033456477.
8. Samanta, D.; Semenza, G.L. Maintenance of Redox Homeostasis by Hypoxia-Inducible Factors. *Redox Biol* **2017**, *13*, 331–335, doi:10.1016/j.redox.2017.05.022.
9. Nickoloff, J.A.; Sharma, N.; Taylor, L. Clustered DNA Double-Strand Breaks: Biological Effects and Relevance to Cancer Radiotherapy. *Genes (Basel)* **2020**, *11*, 1–17, doi:10.3390/genes11010099.
10. Terato, H.; Ide, H. Clustered DNA Damage by HZE Particles Clustered DNA Damage Induced by Heavy Ion Particles. *Biological Science in Space* **2004**, *18*, 206–215, doi:10.2187/bss.18.206.
11. Cadet, J.; Wagner, J.R. DNA Base Damage by Reactive Oxygen Species, Oxidizing Agents, and UV Radiation. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **2013**, *5*, a012559–a012559, doi:10.1101/cshperspect.a012559.
12. Hsu, C.C.; Senussi, N.H.; Fertrin, K.Y.; Kowdley, K. V. Iron Overload Disorders. *Hepatol Commun* **2022**, *6*, 1842–1854, doi:10.1002/hep4.2012.
13. Nienhuis, A.W.; Nathan, D.G. Pathophysiology and Clinical Manifestations of the  $\beta$ -Thalassemias. *Cold Spring Harb Perspect Med* **2012**, *2*, doi:10.1101/cshperspect.a011726.

14. He, L.; He, T.; Farrar, S.; Ji, L.; Liu, T.; Ma, X. Antioxidants Maintain Cellular Redox Homeostasis by Elimination of Reactive Oxygen Species. *Cellular Physiology and Biochemistry* **2017**, *44*, 532–553, doi:10.1159/000485089.
15. Maynard, S.; Fang, E.F.; Scheibye-Knudsen, M.; Croteau, D.L.; Bohr, V.A. DNA Damage, DNA Repair, Aging, and Neurodegeneration. *Cold Spring Harb Perspect Med* **2015**, *5*, doi:10.1101/cshperspect.a025130.
16. Kim, G.H.; Kim, J.E.; Rhie, S.J.; Yoon, S. The Role of Oxidative Stress in Neurodegenerative Diseases. *Exp Neurobiol* **2015**, *24*, 325–340, doi:10.5607/en.2015.24.4.325.
17. Birben, E.; Sahiner, U.M.; Sackesen, C.; Erzurum, S.; Kalayci, O. Oxidative Stress and Antioxidant Defense. *World Allergy Organization Journal* **2012**, *5*, 9–19, doi:10.1097/WOX.0b013e3182439613.
18. Cheng, Z.; Ristow, M. Mitochondria and Metabolic Homeostasis. *Antioxid Redox Signal* **2013**, *19*, 240–242, doi:10.1089/ars.2013.5255.
19. Antonarakis, S.E.; Lyle, R.; Demertzakis, E.T.; Reymond, A.; Deutsch, S. Chromosome 21 and Down Syndrome: From Genomics to Pathophysiology. *Nat Rev Genet* **2004**, *5*, 725–738, doi:10.1038/nrg1448.
20. Ames, B.N.; Shigenaga, M.K.; Hagen, T.M. Oxidants, Antioxidants, and the Degenerative Diseases of Aging. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1993**, *90*, 7915–7922, doi:10.1073/pnas.90.17.7915.
21. Zhong, H.; Yin, H. Role of Lipid Peroxidation Derived 4-Hydroxynonenal (4-HNE) in Cancer: Focusing on Mitochondria. *Redox Biol* **2015**, *4*, 193–199, doi:10.1016/j.redox.2014.12.011.
22. McBee, M.E.; Chionh, Y.H.; Sharaf, M.L.; Ho, P.; Cai, M.W.L.; Dedon, P.C. Production of Superoxide in Bacteria Is Stress- and Cell State-Dependent: A Gating-Optimized Flow Cytometry Method That Minimizes ROS Measurement Artifacts with Fluorescent Dyes. *Front Microbiol* **2017**, *8*, 1–17, doi:10.3389/fmicb.2017.00459.
23. Imlay, J.A. The Molecular Mechanisms and Physiological Consequences of Oxidative Stress: Lessons from a Model Bacterium. *Nat Rev Microbiol* **2013**, *11*, 443–454, doi:10.1038/nrmicro3032.
24. Janowska, B.; Komisarski, M.; Prorok, P.; Sokołowska, B.; Kuśmierk, J.; Janion, C.; Tudek, B. Nucleotide Excision Repair and Recombination Are Engaged in Repair of Trans-4-Hydroxy-2-Nonenal Adducts to DNA Bases in Escherichia Coli. *Int J Biol Sci* **2009**, *5*, 611–620, doi:10.7150/ijbs.5.611.
25. Walston, J.; Xue, Q.; Semba, R.D.; Ferrucci, L.; Cappola, A.R.; Ricks, M.; Guralnik, J.; Fried, L.P. Serum Antioxidants, Inflammation, and Total Mortality in Older Women. *Am J Epidemiol* **2006**, *163*, 18–26, doi:10.1093/aje/kwj007.

26. Soysal, P.; Isik, A.T.; Carvalho, A.F.; Fernandes, B.S.; Solmi, M.; Schofield, P.; Veronese, N.; Stubbs, B. Oxidative Stress and Frailty: A Systematic Review and Synthesis of the Best Evidence. *Maturitas* **2017**, *99*, 66–72, doi:10.1016/j.maturitas.2017.01.006.
27. Dent, E.; Hoogendijk, E.O.; Wright, O.R.L. New Insights into Anorexia of Aging: From Prevention to Treatment. *Clinical Opinions* **2019**, *22*, 44–51, doi:10.1097/MCO.0000000000000525.
28. Guarnieri, S.; Loft, S.; Riso, P.; Porrini, M.; Risom, L.; Poulsen, H.E.; Dragsted, L.O.; Møller, P. DNA Repair Phenotype and Dietary Antioxidant Supplementation. *British Journal of Nutrition* **2008**, *99*, 1018–1024, doi:10.1017/S0007114507842796.
29. Fenech, M.F. Nutriomes and Personalised Nutrition for Dna Damage Prevention, Telomere Integrity Maintenance and Cancer Growth Control. *Cancer Treat Res* **2014**, *159*, 427–441, doi:10.1007/978-3-642-38007-5\_24.
30. Liu, Z.; Ren, Z.; Zhang, J.; Chuang, C.C.; Kandaswamy, E.; Zhou, T.; Zuo, L. Role of ROS and Nutritional Antioxidants in Human Diseases. *Front Physiol* **2018**, *9*, doi:10.3389/fphys.2018.00477.
31. Combs Jr., G.F.; McClung, J.P. *The Vitamins, Fundamental Aspects in Nutrition and Health*; 5th ed.; Elsevier; Academic Press, 2017; ISBN 9780128029831.
32. Kaźmierczak-Barańska, J.; Boguszewska, K.; Adamus-Grabicka, A.; Karwowski, B.T. Two Faces of Vitamin C—Antioxidative and Pro-Oxidative Agent. *Nutrients* **2020**, *12*, 1501, doi:10.3390/nu12051501.
33. Kaźmierczak-Barańska, J.; Boguszewska, K.; Karwowski, B.T. Nutrition Can Help DNA Repair in the Case of Aging. *Nutrients* **2020**, *12*, doi:10.3390/nu12113364.
34. Alleva, R.; Di Donato, F.; Strafella, E.; Staffolani, S.; Nocchi, L.; Borghi, B.; Pignotti, E.; Santarelli, L.; Tomasetti, M. Effect of Ascorbic Acid-Rich Diet on in Vivo-Induced Oxidative Stress. *British Journal of Nutrition* **2012**, *107*, 1645–1654, doi:10.1017/S0007114511004806.
35. Hata, K.; Urushibara, A.; Yamashita, S.; Shikazono, N.; Yokoya, A.; Katsumura, Y. Chemical Repair of Base Lesions, AP-Sites, and Strand Breaks on Plasmid DNA in Dilute Aqueous Solution by Ascorbic Acid. *Biochem Biophys Res Commun* **2013**, *434*, 341–345, doi:10.1016/j.bbrc.2013.03.075.
36. Delinasios, G.J.; Karbaschi, M.; Cooke, M.S.; Young, A.R. Vitamin E Inhibits the UVAI Induction of “Light” and “Dark” Cyclobutane Pyrimidine Dimers, and Oxidatively Generated DNA Damage, in Keratinocytes. *Sci Rep* **2018**, *8*, doi:10.1038/s41598-017-18924-4.
37. Fantappiè, O.; Lodovici, M.; Fabrizio, P.; Marchetti, S.; Fabbroni, V.; Solazzo, M.; Lasagna, N.; Pantaleo, P.; Mazzanti, R. Vitamin E Protects DNA from Oxidative Damage in Human Hepatocellular Carcinoma Cell Lines. *Free Radic Res* **2004**, *38*, 751–759, doi:10.1080/10715760410001705140.

38. Ferguson, L.R.; Karunasinghe, N.; Zhu, S.; Wang, A.H. Selenium and Its' Role in the Maintenance of Genomic Stability. *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* **2012**, *733*, 100–110, doi:10.1016/j.mrfmmm.2011.12.011.
39. Song, Y.; Chung, C.S.; Bruno, R.S.; Traber, M.G.; Brown, K.H.; King, J.C.; Ho, E. Dietary Zinc Restriction and Repletion Affects DNA Integrity in Healthy Men. *American Journal of Clinical Nutrition* **2009**, *90*, 321–328, doi:10.3945/ajcn.2008.27300.
40. Kunzmann, A.; Dedoussis, G.; Jajte, J.; Malavolta, M.; Mocchegiani, E.; Bürkle, A. Effect of Zinc on Cellular Poly(ADP-Ribosyl)ation Capacity. *Exp Gerontol* **2008**, *43*, 409–414, doi:10.1016/j.exger.2007.10.003.
41. Ho, E.; Courtemanche, C.; Ames, B.N. Nutrient-Gene Interactions Zinc Deficiency Induces Oxidative DNA Damage and Increases P53 Expression in Human Lung Fibroblasts. *J Nutr* **2003**, *133*, 2543–2548, doi:10.1093/jn/133.8.2543.
42. Sharif, R.; Thomas, P.; Zalewski, P.; Fenech, M. The Role of Zinc in Genomic Stability. *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* **2012**, *733*, 111–121, doi:10.1016/j.mrfmmm.2011.08.009.
43. Sharma, P.; Sampath, H. Mitochondrial DNA Integrity: Role in Health and Disease. *Cells* **2019**, *8*, 100, doi:10.3390/cells8020100.
44. Whitaker, A.M.; Schaich, M.A.; Smith, M.S.; Flynn, T.S.; Freudenthal, B.D. Base Excision Repair of Oxidative DNA Damage from Mechanism to Disease. *Frontiers in Bioscience* **2017**, *22*, 1493–1522, doi:10.2741/4555.
45. Ba, X.; Boldogh, L. 8-Oxoguanine DNA Glycosylase 1: Beyond Repair of the Oxidatively Modified Base Lesions. *Redox Biol* **2018**, *14*, 669–678, doi:10.1016/j.redox.2017.11.008.
46. Yu, Y.; Wang, P.; Cui, Y.; Wang, Y. Chemical Analysis of DNA Damage. *Anal Chem* **2018**, *90*, 556–576, doi:10.1021/acs.analchem.7b04247.
47. Walker, G.; Chatterjee, N. Mechanisms of DNA Damage, Repair, and Mutagenesis. *Environ Mol Mutagen* **2017**, *58*, 235–263, doi:10.1002/em.
48. Cadet, J.; Douki, T.; Ravanat, J.-L. Oxidatively Generated Base Damage to Cellular DNA. *Free Radic Biol Med* **2010**, *49*, 9–21, doi:10.1016/j.freeradbiomed.2010.03.025.
49. Cadet, J.; Ravanat, J.-L.; TavernaPorro, M.; Menoni, H.; Angelov, D. Oxidatively Generated Complex DNA Damage: Tandem and Clustered Lesions. *Cancer Lett* **2012**, *327*, 5–15, doi:10.1016/j.canlet.2012.04.005.
50. Muniandy, P.A.; Liu, J.; Majumdar, A.; Liu, S.T.; Seidman, M.M. DNA Interstrand Crosslink Repair in Mammalian Cells: Step by Step. *Crit Rev Biochem Mol Biol* **2010**, *45*, 23–49, doi:10.3109/10409230903501819.

51. Zharkov, D.O. Base Excision DNA Repair. *Cellular and Molecular Life Sciences* **2008**, *65*, 1544–1565, doi:10.1007/s00018-008-7543-2.
52. Cadet, J.; Wagner, J.R. DNA Base Damage by Reactive Oxygen Species, Oxidizing Agents, and UV Radiation. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **2013**, *5*, a012559–a012559, doi:10.1101/cshperspect.a012559.
53. Holzerová, E.; Prokisch, H. Mitochondria: Much Ado about Nothing? How Dangerous Is Reactive Oxygen Species Production? *Int J Biochem Cell Biol* **2015**, *63*, 16–20, doi:10.1016/j.biocel.2015.01.021.
54. Greenberg, M.M. The Formamidopyrimidines: Purine Lesions Formed in Competition With 8-Oxopurines From Oxidative Stress. *Acc Chem Res* **2012**, *45*, 588–597, doi:10.1038/jid.2014.371.
55. Rhee, D.B.; Ghosh, A.; Lu, J.; Bohr, V.A.; Liu, Y. Factors That Influence Telomeric Oxidative Base Damage and Repair by DNA Glycosylase OGG1. *DNA Repair (Amst)* **2011**, *10*, 34–44, doi:10.1016/j.dnarep.2010.09.008.
56. Marietta, C.; Gulam, H.; Brooks, P.J. A Single 8,5-Cyclo-2-Deoxyadenosine Lesion in a TATA Box Prevents Binding of the TATA Binding Protein and Strongly Reduces Transcription in Vivo. *DNA Repair (Amst)* **2002**, *1*, 967–975.
57. Kusumoto, R.; Masutani, C.; Iwai, S.; Hanaoka, F. Translesion Synthesis by Human DNA Polymerase  $\eta$  across Thymine Glycol Lesions. *Biochemistry* **2002**, *41*, 6090–6099, doi:10.1021/bi025549k.
58. Vilenchik, M.M.; Knudson, A.G. Endogenous DNA Double-Strand Breaks: Production, Fidelity of Repair, and Induction of Cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2003**, *100*, 12871–12876.
59. Tubbs, A.; Nussenzweig, A. Endogenous DNA Damage as a Source of Genomic Instability in Cancer. *Cell* **2017**, *168*, 644–656, doi:10.1016/j.cell.2017.01.002.
60. Ward, J.F.; Evans, J.W.; Limoli, C.L.; Calabro-Jones, P.M. Radiation and Hydrogen Peroxide Induced Free Radical Damage to DNA. *Br J Cancer* **1987**, *55*, 105–112.
61. Hada, M.; Georgakilas, A.G. Formation of Clustered DNA Damage after High-LET Irradiation: A Review. *J Radiat Res* **2008**, *49*, 203–210, doi:10.1269/jrr.07123.
62. Pouget, J.-P.; Frelon, S.; Ravanat, J.-L.; Testard, I.; Odin, F.; Cadet, J. Formation of Modified DNA Bases in Cells Exposed Either to Gamma Radiation or to High-LET Particles. *Radiat Res* **2002**, *157*, 589–595, doi:10.1667/0033-7587(2002)157[0589:fomdbi]2.0.co;2.
63. Burkart, W.; Jung, T.; Frasc, G. Damage Pattern as a Function of Radiation Quality and Other Factors. *C R Acad Sci III* **1999**, *322*, 89–101, doi:10.1016/s0764-4469(99)80029-8.



64. Georgakilas, A.G. Processing of DNA Damage Clusters in Human Cells: Current Status of Knowledge. *Mol Biosyst* **2007**, *4*, 30–35, doi:10.1039/b713178j.
65. Jaruga, P.; Dizdaroglu, M. 8,5'-Cyclopurine-2'-Deoxynucleosides in DNA: Mechanisms of Formation, Measurement, Repair and Biological Effects. *DNA Repair (Amst)* **2008**, *7*, 1413–1425, doi:10.1016/j.dnarep.2008.06.005.
66. Karwowski, B.T.; Bellon, S.; O'Neill, P.; Lomax, M.E.; Cadet, J. Effects of (5'S)-5',8-Cyclo-2'-Deoxyadenosine on the Base Excision Repair of Oxidatively Generated Clustered DNA Damage. A Biochemical and Theoretical Study. *Org Biomol Chem* **2014**, *12*, 8671–8682, doi:10.1039/c4ob01089b.
67. Brooks, P.J. The Cyclopurine Deoxynucleosides: DNA Repair, Biological Effects, Mechanistic Insights, and Unanswered Questions. *Free Radic Biol Med* **2017**, *107*, 90–100, doi:10.1016/j.freeradbiomed.2016.12.028.
68. Karwowski, B.T. The Influence of Single, Tandem, and Clustered DNA Damage on the Electronic Properties of the Double Helix: A Theoretical Study. *Molecules* **2020**, *25*, 3126, doi:10.3390/molecules25143126.
69. Jiang, Z.; Xu, M.; Lai, Y.; Laverde, E.E.; Terzidis, M.A.; Masi, A.; Chatgililoglu, C.; Liu, Y. Bypass of a 5',8-Cyclopurine-2'-Deoxynucleoside by DNA Polymerase  $\beta$  during DNA Replication and Base Excision Repair Leads to Nucleotide Misinsertions and DNA Strand Breaks. *DNA Repair (Amst)* **2015**, *33*, 24–34, doi:10.1016/j.dnarep.2015.06.004.
70. Jasti, V.P.; Das, R.S.; Hilton, B.A.; Weerasooriya, S.; Zou, Y.; Basu, A.K. (5' S)-8,5'-Cyclo-2'-Deoxyguanosine Is a Strong Block to Replication, a Potent Pol V-Dependent Mutagenic Lesion, and Is Inefficiently Repaired in Escherichia Coli. *Biochemistry* **2011**, *50*, 3862–3865, doi:10.1021/bi2004944.
71. Chatgililoglu, C.; Ferreri, C.; Geacintov, N.E.; Krokidis, M.G.; Liu, Y.; Masi, A.; Shafirovich, V.; Terzidis, M.A.; Tsegay, P.S. 5',8-Cyclopurine Lesions in DNA Damage: Chemical, Analytical, Biological, and Diagnostic Significance. *Cells* **2019**, *8*, 513, doi:10.3390/cells8060513.
72. Xu, M.; Lai, Y.; Jiang, Z.; Terzidis, M.A.; Masi, A.; Chatgililoglu, C.; Liu, Y. A 5', 8-Cyclo-2'-Deoxypurine Lesion Induces Trinucleotide Repeat Deletion via a Unique Lesion Bypass by DNA Polymerase  $\beta$ . *Nucleic Acids Res* **2014**, *42*, 13749–13763, doi:10.1093/nar/gku1239.
73. Pande, P.; Das, R.S.; Sheppard, C.; Kow, Y.W.; Basu, A.K. 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)* **2012**, *11*, 926–931, doi:10.1016/j.dnarep.2012.09.002.

74. Karwowski, B.T. 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. *Cells* **2019**, *8*, 1–20.
75. Jaruga, P.; Rozalski, R.; Jawien, A.; Migdalski, A.; Olinski, R.; Dizdaroglu, M. DNA Damage Products (5' R)- and (5' S)-8,5'-Cyclo- 2'-Deoxyadenosines as Potential Biomarkers in Human Urine for Atherosclerosis. *Biochemistry* **2012**, *51*, 1822–1824, doi:10.1021/bi201912c.
76. Mori, T.; Nakane, H.; Iwamoto, T.; Krokidis, M.G.; Chatgililoglu, C.; Tanaka, K.; Kaidoh, T.; Hasegawa, M.; Sugiura, S. High Levels of Oxidatively Generated DNA Damage 8,5'-Cyclo-2'-Deoxyadenosine Accumulate in the Brain Tissues of Xeroderma Pigmentosum Group A Gene-Knockout Mice. *DNA Repair (Amst)* **2019**, *80*, 52–58, doi:10.1016/j.dnarep.2019.04.004.
77. Jaruga, P.; Theruvathu, J.; Dizdaroglu, M.; Brooks, P.J. Complete Release of (5'S)-8,5'-Cyclo-2'-Deoxyadenosine from Dinucleotides, Oligodeoxynucleotides and DNA, and Direct Comparison of Its Levels in Cellular DNA with Other Oxidatively Induced DNA Lesions. *Nucleic Acids Res* **2004**, *32*, 1–10, doi:10.1093/nar/gnh087.
78. Pednekar, V.; Weerasooriya, S.; Jasti, V.P.; Basu, A.K. Mutagenicity and Genotoxicity of (5'S)-8,5'-Cyclo-2'- Deoxyadenosine in Escherichia Coli and Replication of (5'S)-8,5'-Cyclopurine-2'-Deoxynucleosides in Vitro by Dna Polymerase Iv, Exo-Free Klenow Fragment, and Dpo4. *Chem Res Toxicol* **2014**, *27*, 200–210, doi:10.1021/tx4002786.
79. Jaruga, P.; Birincioglu, M.; Rodriguez, H.; Dizdaroglu, M. Mass Spectrometric Assays for the Tandem Lesion 8,5'-Cyclo-2'-Deoxyguanosine in Mammalian DNA. *Biochemistry* **2002**, *41*, 3703–3711, doi:10.1021/bi016004d.
80. Kuraoka, I.; Bender, C.; Romieu, A.; Cadet, J.; Wood, R.D.; Lindahl, T. 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* **2000**, *97*, 3832–3837, doi:10.1073/pnas.070471597.
81. Chatgililoglu, C.; Ferreri, C.; Terzidis, M.A. Purine 5',8-Cyclonucleoside Lesions: Chemistry and Biology. *Chem Soc Rev* **2011**, *40*, 1368–1382, doi:10.1039/c0cs00061b.
82. Chatgililoglu, C. Cyclopurine (CPu) Lesions: What, How, and Why? *Free Radic Res* **2019**, *53*, 941–943, doi:10.1080/10715762.2019.1643017.
83. Lomax, M.E.; Cunniffe, S.; O'Neill, P. Efficiency of Repair of an Abasic Site within DNA Clustered Damage Sites by Mammalian Cell Nuclear Extracts. *Biochemistry* **2004**, *43*, 11017–11026, doi:10.1021/bi049560r.

84. David-Cordonniert, M.-H.; Laval, J.; O'Neil, P. Clustered DNA Damage, Influence on Damage Excision by XRS5 Nuclear Extracts and Escherichia Coli Nth and Fpg Proteins. *2000*, *275*, 11865–11873, doi:<https://doi.org/10.1074/jbc.275.16.11865>.
85. Eccles, L.J.; Menoni, H.; Angelov, D.; Lomax, M.E.; O'Neill, P. Efficient Cleavage of Single and Clustered AP Site Lesions within Mono-Nucleosome Templates by CHO-K1 Nuclear Extract Contrasts with Retardation of Incision by Purified APE1. *DNA Repair (Amst)* **2015**, *35*, 27–36, doi:10.1016/j.dnarep.2015.08.003.
86. 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*, 725, doi:10.3390/cells10040725.
87. Karwowski, B.T. 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. *Cells* **2019**, *8*, doi:10.3390/cells8111303.
88. 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 BsmI and SspI Restriction Enzymes. *Molecules* **2021**, *26*, doi:10.3390/molecules26123750.
89. Brooks, P.J. The 8,5'-Cyclopurine-2'-Deoxynucleosides: Candidate Neurodegenerative DNA Lesions in Xeroderma Pigmentosum, and Unique Probes of Transcription and Nucleotide Excision Repair. *DNA Repair (Amst)* **2008**, *7*, 1168–1179, doi:10.1016/j.dnarep.2008.03.016.
90. Karwowski, B.T. (5'S) 5',8-Cyclo-2'-Deoxyadenosine Cannot Stop BER. Clustered DNA Lesion Studies. *Int J Mol Sci* **2021**, *22*, 1–18, doi:10.3390/ijms22115934.
91. Schärer, O.D. Nucleotide Excision Repair in Eukaryotes. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **2013**, *5*, doi:10.1101/cshperspect.a012609.
92. McKinnon, P.J. DNA Repair Deficiency and Neurological Disease. *Nat Rev Neurosci* **2009**, *10*, 100–112, doi:10.1038/nrn2559.
93. Kraemer, K.H.; Patronas, N.J.; Schiffmann, R.; Brooks, B.P.; Tamura, D.; DiGiovanna, J.J. Xeroderma Pigmentosum, Trichothiodystrophy and Cockayne Syndrome: A Complex Genotype-Phenotype Relationship. *Neuroscience* **2007**, *145*, 1388–1396, doi:10.1016/j.neuroscience.2006.12.020.
94. Cleaver, J.E.; Bootsma, D. Xeroderma Pigmentosum: Biochemical and Genetic Characteristics. *Annu Rev Genet* **1975**, *9*, 19–38, doi:10.1146/annurev.ge.09.120175.000315.
95. Arlett, C.F.; Lehmann, A.R. Human Disorders Showing Increased Sensitivity to the Induction of Genetic Damage. *Annu Rev Genet* **1978**, *12*, 95–115, doi:10.1146/annurev.ge.12.120178.000523.

96. Shivji, M.K.K.; Eker, A.P.M.; Wood, R.D. DNA Repair Defect in Xeroderma Pigmentosum Group C and Complementing Factor from HeLa Cells. *Journal of Biological Chemistry* **1994**, *269*, 22749–22757, doi:10.1016/s0021-9258(17)31709-x.
97. D'Errico, M.; Parlanti, E.; Teson, M.; de Jesus, B.M.B.; Degan, P.; Calcagnile, A.; Jaruga, P.; Bjørås, M.; Crescenzi, M.; Pedrini, A.M.; et al. New Functions of XPC in the Protection of Human Skin Cells from Oxidative Damage. *EMBO Journal* **2006**, *25*, 4305–4315, doi:10.1038/sj.emboj.7601277.
98. Fayyad, N.; Kobaisi, F.; Beal, D.; Mahfouf, W.; Ged, C.; Morice-Picard, F.; Fayyad-Kazan, M.; Fayyad-Kazan, H.; Badran, B.; Rezvani, H.R.; et al. Xeroderma Pigmentosum C (XPC) Mutations in Primary Fibroblasts Impair Base Excision Repair Pathway and Increase Oxidative DNA Damage. *Front Genet* **2020**, *11*, 1–13, doi:10.3389/fgene.2020.561687.
99. Masi, A.; Fortini, P.; Krokidis, M.G.; Romeo, E.F.; Bascietto, C.; De Angelis, P.; Guglielmi, V.; Chatgililoglu, C. Increased Levels of 5',8-Cyclopurine DNA Lesions in Inflammatory Bowel Diseases. *Redox Biol* **2020**, *34*, 101562, doi:10.1016/j.redox.2020.101562.
100. Bukowska, B.; Karwowski, B.T. The Clustered DNA Lesions - Types, Pathways of Repair and Relevance to Human Health. *Curr Med Chem* **2018**, *25*, 2722–2735, doi:10.2174/0929867325666180226110502.
101. In, S.H.; Carter, K.N.; Sato, K.; Greenberg, M.M. Characterization and Mechanism of Formation of Tandem Lesions in DNA by a Nucleobase Peroxyl Radical. *J Am Chem Soc* **2007**, *129*, 4089–4098, doi:10.1021/ja0692276.
102. Ho, E.L.Y.; Parent, M.; Satoh, M.S. Induction of Base Damages Representing a High Risk Site for Double-Strand DNA Break Formation in Genomic DNA by Exposure of Cells to DNA Damaging Agents. *Journal of Biological Chemistry* **2007**, *282*, 21913–21923, doi:10.1074/jbc.M610651200.
103. Pachnerová Brabcová, K.; Sihver, L.; Yasuda, N.; Matuo, Y.; Štěpán, V.; Davidková, M. Clustered DNA Damage on Subcellular Level: Effect of Scavengers. *Radiat Environ Biophys* **2014**, *53*, 705–712, doi:10.1007/s00411-014-0557-2.
104. Goodhead, D.T.; Munson, R.J.; Thacker, J.; Cox, R. Mutation and Inactivation of Cultured Mammalian Cells Exposed to Beams of Accelerated Heavy Ions. IV. Biophysical Interpretation. *Int J Radiat Biol Relat Stud Phys Chem Med* **1980**, *37*, 135–167, doi:10.1080/09553008014550201.
105. Prise, K.M.; Pullar, C.H.; Michael, B.D. A Study of Endonuclease III-Sensitive Sites in Irradiated DNA: Detection of Alpha-Particle-Induced Oxidative Damage. *Carcinogenesis* **1999**, *20*, 905–909, doi:10.1093/carcin/20.5.905.
106. Ward, J.F. Some Biochemical Consequences of the Spatial Distribution of Ionizing Radiation-Produced Free Radicals. *Radiat Res* **1981**, *86*, 185–195.

107. Lomax, M.E.; Gulston, M.K.; O'Neill, P. Chemical Aspects of Clustered DNA Damage Induction by Ionising Radiation. *Radiat Prot Dosimetry* **2002**, *99*, 63–68, doi:10.1093/oxfordjournals.rpd.a006840.
108. David-Cordonnier, M.H.; Cunniffe, S.M.T.; Hickson, I.D.; O'Neill, P. Efficiency of Incision of an AP Site within Clustered DNA Damage by the Major Human AP Endonuclease. *Biochemistry* **2002**, *41*, 634–642, doi:10.1021/bi011682l.
109. Lomax, M.E.; Salje, H.; Cunniffe, S.; O'Neill, P. 8-OxoA Inhibits the Incision of an AP Site by the DNA Glycosylases Fpg, Nth and the AP Endonuclease HAP1. *Radiat Res* **2005**, *163*, 79–84.
110. Cunniffe, S.; Walker, A.; Stabler, R.; O'Neill, P.; Lomax, M.E. Increased Mutability and Decreased Repairability of a Three-Lesion Clustered DNA-Damaged Site Comprised of an AP Site and Bi-Stranded 8-OxoG Lesions. *Int J Radiat Biol* **2014**, *90*, 468–479, doi:10.3109/09553002.2014.899449.
111. Sage, E.; Harrison, L. Clustered DNA Lesion Repair in Eukaryotes: Relevance to Mutagenesis and Cell Survival. *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* **2011**, *711*, 123–133, doi:10.1016/j.mrfmmm.2010.12.010.
112. Sage, E.; Shikazono, N. Radiation-Induced Clustered DNA Lesions: Repair and Mutagenesis. *Free Radic Biol Med* **2017**, *107*, 125–135, doi:10.1016/j.freeradbiomed.2016.12.008.
113. Lomax, M.E.; Cunniffe, S.; O'Neill, P. 8-OxoG Retards the Activity of the Ligase III/XRCC1 Complex during the Repair of a Single-Strand Break, When Present within a Clustered DNA Damage Site. *DNA Repair (Amst)* **2004**, *3*, 289–299, doi:10.1016/J.DNAREP.2003.11.006.
114. Esadze, A.; Rodriguez, G.; Cravens, S.L.; Stivers, J.T. AP-Endonuclease 1 Accelerates Turnover of Human 8-Oxoguanine DNA Glycosylase by Preventing Retrograde Binding to the Abasic-Site Product. *Biochemistry* **2017**, *56*, 1974–1986, doi:10.1021/acs.biochem.7b00017.
115. Eccles, L.J.; Lomax, M.E.; O'Neill, P. Hierarchy of Lesion Processing Governs the Repair, Double-Strand Break Formation and Mutability of Three-Lesion Clustered DNA Damage. *Nucleic Acids Res* **2009**, *38*, 1123–1134, doi:10.1093/nar/gkp1070.
116. Merez, A.; Karwowski, B.T. DNA Tandem Lesion: 5',8-Cyclo-2'-Deoxyadenosine. The Influence on Human Health. *Mol Biol* **2016**, *50*, 793–798, doi:10.1134/S0026893316050125.
117. Boguszewska, K.; K azmierczak-Barańska, J.; Karwowski, B.T. The Influence of 5',8-Cyclo-2'-Deoxypurines on the Mitochondrial Repair of Clustered Dna Damage in Xrs5 Cells: The Preliminary Study. *Molecules* **2021**, *26*, doi:10.3390/molecules26227042.
118. K azmierczak-Barańska, J.; Boguszewska, K.; Szewczuk, M.; Karwowski, B.T. Effects of 5',8'-Cyclo-2'-Deoxypurines on the Base Excisionrepair of Clustered Dna Lesions in Nuclear Extracts of the Xpc Cell Line. *Cells* **2021**, *10*, doi:10.3390/cells10113254.

119. 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*, doi:10.3390/molecules26175177.
120. Szewczuk, M.; Karwowski, B. The Influence of cdG on 8-OxodG Excision by OGG1 and FPG Glycosylases. *Acta Biochim Pol* **2022**, doi:10.18388/abp.2020\_5966.
121. Karwowski, B.T. (5'S) 5',8-Cyclo-2'-Deoxyadenosine Cannot Stop BER. Clustered DNA Lesion Studies. *Int J Mol Sci* **2021**, *22*, 5934, doi:10.3390/ijms22115934.
122. Mourgues, S.; Lomax, M.E.; O'Neill, P. Base Excision Repair Processing of Abasic Site/Single-Strand Break Lesions within Clustered Damage Sites Associated with XRCC1 Deficiency. *Nucleic Acids Res* **2007**, *35*, 7676–7687, doi:10.1093/nar/gkm947.
123. Lomax, M.E.; Folkes, L.K.; O'Neill, P. Biological Consequences of Radiation-Induced DNA Damage: Relevance to Radiotherapy. *Clin Oncol* **2013**, *25*, 578–585, doi:10.1016/j.clon.2013.06.007.
124. Alnajjar, K.S.; Sweasy, J.B. A New Perspective on Oxidation of DNA Repair Proteins and Cancer. *DNA Repair (Amst)* **2019**, *76*, 60–69, doi:10.1016/j.dnarep.2019.02.006.
125. Zhang, M.; Wang, L.; Zhong, D. Photolyase: Dynamics and Mechanisms of Repair of Sun-Induced DNA Damage. *Photochem Photobiol* **2017**, *93*, 78–92, doi:10.1111/php.12695.
126. Bukowska, B.; Karwowski, B.T. Actual State of Knowledge in the Field of Diseases Related with Defective Nucleotide Excision Repair. *Life Sci* **2018**, *195*, 6–18, doi:10.1016/j.lfs.2017.12.035.
127. Omar García-Lepe, U.; Ma Bermúdez-Cruz, R. Mitochondrial Genome Maintenance: Damage and Repair Pathways. In *DNA Repair- An Update*; IntechOpen, 2019.
128. Popławski, T.; Błasiak, J. [Mismatch Repair]. *Postepy Biochem* **2003**, *49*, 126–135.
129. Chiruvella, K.K.; Liang, Z.; Wilson, T.E. Repair of Double-Strand Breaks by End Joining. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **2013**, *5*, doi:10.1101/cshperspect.a012757.
130. Zinovkina, L.A. Mechanisms of Mitochondrial DNA Repair in Mammals. *Biochemistry (Moscow)* **2018**, *83*, 233–249, doi:10.1134/s0006297918030045.
131. Izumi, T.; Mellon, I. Base Excision Repair and Nucleotide Excision Repair. In *Genome Stability: From Virus to Human Application*; Elsevier Inc., 2016; pp. 275–302 ISBN 9780128033456.
132. Krokan, H.E.; Bjørås, M. Base Excision Repair. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **2013**, *5*, 1–23, doi:10.1101/cshperspect.a012583.
133. Singatulina, A.S.; Pestryakov, P.E. Mechanisms of DNA Repair in Mitochondria. *Biopolym Cell* **2016**, *32*, 245–261, doi:10.7124/bc.000927.
134. Wallace, S. Base Excision Repair: A Critical Player in Many Games. *DNA Repair (Amst)* **2014**, *19*, 14–26, doi:10.1002/cyto.a.20594.Use.

135. Copeland, W.C. The Mitochondrial DNA Polymerase in Health and Disease. *Subcell Biochem* **2010**, *50*, 17–42, doi:10.1007/978-90-481-3471-7.
136. Bohr, V.A.; Anson, R.M. Mitochondrial DNA Repair Pathways. *J Bioenerg Biomembr* **1999**, *31*.
137. Gredilla, R. DNA Damage and Base Excision Repair in Mitochondria and Their Role in Aging. *J Aging Res* **2011**, *2011*, 7–9, doi:10.4061/2011/257093.
138. Sia, E.A. Mitochondrial DNA Repair and Damage Tolerance. *Frontiers in Bioscience* **2016**, *22*, 920–943, doi:10.2741/4525.
139. Alexeyev, M.; Shokolenko, I.; Wilson, G.; LeDoux, S. The Maintenance of Mitochondrial DNA Integrity - Critical Analysis and Update. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **2013**, *5*, doi:10.1101/cshperspect.a012641.
140. Oliński, R.; Jurgowiak, M. Czy w Mitochondriach Działają Skuteczne Mechanizmy Naprawy DNA? Mechanisms of DNA Repair — Are They Effective in Mitochondria? *Postepy Biochem* **2001**, *1*, 85–92.
141. van der Veen, S.; Tang, C.M. The BER Necessities: The Repair of DNA Damage in Human-Adapted Bacterial Pathogens. *Nat Rev Microbiol* **2015**, *13*, 83–94, doi:10.1038/nrmicro3391.
142. 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*, 1–30, doi:10.3390/molecules25122857.
143. Prakash, A.; Doublet, S. Base Excision Repair in the Mitochondria. *Journal of Cell Biochemistry* **2015**, *116*, 1490–1499, doi:10.1002/jcb.25103.Base.
144. Krokan, H.E.; Otterlei, M.; Nilsen, H.; Kavli, B.; Skorpen, F.; Andersen, S.; Skjelbred, C.; Akbari, M.; Aas, P.A.; Slupphaug, G. Properties and Functions of Human Uracil-DNA Glycosylase from the UNG Gene. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* **2001**, *68*, 365–386, doi:10.1016/s0079-6603(01)68112-1.
145. Akbari, M.; Otterlei, M.; Peña-Díaz, J.; Krokan, H.E. Different Organization of Base Excision Repair of Uracil in DNA in Nuclei and Mitochondria and Selective Upregulation of Mitochondrial Uracil-DNA Glycosylase after Oxidative Stress. *Neuroscience* **2007**, *145*, 1201–1212, doi:10.1016/j.neuroscience.2006.10.010.
146. Krokan, H.E.; Drabløs, F.; Slupphaug, G. Uracil in DNA—Occurrence, Consequences and Repair. *Oncogene* **2002**, *21*, 8935–8948, doi:10.1038/sj.onc.
147. Abbotts, R.; Madhusudan, S. Human AP Endonuclease 1 (APE1): From Mechanistic Insights to Druggable Target in Cancer. *Cancer Treat Rev* **2010**, *36*, 425–435, doi:10.1016/j.ctrv.2009.12.006.
148. Krasich, R.; Copeland, W.C. DNA Polymerases in the Mitochondria: A Critical Review of the Evidence. *Frontiers in Bioscience* **2017**, *22*, 692–709, doi:10.1016/j.physbeh.2017.03.040.

149. Kotrys, A. v.; Szczesny, R.J. Mitochondrial Gene Expression and Beyond—Novel Aspects of Cellular Physiology. *Cells* **2020**, *9*, 17, doi:10.3390/cells9010017.
150. Muftuoglu, M.; Mori, M.P.; Souza-Pinto, N.C. de Formation and Repair of Oxidative Damage in the Mitochondrial DNA. *Mitochondrion* **2014**, *17*, 164–181, doi:10.1016/j.mito.2014.03.007.
151. de Souza-Pinto, N.C.; Aamann, M.D.; Kulikowicz, T.; Stevnsner, T. v.; Bohr, V.A. Mitochondrial Helicases and Mitochondrial Genome Maintenance. *Mech Ageing Dev* **2010**, *131*, 503–510, doi:10.1038/jid.2014.371.
152. Steele, H.E.; Horvath, R.; Lyon, J.J.; Chinnery, P.F. Monitoring Clinical Progression with Mitochondrial Disease Biomarkers. *Brain* **2017**, *140*, 2530–2540, doi:10.1093/brain/awx168.
153. Burke, P.J. Mitochondria, Bioenergetics & Apoptosis in Cancer. *Trends Cancer* **2017**, *3*, 857–870, doi:10.1016/j.physbeh.2017.03.040.
154. Meyer, A.; Laverny, G.; Bernardi, L.; Charles, A.L.; Alsaleh, G.; Pottecher, J.; Sibia, J.; Geny, B. Mitochondria: An Organelle of Bacterial Origin Controlling Inflammation. *Front Immunol* **2018**, *9*, 1–8, doi:10.3389/fimmu.2018.00536.
155. Stefani, D. de; Raffaello, A.; Teardo, E.; Szabò, I.; Rizzuto, R. A 40 KDa Protein of the Inner Membrane Is the Mitochondrial Calcium Uniporter. *Nature* **2011**, *476*, 336–340, doi:10.1038/nature10230.A.
156. Lill, R.; Hoffmann, B.; Molik, S.; Pierik, A.J.; Rietzschel, N.; Stehling, O.; Uzarska, M.A.; Webert, H.; Wilbrecht, C.; Mühlenhoff, U. The Role of Mitochondria in Cellular Iron-Sulfur Protein Biogenesis and Iron Metabolism. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res* **2012**, *1823*, 1491–1508, doi:10.1016/j.bbamcr.2012.05.009.
157. Veatch, J.R.; McMurray, M.A.; Nelson, Z.W.; Gottschling, D.E. Mitochondrial Dysfunction Leads to Nuclear Genome Instability: A Link through Iron-Sulfur Clusters. *Cell* **2009**, *137*, 1247–1258, doi:10.1038/jid.2014.371.
158. Garcia, I.; Jones, E.; Ramos, M.; Innis-Whitehouse, W.; Gilkerson, R. The Little Big Genome: The Organization of Mitochondrial DNA. *Front Biosci (Landmark Ed)* **2017**, *22*, 710–721, doi:10.2741/4511.
159. Stroud, D.A.; Surgenor, E.E.; Formosa, L.E.; Reljic, B.; Frazier, A.E.; Dibley, M.G.; Osellame, L.D.; Stait, T.; Beilharz, T.H.; Thorburn, D.R.; et al. Accessory Subunits Are Integral for Assembly and Function of Human Mitochondrial Complex i. *Nature* **2016**, *538*, 123–126, doi:10.1038/nature19754.
160. Sousa, J.S.; D’Imprima, E.; Vonck, J. Mitochondrial Respiratory Chain Complexes. In *Subcellular Biochemistry*; 2018; Vol. 87, pp. 167–227.



161. Wasilewski, M.; Chojnacka, K.; Chacinska, A. Protein Trafficking at the Crossroads to Mitochondria. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res* **2017**, *1864*, 125–137, doi:10.1016/j.bbamcr.2016.10.019.
162. Topf, U.; Uszczyńska-Ratajczak, B.; Chacinska, A. Mitochondrial Stress-Dependent Regulation of Cellular Protein Synthesis. *J Cell Sci* **2019**, *132*, doi:10.1242/jcs.226258.
163. Gustafsson, C.M.; Falkenberg, M.; Larsson, N.-G. Maintenance and Expression of Mammalian Mitochondrial DNA. *Annu Rev Biochem* **2016**, *85*, 133–160, doi:10.1146/annurev-biochem-060815-014402.
164. Allen, J.F. Why Chloroplasts and Mitochondria Retain Their Own Genomes and Genetic Systems: Colocation for Redox Regulation of Gene Expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2015**, *112*, 10231–10238, doi:10.1073/pnas.1500012112.
165. Björkholm, P.; Ernst, A.M.; Hagström, E.; Andersson, S.G.E. Why Mitochondria Need a Genome Revisited. *FEBS Lett* **2017**, *591*, 65–75, doi:10.1002/1873-3468.12510.
166. Posse, V.; Shahzad, S.; Falkenberg, M.; Hällberg, B.M.; Gustafsson, C.M. TEFM Is a Potent Stimulator of Mitochondrial Transcription Elongation in Vitro. *Nucleic Acids Res* **2015**, *43*, 2615–2624, doi:10.1093/nar/gkv105.
167. Canugovi, C.; Maynard, S.; Bayne, A.C. v; Sykora, P.; Tian, J.; de Souza-Pinto, N.C.; Croteau, D.L.; Bohr, V.A. The Mitochondrial Transcription Factor A Functions in Mitochondrial Base Excision Repair. *DNA Repair (Amst)* **2010**, *9*, 1080–1089, doi:10.1016/j.dnarep.2010.07.009.
168. Wang, Y.; Bogenhagen, D.F. Human Mitochondrial DNA Nucleoids Are Linked to Protein Folding Machinery and Metabolic Enzymes at the Mitochondrial Inner Membrane. *Journal of Biological Chemistry* **2006**, *281*, 25791–25802, doi:10.1074/jbc.M604501200.
169. Bonekamp, N.A.; Larsson, N.G. SnapShot: Mitochondrial Nucleoid. *Cell* **2018**, *172*, 388-388.e1, doi:10.1016/j.cell.2017.12.039.
170. Zheng, W.; Khrapko, K.; Collier, H.A.; Thilly, W.G.; Copeland, W.C. Origins of Human Mitochondrial Point Mutations as DNA Polymerase  $\gamma$ -Mediated Errors. *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* **2006**, *599*, 11–20, doi:10.1016/j.mrfmmm.2005.12.012.
171. Lee, S.R.; Han, J. Mitochondrial Nucleoid: Shield and Switch of the Mitochondrial Genome. *Oxid Med Cell Longev* **2017**, *2017*, 1–15, doi:10.1155/2017/8060949.
172. Karwowski, B.T. 5'8-Cyklo-Deoksyadenozyna. Podwójne Uszkodzenie w Obrębie Pojedynczego Nukleozydu/Nukleotydu. In *Wiadomości chemiczne*; 2010; Vol. 64, pp. 1013–1048 ISBN 0043-5104.
173. Gorman, G.S.; Schaefer, A.M.; Ng, Y.; Gomez, N.; Blakely, E.L.; Alston, C.L.; Feeney, C.; Horvath, R.; Yu-Wai-Man, P.; Chinnery, P.F.; et al. Prevalence of Nuclear and Mitochondrial DNA

- Mutations Related to Adult Mitochondrial Disease. *Ann Neurol* **2015**, *77*, 753–759, doi:10.1002/ana.24362.
174. Gorman, G.S.; Chinnery, P.F.; DiMauro, S.; Hirano, M.; Koga, Y.; McFarland, R.; Suomalainen, A.; Thorburn, D.R.; Zeviani, M.; Turnbull, D.M. Mitochondrial Diseases. *Nat Rev Dis Primers* **2016**, *2*, 1–23, doi:10.1038/nrdp.2016.80.
175. Ryan, M.T. Mitochondria – The Energy Powerhouses. *Semin Cell Dev Biol* **2018**, *76*, 130–131, doi:10.1016/j.semcdb.2017.09.038.
176. Fakouri, N.B.; Hou, Y.; Demarest, T.G.; Christiansen, L.S.; Okur, M.N.; Mohanty, J.G.; Croteau, D.L.; Bohr, V.A. Toward Understanding Genomic Instability, Mitochondrial Dysfunction and Aging. *FEBS Journal* **2019**, *286*, 1058–1073, doi:10.1111/febs.14663.
177. Son, J.M.; Lee, C. Mitochondria: Multifaceted Regulators of Aging. *BMB Rep* **2019**, *52*, 13–23, doi:10.5483/BMBRep.2019.52.1.300.
178. López-Lluch, G.; Santos-Ocaña, C.; Sánchez-Alcázar, J.A.; Fernández-Ayala, D.J.M.; Asencio-Salcedo, C.; Rodríguez-Aguilera, J.C.; Navas, P. Mitochondrial Responsibility in Ageing Process: Innocent, Suspect or Guilty. *Biogerontology* **2015**, *16*, 599–620, doi:10.1007/s10522-015-9585-9.
179. Abolhassani, N.; Leon, J.; Sheng, Z.; Oka, S.; Hamasaki, H.; Iwaki, T.; Nakabeppu, Y. Molecular Pathophysiology of Impaired Glucose Metabolism, Mitochondrial Dysfunction, and Oxidative DNA Damage in Alzheimer's Disease Brain. *Mech Ageing Dev* **2017**, *161*, 95–104, doi:10.1016/j.mad.2016.05.005.
180. Elfawy, H.A.; Das, B. Crosstalk between Mitochondrial Dysfunction, Oxidative Stress, and Age Related Neurodegenerative Disease: Etiologies and Therapeutic Strategies. *Life Sci* **2019**, *218*, 165–184, doi:10.1016/j.lfs.2018.12.029.
181. Akbari, M.; Morevati, M.; Croteau, D.; Bohr, V.A. The Role of DNA Base Excision Repair in Brain Homeostasis and Disease. *DNA Repair (Amst)* **2015**, *32*, 172–179, doi:10.1016/j.dnarep.2015.04.029.
182. Leandro, G.S.; Sykora, P.; Bohr, V.A. The Impact of Base Excision DNA Repair in Age-Related Neurodegenerative Diseases. *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* **2015**, *776*, 31–39, doi:10.1016/j.mrfmmm.2014.12.011.
183. Martín Giménez, V.M.; de las Heras, N.; Ferder, L.; Lahera, V.; Reiter, R.J.; Manucha, W. Potential Effects of Melatonin and Micronutrients on Mitochondrial Dysfunction during a Cytokine Storm Typical of Oxidative/Inflammatory Diseases. *Diseases* **2021**, *9*, 30, doi:10.3390/diseases9020030.
184. Tuppen, H.A.L.; Blakely, E.L.; Turnbull, D.M.; Taylor, R.W. Mitochondrial DNA Mutations and Human Disease. *Biochim Biophys Acta Bioenerg* **2010**, *1797*, 113–128, doi:10.1016/j.bbabi.2009.09.005.

185. Głowacki, S.; Błasiak, J. [Mutagenesis of Mitochondrial DNA]. *Postepy Biochem* **2012**, *58*, 265–272.
186. Blasiak, J.; Glowacki, S.; Kauppinen, A.; Kaarniranta, K. Mitochondrial and Nuclear DNA Damage and Repair in Age-Related Macular Degeneration. *Int J Mol Sci* **2013**, *14*, 2996–3010, doi:10.3390/ijms14022996.
187. Hahn, A.; Zuryn, S. The Cellular Mitochondrial Genome Landscape in Disease. *Trends Cell Biol* **2019**, *29*, 227–240, doi:10.1016/j.tcb.2018.11.004.
188. Craven, L.; Alston, C.L.; Taylor, R.W.; Turnbull, D.M. Recent Advances in Mitochondrial Disease. *Annu Rev Genomics Hum Genet* **2017**, *18*, 257–275, doi:10.1146/annurev-genom-091416-035426.
189. Reznik, E.; Miller, M.L.; Şenbabaoğlu, Y.; Riaz, N.; Sarungbam, J.; Tickoo, S.K.; Al-Ahmadie, H.A.; Lee, W.; Seshan, V.E.; Hakimi, A.A.; et al. Mitochondrial DNA Copy Number Variation across Human Cancers. *Elife* **2016**, *5*, 1–20, doi:10.7554/eLife.10769.
190. Chen, J.; Zhang, L.; Yu, X.; Zhou, H.; Luo, Y.; Wang, W.; Wang, L. Clinical Application of Plasma Mitochondrial DNA Content in Patients with Lung Cancer. *Oncol Lett* **2018**, *16*, 7074–7081, doi:10.3892/ol.2018.9515.
191. Lee, H.C.; Li, S.H.; Lin, J.C.; Wu, C.C.; Yeh, D.C.; Wei, Y.H. Somatic Mutations in the D-Loop and Decrease in the Copy Number of Mitochondrial DNA in Human Hepatocellular Carcinoma. *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* **2004**, *547*, 71–78, doi:10.1016/j.mrfmmm.2003.12.011.
192. Shoshan, M. On Mitochondrial Metabolism in Tumor Biology. *Curr Opin Oncol* **2017**, *29*, 48–54, doi:10.1097/CCO.0000000000000336.
193. Martin, O.A.; Martin, R.F. Cancer Radiotherapy: Understanding the Price of Tumor Eradication. *Front Cell Dev Biol* **2020**, *8*, doi:10.3389/fcell.2020.00261.
194. Hanna, B.M.F.; Helleday, T.; Cázares-Körner, A.; Benitez-Buelga, C.; Visnes, T.; Grube, M. Targeting BER Enzymes in Cancer Therapy. *DNA Repair (Amst)* **2018**, *71*, 118–126, doi:10.1016/j.dnarep.2018.08.015.
195. Gong, L.; Zhang, Y.; Liu, C.; Zhang, M.; Han, S. Application of Radiosensitizers in Cancer Radiotherapy. *Int J Nanomedicine* **2021**, *16*, 1083–1102, doi:10.2147/IJN.S290438.
196. Herath, N.I.; Berthault, N.; Thierry, S.; Jdey, W.; Lienafa, M.C.; Bono, F.; Nogueiez-Hellin, P.; Sun, J.S.; Dutreix, M. Preclinical Studies Comparing Efficacy and Toxicity of DNA Repair Inhibitors, Olaparib, and AsiDNA, in the Treatment of Carboplatin-Resistant Tumors. *Front Oncol* **2019**, *9*, doi:10.3389/fonc.2019.01097.
197. Jdey, W.; Thierry, S.; Russo, C.; Devun, F.; al Abo, M.; Nogueiez-Hellin, P.; Sun, J.S.; Barillot, E.; Zinovyev, A.; Kuperstein, I.; et al. Drug-Driven Synthetic Lethality: Bypassing Tumor Cell

- Genetics with a Combination of AsiDNA and PARP Inhibitors. *Clinical Cancer Research* **2017**, *23*, 1001–1011, doi:10.1158/1078-0432.CCR-16-1193.
198. Gökirmak, T.; Nikan, M.; Wiechmann, S.; Prakash, T.P.; Tanowitz, M.; Seth, P.P. Overcoming the Challenges of Tissue Delivery for Oligonucleotide Therapeutics. *Trends Pharmacol Sci* **2021**, *42*, 588–604, doi:10.1016/j.tips.2021.04.010.
199. Hammond, S.M.; Aartsma-Rus, A.; Alves, S.; Borgos, S.E.; Buijssen, R.A.M.; Collin, R.W.J.; Covello, G.; Denti, M.A.; Desviat, L.R.; Echevarría, L.; et al. Delivery of Oligonucleotide-based Therapeutics: Challenges and Opportunities. *EMBO Mol Med* **2021**, *13*, doi:10.15252/emmm.202013243.
200. Ferreira, S.; Foray, C.; Gatto, A.; Larcher, M.; Heinrich, S.; Lupu, M.; Mispelter, J.; Boussin, F.D.; Pouponnot, C.; Dutreix, M. AsiDNA Is a Radiosensitizer with No Added Toxicity in Medulloblastoma Pediatric Models. *Clinical Cancer Research* **2021**, *26*, 5735–5746, doi:10.1158/1078-0432.CCR-20-1729.
201. Johannes, L.; Lucchino, M. Current Challenges in Delivery and Cytosolic Translocation of Therapeutic RNAs. *Nucleic Acid Ther* **2018**, *28*, 178–193, doi:10.1089/nat.2017.0716.
202. Topf, U.; Wrobel, L.; Chacinska, A. Chatty Mitochondria: Keeping Balance in Cellular Protein Homeostasis. *Trends Cell Biol* **2016**, *26*, 577–586.
203. Chacinska, A.; Rehling, P. Moving Proteins from the Cytosol into Mitochondria. *Biochem Soc Trans* **2004**, *32*, 774–776, doi:10.1042/BST0320774.
204. Eccles, L.J.; O'Neill, P.; Lomax, M.E. Delayed Repair of Radiation Induced Clustered DNA Damage: Friend or Foe? *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* **2011**, *711*, 134–141, doi:10.1016/j.mrfmmm.2010.11.003.
205. Krokan, H.E.; Standal, R.; Slupphaug, G. DNA Glycosylases in the Base Excision Repair of DNA. *Biochem J* **1997**, *325* ( Pt 1), 1–16, doi:10.1042/bj3250001.
206. Jimenez, L.B.; Encinas, S.; Chatgililoglu, C.; Miranda, M.A. Solar One-Way Photoisomerisation of 5',8-Cyclo-2'-Deoxyadenosine. *Org Biomol Chem* **2008**, *6*, 1083–1086, doi:10.1039/b718222h.
207. David-Cordonnier, M.H.; Boiteux, S.; O'Neill, P. Efficiency of Excision of 8-Oxo-Guanine within DNA Clustered Damage by XRS5 Nuclear Extracts and Purified Human OGG1 Protein. *Biochemistry* **2001**, *40*, 11811–11818, doi:10.1021/bi0112356.
208. Frosina, G.; Fortini, P.; Rossi, O.; Carrozzino, F.; Raspaglio, G.; Cox, L.S.; Lane, D.P.; Abbondandolo, A.; Dogliotti, E. Two Pathways for Base Excision Repair in Mammalian Cells. *Journal of Biological Chemistry* **1996**, *271*, 9573–9578, doi:10.1074/jbc.271.16.9573.

209. Karwowski, B.T. The Role of (5'R) and (5'S) 5',8-Cyclo-2'-Deoxyadenosine in Ds-DNA Structure. A Comparative QM/MM Theoretical Study. *Comput Theor Chem* **2013**, *1010*, 38–44, doi:10.1016/j.comptc.2013.01.014.
210. Kant, M.; Akış, M.; Çalan, M.; Arkan, T.; Bayraktar, F.; Dizdaroglu, M.; İşlek, H. Elevated Urinary Levels of 8-Oxo-2'-Deoxyguanosine, (5'R)- and (5'S)-8,5'-Cyclo-2'-Deoxyadenosines, and 8-Iso-Prostaglandin F<sub>2α</sub> as Potential Biomarkers of Oxidative Stress in Patients with Prediabetes. *DNA Repair (Amst)* **2016**, *48*, 1–7, doi:10.1016/j.dnarep.2016.09.004.
211. Jaruga, P.; Dizdaroglu, M. Identification and Quantification of (5'R)- and (5'S)-8,5'-Cyclo-2'-Deoxyadenosines in Human Urine as Putative Biomarkers of Oxidatively Induced Damage to DNA. *Biochem Biophys Res Commun* **2010**, *397*, 48–52, doi:10.1016/j.bbrc.2010.05.050.
212. Barchiesi, A.; Bazzani, V.; Tolotto, V.; Elancheliyan, P.; Wasilewski, M.; Chacinska, A.; Vascotto, C. Mitochondrial Oxidative Stress Induces Rapid Intermembrane Space/Matrix Translocation of Apurinic/Apyrimidinic Endonuclease 1 Protein through TIM23 Complex. *J Mol Biol* **2020**, *432*, doi:10.1016/j.jmb.2020.11.012.
213. Baptiste, B.A.; Baringer, S.L.; Kulikowicz, T.; Sommers, J.A.; Croteau, D.L.; Brosh, R.M.; Bohr, V.A. DNA Polymerase β Outperforms DNA Polymerase γ in Key Mitochondrial Base Excision Repair Activities. *DNA Repair (Amst)* **2021**, *99*, doi:10.1016/j.dnarep.2021.103050.
214. Cunniffe, S.; O'Neill, P.; Greenberg, M.M.; Lomax, M.E. Reduced Repair Capacity of a DNA Clustered Damage Site Comprised of 8-Oxo-7,8-Dihydro-2'-Deoxyguanosine and 2-Deoxyriboflavone Results in an Increased Mutagenic Potential of These Lesions. *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* **2014**, *762*, 32–39, doi:10.1016/j.mrfmmm.2014.02.005.
215. Pearson, C.G.; Shikazono, N.; Thacker, J.; O'Neill, P. Enhanced Mutagenic Potential of 8-Oxo-7,8-Dihydroguanine When Present within a Clustered DNA Damage Site. *Nucleic Acids Res* **2004**, *32*, 263–270, doi:10.1093/nar/gkh150.
216. Shikazono, N.; Pearson, C.; O'Neill, P.; Thacker, J. The Roles of Specific Glycosylases in Determining the Mutagenic Consequences of Clustered DNA Base Damage. *Nucleic Acids Res* **2006**, *34*, 3722–3730, doi:10.1093/nar/gkl503.
217. Harrison, L.; Brame, K.L.; Geltz, L.E.; Landry, A.M. Closely Opposed Apurinic/Apyrimidinic Sites Are Converted to Double Strand Breaks in Escherichia Coli Even in the Absence of Exonuclease III, Endonuclease IV, Nucleotide Excision Repair and AP Lyase Cleavage. *DNA Repair (Amst)* **2006**, *5*, 324–335, doi:10.1016/j.dnarep.2005.10.009.

218. Cunniffe, S.M.T.; Lomax, M.E.; O'Neill, P. An AP Site Can Protect against the Mutagenic Potential of 8-OxoG When Present within a Tandem Clustered Site in E. Coli. *DNA Repair (Amst)* **2007**, *6*, 1839–1849, doi:10.1016/j.DNAREP.2007.07.003.
219. Chaudhry, M.A.; Weinfeld, M. Reactivity of Human Apurinic/Apyrimidinic Endonuclease and Escherichia Coli Exonuclease III with Bistranded Abasic Sites in DNA. *Journal of Biological Chemistry* **1997**, *272*, 15650–15655, doi:10.1074/jbc.272.25.15650.
220. Boguszewska, K.; Kaźmierczak-Barańska, J.; Karwowski, B.T. Mutagenicity of a Bi-Stranded Clustered DNA Lesion Containing (5'S) or (5'R) 5',8-Cyclo-2'-DeoxyAdenosine in Escherichia Coli Model. *Acta Biochim Pol* **2022**, *69*, 865–869, doi:10.18388/abp.2020\_6382.
221. Van Houten, B.; Croteau, D.L.; DellaVecchia, M.J.; Wang, H.; Kisker, C. 'Close-Fitting Sleeves': DNA Damage Recognition by the UvrABC Nuclease System. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* **2005**, *577*, 92–117, doi:10.1016/j.mrfmmm.2005.03.013.
222. Truglio, J.J.; Croteau, D.L.; van Houten, B.; Kisker, C. Prokaryotic Nucleotide Excision Repair: The UvrABC System. *Chem Rev* **2006**, *106*, 233–252, doi:10.1021/cr040471u.
223. Jaciuk, M.; Swiec, P.; Gaur, V.; Kasprzak, J.M.; Renault, L.; Dobrychłop, M.; Nirwal, S.; Bujnicki, J.M.; Costa, A.; Nowotny, M. A Combined Structural and Biochemical Approach Reveals Translocation and Stalling of UvrB on the DNA Lesion as a Mechanism of Damage Verification in Bacterial Nucleotide Excision Repair. *DNA Repair (Amst)* **2020**, *85*, doi:10.1016/j.dnarep.2019.102746.
224. Kraithong, T.; Hartley, S.; Jeruzalmi, D.; Pakotiprapha, D. A Peek inside the Machines of Bacterial Nucleotide Excision Repair. *Int J Mol Sci* **2021**, *22*, 1–20, doi:10.3390/ijms22020952.
225. Zou, Y.; Shell, S.M.; Utzat, C.D.; Luo, C.; Yang, Z.; Geacintov, N.E.; Basu, A.K. Effects of DNA Adduct Structure and Sequence Context on Strand Opening of Repair Intermediates and Incision by UvrABC Nuclease. *Biochemistry* **2003**, *42*, 12654–12661, doi:10.1021/bi034446e.
226. Jung, K.Y.; Kodama, T.; Greenberg, M.M. Repair of the Major Lesion Resulting from C5'-Oxidation of DNA. *Biochemistry* **2011**, *50*, 6273–6279, doi:10.1021/bi200787e.
227. Dizdaroglu, M.; Jaruga, P. Mechanisms of Free Radical-Induced Damage to DNA. *Free Radic Res* **2012**, *46*, 382–419, doi:10.3109/10715762.2011.653969.
228. Wang, J.; Clauson, C.L.; Robbins, P.D.; Niedernhofer, L.J.; Wang, Y. The Oxidative DNA Lesions 8,5'-Cyclopurines Accumulate with Aging in a Tissue-Specific Manner. *Aging Cell* **2012**, *11*, 714–716, doi:10.1111/j.1474-9726.2012.00828.x.
229. Kropachev, K.; Ding, S.; Terzidis, M.A.; Masi, A.; Liu, Z.; Cai, Y.; Kolbanovskiy, M.; Chatgililoglu, C.; Broyde, S.; Geacintov, N.E.; 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* **2014**, *42*, 5020–5032, doi:10.1093/nar/gku162.
230. Romieu, A.; Gasparutto, D.; Cadet, J. Synthesis and Characterization of Oligonucleotides Containing 5',8- Cyclopurine 2'-Deoxyribonucleosides: (5'R)-5',8-Cyclo-2'-Deoxyadenosine, (5'S)-5',8-Cyclo-2'-Deoxyguanosine, and (5'R)-5',8-Cyclo-2'-Deoxyguanosine. *Chem Res Toxicol* **1999**, *12*, 412–421, doi:10.1021/tx9802668.
231. Shell, S.M.; Hawkins, E.K.; Tsai, M.S.; Hlaing, A.S.; Rizzo, C.J.; Chazin, W.J. Xeroderma Pigmentosum Complementation Group C Protein (XPC) Serves as a General Sensor of Damaged DNA. *DNA Repair (Amst)* **2013**, *12*, 947–953, doi:10.1016/j.dnarep.2013.08.013.

### 13. Kopie publikacji będących podstawą rozprawy doktorskiej

#### 13.1. Publikacja I

**Boguszewska K.**, Szewczuk M., Kaźmierczak-Barańska J., Karwowski B.T.,

*The Similarities Between Human and Bacteria in the Context of Structure, Genome and Base Excision Repair*




[w]: *Molecules*, 2020, 25 (12), 2857, 1-30, doi: 10.3390/molecules25122857

IF<sub>2020</sub>=3,060, MNiSW<sub>2019</sub>=100 pkt



Review

# The Similarities between Human Mitochondria and Bacteria in the Context of Structure, Genome, and Base Excision Repair System

Karolina Boguszewska , Michał Szewczuk, Julia Kaźmierczak-Barańska  and Bolesław T. Karwowski \* 

DNA Damage Laboratory of Food Science Department, Faculty of Pharmacy, Medical University of Lodz, ul. Muszynskiego 1, 90-151 Lodz, Poland; karolina.boguszewska@stud.umed.lodz.pl (K.B.); michal.szewczuk@stud.umed.lodz.pl (M.S.); julia.kazmierczak-baranska@umed.lodz.pl (J.K.-B.)

\* Correspondence: boleslaw.karwowski@umed.lodz.pl; Tel.: +48-42-677-91-36

Academic Editor: Kamelija Zarkovic

Received: 19 May 2020; Accepted: 19 June 2020; Published: 21 June 2020



**Abstract:** Mitochondria emerged from bacterial ancestors during endosymbiosis and are crucial for cellular processes such as energy production and homeostasis, stress responses, cell survival, and more. They are the site of aerobic respiration and adenosine triphosphate (ATP) production in eukaryotes. However, oxidative phosphorylation (OXPHOS) is also the source of reactive oxygen species (ROS), which are both important and dangerous for the cell. Human mitochondria contain mitochondrial DNA (mtDNA), and its integrity may be endangered by the action of ROS. Fortunately, human mitochondria have repair mechanisms that allow protecting mtDNA and repairing lesions that may contribute to the occurrence of mutations. Mutagenesis of the mitochondrial genome may manifest in the form of pathological states such as mitochondrial, neurodegenerative, and/or cardiovascular diseases, premature aging, and cancer. The review describes the mitochondrial structure, genome, and the main mitochondrial repair mechanism (base excision repair (BER)) of oxidative lesions in the context of common features between human mitochondria and bacteria. The authors present a holistic view of the similarities of mitochondria and bacteria to show that bacteria may be an interesting experimental model for studying mitochondrial diseases, especially those where the mechanism of DNA repair is impaired.

**Keywords:** mitochondria; mtDNA; DNA repair; BER; ROS

## 1. Introduction

Mitochondria and mitochondrial DNA (mtDNA) have been of particular interest to researchers in recent years. The endosymbiotic theory of mitochondrial origin is nowadays well confirmed—it took place about 1.5 billion years ago and was related to the increase of O<sub>2</sub> level in the atmosphere [1]. The theory states that in the general view, mitochondria are ancestors of the ancient endosymbiotic organisms (the host) and the symbiont resembling bacteria as we know them today. The symbiont is believed to be an ancient  $\alpha$ -proteobacteria related to *Rickettsiales* lineage that was included as a part of the host [2,3]. The host is believed to be an archaeon, most probably an *Asgard superphylum* archaea [4]. The mitochondria have gone through many evolutionary stages from free-living bacteria to an integrated part of the cell as an organelle. As a result of the endosymbiosis, mitochondria obtained transport proteins, cristae structure, biochemical pathways (e.g., glycolytic pathway and lipid synthesis), and division mechanisms that were integrated between symbiont and host cell [2,5,6]. Moreover, the size of the symbiont's genome was reduced due to endosymbiotic gene transfer (EGT) or gene loss during evolution. Genes involved in nucleoside and amino acids' biosynthesis, anaerobic

glycolysis, and cellular regulation were conveyed to the host and are currently encoded by nuclear DNA (nDNA) in humans [7]. Mitochondrial symbiosis is considered as the starting point of the eukaryogenesis, as absorption of the symbiont promoted significant evolutionary advantage (e.g., functioning in broader environmental conditions) [8].

Human mitochondria play a crucial role in energy production for the whole organism through the synthesis of adenosine triphosphate (ATP) in the oxidative phosphorylation (OXPHOS). At the same time, a significant amount of reactive oxygen species (ROS), which have a high oxidation potential, is generated. Therefore, mtDNA is particularly vulnerable to oxidative damage. Mutations emerging within mtDNA can impair the energy production and the health of the entire organism, as proteins encoded in the mtDNA are elements of the OXPHOS [9]. Therefore, mitochondria must have efficient repair mechanisms to prevent mutations and permanent changes in their genetic information. Mutations within mtDNA may lead to the onset of mitochondrial diseases, which are a major group of genetic disorders [10,11]. Therefore, a detailed understanding of mitochondrial genetics and repair mechanisms is essential for the development of new therapies. It is assumed that in the mitochondria, the majority of lesions are repaired via the base excision repair (BER) system. It repairs the damage in DNA by cutting out a single nucleobase (short-patch BER, SP-BER) or fragment of 2–10 nucleotides (long-patch BER, LP-BER) [12,13]. As the first step, specific enzymes recognize and remove damaged bases, and then a correct nucleotide is inserted, followed by DNA strand ligation.

This review shows similarities between human mitochondria and bacteria on many levels such as structure, genome, and molecular machinery. The paper includes a description of the human mitochondria, mtDNA, and its oxidative damage, and the BER system operating in this organelle. The BER system is well described throughout the last few decades and is a highly conserved molecular mechanism (somewhat different among species). We bring attention to the bacterial origin of the mitochondrial BER basing on the recent literature and to its impact on the onset of mitochondrial disorders.

## 2. Common Features of Mitochondria and Bacteria

Mitochondria are vital for the majority of eukaryotic organisms and are present in the cytoplasm of almost every cell. They produce energy from nutrients by coupling the pyruvate and fatty acids' oxidation with the electron transport chain (ETC). Mitochondria are versatile organelle with many crucial functions for the cell—apart from keeping the cell alive by providing the energy; they also regulate redox reactions [14], take part in apoptosis signaling [15], regulate innate immune reactions [16], maintain calcium homeostasis [17], and synthesize Fe/S clusters [18,19]. Here, we focus on the structure and division mechanisms of mitochondria and bacteria to emphasize common features that may be argued in favor of the endosymbiotic theory of mitochondrial origin.

### 2.1. Structure

Mitochondria are usually presented as bacteria-shaped ellipsoids (2–8  $\mu\text{m}$ ); however, they may have different shapes and sizes [20]. The number of mitochondria per cell depends on the cell type and the organism type—it can vary in the range of few to a few thousand. Cells that need more energy to operate have a higher number of mitochondria e.g., cardiac muscle or liver cells [21]. The number of mitochondrial proteins also corresponds with cell type and organism—in human cardiac muscles, over 600 proteins were identified [22]. Mitochondria are freely distributed in the cell and create a dynamic network that moves along the microtubule filaments [9,23]. Eukaryotic cells contain three major cytoskeletal systems: microfilaments, microtubules, and intermediate filaments, which are assembled from actin, tubulin, and intermediate filament proteins, respectively. Up to date, those cytoskeletal networks have been associated with different functions of mitochondria such as regulating membrane permeability by tubulins which are located near voltage-dependent actin channels (VDAC) and mitochondrial movement [24].

All human mitochondria have the same basic structures—mitochondrial matrix, intermembrane space, the smooth outer mitochondrial membrane (OMM), and the inner mitochondrial membrane (IMM), which is very convoluted and forms a tubular cristae structure. IMM is where ETC complexes and ATP synthase complex are located. It is also the site of mtDNA repair enzymes action [25]. The OMM consists of a phospholipid bilayer containing integral proteins—porin/VDAC transmembrane canals of about 10 Å diameter allowing nutrients, ions, ATP, and adenosine diphosphate (ADP) to penetrate the membrane [26]. Only oxygen (O<sub>2</sub>), water (H<sub>2</sub>O), carbon dioxide (CO<sub>2</sub>), and hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) can freely penetrate through the OMM. MtDNA-encoded proteins constitute only a small part of all respiratory enzymes' subunits; nonetheless, they are essential for the proper operation of the OXPHOS. Other mitochondrial proteins (approximately 1100), of which several hundred are needed for mtDNA expression, are encoded by nDNA [27,28]. Proteins encoded in the nucleus are translated in the cytosol as precursors of mature proteins [29]. They contain targeting signals that are recognized by receptors on the mitochondrial surface. When needed, proteins are recruited and directed to proper mitochondrial destination. The transport of most proteins' precursors through the OMM into the intermembrane space requires specific protein complexes—translocases of the outer membrane (TOM) [26]. Almost all precursors enter the intermembrane space through TOMs and are subsequently directed to different pathways, which will not be discussed in this review [26]. IMM is impermeable for the majority of molecules. The selective transport of molecules (e.g., ions, ATP, proteins) through IMM requires transporter proteins. This transport machinery is essential for distributing energy within the cell. There are over 30 types of transporters embedded in the IMM [30]. Translocase of the inner membrane (TIM) is one of them [26]. IMM's impermeability, among others, is caused by the presence of cardiolipin (CL) in its structure. CL is a signature phospholipid for IMM and constitutes almost 20% of its total lipid content [31]. CL seems to be crucial also for overall mitochondria maintenance. It takes part in the organization of channel proteins activity e.g., presequence translocase of the inner membrane (TIM23) complex–presequence translocase-associated motor (PAM) and TOM complexes [26]. Moreover, CL stabilizes OXPHOS complexes, allowing undisturbed ATP synthesis, takes part in fission/fusion dynamics, regulates protein import, and regulates mitophagy [31–33]. It is also present in the OMM, in particular at IMM/OMM contact sites [32]. Studies also show that CL impacts membrane folding and cristae formation [34]. The structural complexity of IMM allows the fast distribution of protein complexes in the matrix. Energy production through OXPHOS is the most discussed topic concerning mitochondria. Energy carriers (FAD and NAD<sup>+</sup>) are reduced in biochemical pathways and transport energy to IMM where complexes of OXPHOS are located. Complexes of OXPHOS include approximately 90 proteins encoded by nDNA and mtDNA [35]. The mitochondrial matrix (aqueous space surrounded by IMM) contains enzymes involved in basic metabolic cycles such as β-oxidation and the Krebs cycle (except for the oxidation of succinate to fumarate on the IMM), which provide energy carriers for ETC [35]. Genetic machinery is also located in the matrix and will be discussed further in the text.

Bacterial cells are much smaller than eukaryotic cells, but their size may vary from nano- to millimeters [36]. The standard size of *Escherichia coli* is about 2 μm, while one of the biggest bacterial cells (*Thiomargarita namibiensis*) has a diameter of 0.75 mm. The size of prokaryotic organisms is limited mostly by their nutritional restrictions and the size of molecules diffusing through their membranes [36]. However, there are also theories on bacterial homeostasis, which state that bacteria grow only for a specific time or that they constantly monitor their size and switch off the cell cycle after reaching their critical size [37]. Bacteria have filamentous morphology, which is partially responsible for intracellular transport and cell division, and is associated with resistance to phagocytosis [38]. Communication between individual bacterial cells is crucial for colony survival. The network of chemical signals allows cells to avoid overspreading the colony, which may result in the elevated levels of toxic metabolites and cutting off the supply of nutrients [39,40]. Most bacteria have quite simple cellular structure—in the simplest view, they consist of the cell wall, aqueous cytosol, and genetic material. The majority of bacteria have a cell wall that maintains the shape of bacteria and protects it

against osmotic lysis [41]. The rigidity of the cell wall is a result of a peptidoglycan (PG) layer presence. PG is a covalent macromolecular structure of glycan chains (stiff) cross-linked with peptide bridges (flexible) [42]. Two general classes of bacterial cell walls are described. Cell walls of Gram-positive bacteria contain a thick (20–80 nm) PG multilayer with teichoic acids embedded and lipoteichoic acid, which extends to the cytoplasmic membrane. In the case of Gram-negative bacteria, lipoproteins link the outer membrane with a thin (1–7 nm) PG layer located in periplasmic space between the two membranes [42].

Recent years brought to light new facts about lipid species making up bacterial membranes. They tend to coalesce into functional membrane microdomains, which is a phenomenon known as “lipid ordering” [43]. These microdomains contain lipid rafts that have a high density of specific lipids and are a site of bacterial signal transduction cascades and transport proteins. Interestingly, the same lipid structures were observed in eukaryotes long before that, but common opinion at the time was that prokaryotic organisms are not as complex structurally, nor do they need such lipid-rich sites [44]. The lipid content of bacterial lipid rafts is still not fully known. It seems that only a few species (e.g., *Helicobacter pylori*) are able to incorporate cholesterol into its membranes, which is the major lipid for eukaryotic cells. However, bacteria may contain cholesterol-like polyisoprenoid lipids that also assemble microdomains [44]. Lipid rafts consist also of proteins, from which the most important is flotillin. It is considered as a scaffold that favors the recruitment of other proteins. Flotillin keeps lipid rafts functional by promoting the interactions of raft-associated proteins, organizing signaling complexes, and thus, it is essential for cellular processes e.g., signal transduction or membrane sorting [44]. The flotillin is also described in eukaryotic cells, and the lack of it may be related to neurodegenerative diseases [45]. In the case of bacteria, flotillin-like proteins are also present and seem to play the same role as a scaffold for other proteins [44]. The cytosol is the major environment in all bacterial cells. It is an aqueous space that contains a high concentration of ions, metabolites, macromolecules, and molecular assemblies [46]. The cytoplasmic membrane surrounds the cytoplasm and separates it from the extracellular space or the periplasm in Gram-positive or Gram-negative species, respectively. The membrane maintains a proton gradient that drives energy production, the same as in mitochondria. The cytoplasm is not compartmentalized in most bacteria and archaea. Instead, processes occur in specific cytoplasmic regions [47]. In the case of the bacterial cytoskeleton, for many years, it was believed that there is none and that only the cell wall shapes the whole cell [48]. However, homologs of all three eukaryotic cytoskeletal elements have now been identified in bacteria: FtsZ for tubulin, MreB for actin, and crescentin for intermediate filament proteins. FtsZ is the most important one, as it takes part in cell division (discussed in the next section) [42,49]. MreB, a peripheral protein, is a bacterial actin homolog that is widely distributed in rod-shaped bacteria and is involved in cell shape and membrane fluidity maintenance [50]. Moreover, bacteria contain their genetic material in the central region of the cell in the form of the nucleoid, which is presented in detail in Section 3.

Over the years, the increasing number of common features between bacteria and mitochondria has been described [2,51–53]. As *Rickettsia*, a commonly accepted mitochondrial ancestor, is described as *coccobacillus*, some authors indicate their anatomical correlation with modern mitochondria, which mostly have a spherical, elongated shape corresponding with the shape of *coccobacillus* [54]. Eukaryotic cytoskeletal elements, which have their bacterial homologs, are detected in mitochondria. Tubulin is present in mitochondrial membranes where it plays a role in mitochondrial permeability mechanics [55]. Interesting, yet not fully explained, is the fact that mitochondria communicate with each other and with other organelles. An example of such communication is the mitochondrial transfer (MT). It may occur between mitochondria (during fusion) or between cells (through nanotube linkages or extracellular vesicles) [56]. Although MT is assumed to be triggered mostly when the cell faces a depletion of functioning mtDNA molecules, the transfer may result also in the spreading of mutations between different tissues [57]. MT aims to restore cellular functions in the case of mtDNA deficiency in the cell and prevent apoptosis or the activation of oncogenes [58,59]. However, examples of MT have been described in mammalian cells concerning carcinogenesis [60]. The transfer occurs especially when

tissues of growing tumors lack respiration capacity. Moreover, the transfer of the whole mitochondria from healthy to cancerous cells has been described. It is a mechanism of oxidative stress avoidance that is a major cause of cancer's resistance to therapies [58,60]. To some extent, this network of signals may be compared to bacterial communication within the colony, which is essential for their survival.

As described previously, mitochondria have two membranes (IMM and OMM) and two aqueous compartments (matrix and intermembrane space), the same as is observed in Gram-positive bacteria such as *Rickettsia* [26]. The fact that mitochondria have two membranes may support the endosymbiotic theory. However, there are also different theories in this matter. It is probable to some extent that one membrane could come from a prokaryotic ancestor and the other could indicate the vesicle that was formed upon the symbiont engulfment [61]. On the other hand, a recent study confirms that protein complexes responsible for cristae formation are of  $\alpha$ -proteobacterial origin [62]. To elucidate this issue, more studies must be completed. Mitochondrial membranes (IMM and OMM) have different lipid compositions and asymmetric distribution of lipids, which is considered as a remnant of bacteria symbiosis with the host [63]. CL is recognized as the major lipid in IMM (up to 20% of total lipids); however, it is also present in OMM within contact sites of both membranes where fission/fusion is believed to occur [31]. Bacterial membranes contain lipid rafts with structure and protein composition corresponding to those found in eukaryotic cells. However, the lipid content differs among eukaryotes and bacterial species [32,44]. Eukaryotic membranes contain mainly sterols (e.g., cholesterol) and sphingolipids. In the case of bacteria, only a few Gram-positive bacteria have cholesterol in them, while Gram-negative bacteria contain even three types of cholesterol glycolipids, but they are not able to produce it [43]. The exact lipid content of bacterial membranes is still not fully known, also because it varies among species. Additionally, porins are present in the outer membrane of both bacteria and mitochondria, which allow the transmembrane transport of molecules [42]. Therefore, it seems that mitochondria have some common aspects with bacteria regarding membranes and that structural characteristics such as their double membrane may act in favor of the endosymbiotic theory. Moreover, the molecular machinery within cells, especially ATP synthesis, may also be an argument. OXPHOS operates similarly to bacterial aerobic ATP synthesis; both are located within membranes (IMM in mitochondria and cytoplasmic membrane in bacteria) [64]. However, bacterial ATP synthase has a simpler structure [65]. Furthermore, the majority of proteins present in the mitochondrial matrix (with characteristic Fe/S cluster), which take part in crucial pathways (e.g., Krebs cycle, cofactor biosynthesis, or  $\beta$ -oxidation) have their homologs among bacteria, or their core subunits are of bacterial origin [2,28,66]. In this review, we do not focus on discussing those pathways. Bacteria and mitochondria are also similar in the light of genetic elements—both contain circular DNA and divide through fission, which is presented in the next section.

## 2.2. Fusion/Fission Systems

The mitochondria control system consists of the regulation of mitochondrial fusion/fission dynamics and the regulation of mitochondrial autophagy (mitophagy) [67]. Disruption of those mechanisms may lead to pathological conditions (e.g., metabolic disorder, neurodegeneration) [68,69]. When minor stress affects mitochondrion, it can fuse with another healthy mitochondrion. The fusion process includes sharing undamaged components and in the case of damaged genome fragments, it allows genetic complementation. Fission is important for cellular division and the distribution of mitochondria within the cell, and it occurs also when a mitochondrion gets heavily disrupted; it is subsequently separated and fragmented [69]. Degradation occurs through mitophagy—mitochondria are divided into smaller fragments suitable for autophagosomal encapsulation, and then the undamaged components are recycled for further fusions or the synthesis of new mitochondria. Fusion and fission are regulated transcriptionally and non-transcriptionally by various factors, e.g., cellular stress, redox status, or metabolic and energetic balance within the cell [70]. Since both processes are closely correlated, the balance between them is crucial for the cell functioning [67]. The two pathways are

strictly dependent on the presence of lipid rafts along the mitochondrial membrane. These lipid rafts contain e.g., cholesterol and sphingolipids that play a pivotal role in cell signaling [45].

Mitochondrial fusion machinery is controlled by three nuclear guanosine triphosphate proteins (GTPases): mitofusin protein 1 and 2 (MFN1 and MFN2) are located in the OMM and mediate its fusion, while optic atrophy protein 1 (OPA1) is responsible for the fusion of IMM [69]. After two mitochondria get close to each other, the fusion process begins with the recruitment of MFN1 or MFN2 to the lipid rafts localized along the OMM of both mitochondria. Studies show that mitofusin proteins are also essential for OXPHOS and mtDNA maintenance [71]. The lipid fragment of both membranes gets shared and one great mitochondrion is formed, still containing two separated IMMs. Then, OPA1 is recruited and the lipid rafts located along IMMs start to fuse [70]. It is believed that besides the recruitment of necessary proteins, lipid rafts play a crucial role as an optimal environment for chemical reactions underlying the process of membranes fusion. The disruption of lipid microdomains impairs mitochondrial network formation. The function of MFN2 and dynamin-related protein 1 (DRP1) depends on their proper recruitment to lipid rafts, which is essential for the initiation of fusion/fission [67]. During fission, the mitochondrion is divided into daughter mitochondria. The main mediator of the fission process is DRP1, which is recruited from the cytosol to the mitochondrial surface at contact sites with the endoplasmic reticulum. Lipids are responsible for membrane dynamics as they lower the energy barrier for fusion/fission. CL recruits and binds DRP1 and stimulates its GTPase activity. Fission begins with the IMM division inside the mitochondrion and is followed by the OMM division—two daughter mitochondria emerge [23]. This process of division is also crucial for preventing the accumulation of mtDNA mutations, as mtDNA is transferred to the new mitochondrion [69]. Recently, new mechanisms of fission regulation were revealed such as the cooperation of mitochondria and lysosomes or the recruitment of Golgi-related lipid to the fission sites [72,73].

In the case of most bacteria, fusion is not observed. However, bacterial filaments may be treated as equivalent to some extent. Filaments may be a bacterial way to divide or connect with the host [74]. Such filaments are also created upon stress conditions, and it is suspected that filaments may have been present in ancient bacteria species [23]. The situation is different for the fission process, as it occurs in most organisms, including bacteria. The first steps of cytokinesis are DNA replication and nucleoid segregation. Then, a Z-ring is formed—it contains the key division protein FtsZ [75]. The bacterial Z-ring serves as a scaffold to about 20 downstream proteins (e.g., PG synthases and hydrolases), which are responsible for cell wall remodeling [49]. FtsZ (bacterial homolog of tubulin) is conserved in almost all bacteria, many *Archaea*, and the mitochondria of some early-branching eukaryotes [47]. On the other hand, mitochondrial FtsZ is absent from the genomes of yeast, plants, and animals. It is assumed that during the evolution, DRP proteins replaced FtsZ in higher eukaryotes to undertake the process of cell fission [76]. Moreover, a new study confirms that mitochondrial fission machinery is structurally conserved. This hypothesis was tested by creating constructs and directing an  $\alpha$ -proteobacterial FtsZ protein to the mitochondrial matrix. The authors show that FtsZ localized at fission sites and increased the rate of mitochondrial fission [77].

### 3. Human Mitochondrial DNA vs. Bacterial DNA

#### 3.1. Human Mitochondrial DNA (mtDNA)

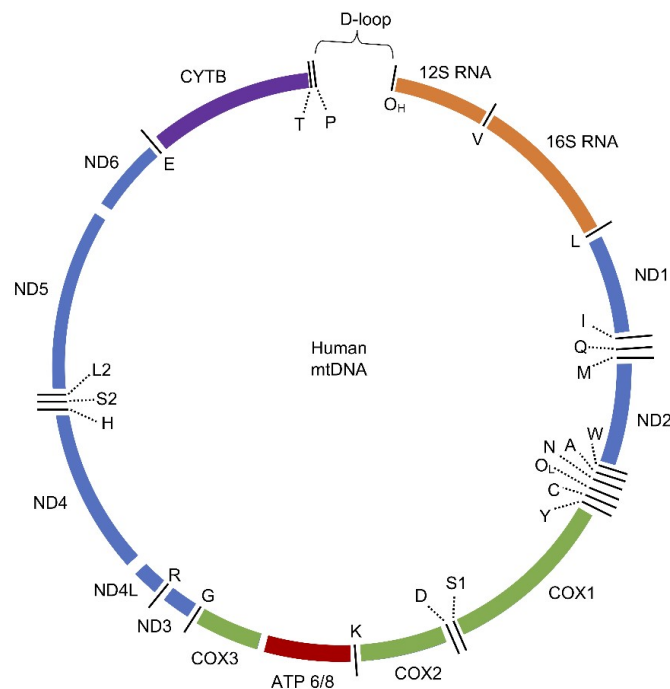
Human mtDNA plays an essential role in mitochondrial biogenesis, the maintenance of cell metabolism, and cellular energy homeostasis. Mitochondrial genetic material exists in a form of double-stranded circular molecules of deoxyribonucleic acid. Each human mtDNA molecule consists of 16,569 base pairs and has a molecular mass of  $10^7$  Da [78]. The number of mtDNA copies per cell depends on the type of cell in the human body. Energy-consuming cells such as cardiac muscles have 4000–6000 copies of mtDNA per cell, while kidney, liver, or lung cells have less—500–2000 copies per cell. The individual mitochondrion contains normal and mutated mtDNA molecules, the phenomenon which is known as heteroplasmy. Upon fission (e.g., during cell division), daughter mitochondria

obtain random copies of mtDNA molecules, including mutated ones [57]. When the number of mutated mtDNA increases, cellular energy production is more likely to be affected. If the ratio of mutated and not mutated mtDNA is too high (threshold value), the odds for the disease occurrence also increase [79]. The mtDNA is packed inside slightly elongated, irregularly shaped protein–DNA complexes called nucleoids. Nucleoids are located in the mitochondrial matrix probably in proximity to IMM. Wang et al. show that some proteins that are known to be embedded in IMM (e.g., adenine nucleotide translocator (ANT) and proteins from complex I of ETC) are identified in the nucleoid, which indicates that nucleoid structures are contiguous to IMM [80]. Moreover, the displacement loop (D-loop) is believed to be anchored in IMM as a central point for nucleoid forming [9,81]. However, it is not yet clear how the nucleoid's location is regulated. Studies suggest that it may be dependent on the fission and fusion mechanisms [82]. Recent findings also show that a single nucleoid contains a single copy of mtDNA in opposition to previous studies, where up to 8 mtDNA copies were observed in one nucleoid [80,83]. Up to date, around 20 proteins are identified in the mitochondrial nucleoids, among which mitochondrial transcription factor A (TFAM) is the most abundant (approximately 1000 molecules of TFAM per one molecule of mtDNA) [80,82]. It is believed that TFAM is responsible for the compacting of mtDNA, since it causes 90° bends in the DNA and cross-strand binding [82,84]. These compacted structures shield mtDNA and control gene expression. It resembles to some extent the nucleosomes and chromatin structure in the nucleus. Besides mtDNA and TFAM, the nucleoid contains several proteins involved in replication (e.g., mitochondrial DNA polymerase  $\gamma$  (Poly), replicative DNA helicase (Twinkle), mitochondrial ssDNA-binding protein (mtSSB)), transcription (e.g., DNA-dependent RNA polymerase (POLRMT), mitochondrial transcription factor B2 (TFB2M), mitochondrial transcription elongation factor (TEFM)) and other processes (e.g., RNA helicases, RNA processing proteins, ribosomal proteins, chaperones) [80,82].

Early studies of mtDNA identified the strand-displacement model of replication [85]. Later discoveries of Y arcs and bubble arcs in mtDNA led to the belief that there are other models of replication. Currently, there are several models and their variations proposed, such as the unidirectional RITOLS model (RNA incorporation through the lagging strand) and the bidirectional strand-coupled DNA model [86,87]. It is also reported that in different tissues and/or conditions, different replication models may occur [88]. However, for mitochondria and bacteria comparison, this review focuses only on the strand-displacement model. The replication process starts in the origin sites in both strands and involves a coordinated work of minimum Poly, Twinkle, mtSSB, topoisomerases, POLRMT, and DNA ligase III (LigIII). Errors occurring during the replication of mtDNA are believed to be the main source of mutations [89]. Poly is reported to be the only polymerase in mitochondria responsible for replication and mtDNA repair. It is also described as very accurate (less than  $10^{-6}$  errors per nucleotide), which eliminates Poly as a source of mutations and contradicts previous findings [35]. The mitochondrial gene expression has been recently reviewed by Kotrys et al. Transcription initiation sites are located within the D-loop region of both heavy chain (H, rich in guanine) and light chain (L, rich in cytosine). H chain is a template for the transcription of the majority of mitochondrial genes [90]. Transcription of the L chain results mostly in non-coding RNAs, which are degraded by mitochondrial degradosome (a complex of polynucleotide phosphorylase (PNPT1) and ATP-dependent RNA helicase (SUV3). Two long, polycistronic transcripts are created (from L and H strand promoters: LSP and HSP2, respectively) and subsequently processed to obtain mature RNAs [91,92]. The mitochondrial transcriptional machinery seems to be straightforward [84]. It contains DNA-dependent RNA polymerase (POLRMT) and cofactors: TFAM can unwind mtDNA, initiates the transcription and recruits POLRMT to the site; TFB2M stabilizes the open conformation of the mtDNA strands; TEFM allows strand elongation; mitochondrial transcription termination factor 1 (MTERF1) flips specific bases to terminate transcription [35]. On the other hand, new factors are described as engaged in the transcription e.g., mitochondrial ribosomal protein L7/L12 (MRPL12) or mitochondrial transcription rescue factor 1 (MTRES1), which is also involved in translation through binding to the mitochondrial ribosome. New findings indicate that mitochondrial gene expression processes are yet to be fully

understood [90]. Translation in mitochondria consists of standard stages of initiation, elongation, termination, and recycling. The process is crucial for the proper production of enzymes involved in ETC and hence the proper functioning of the organelle. The mammalian mitochondrial ribosome is believed to have bacterial origin, even though some rRNA fragments have been lost during endosymbiosis (e.g., 5S rRNA) [93]. Studies show that missing rRNA fragments are replaced by proteins—the mitochondrial ribosome contains twice as many proteins as cytosolic or bacterial structures [94]. On the other hand, about half of mitochondrial ribosomal proteins do not have bacterial homologs, and it is now clear that the mitoribosome has unique proteins obtained during evolution [93,95]. Details of the mitochondrial translation will not be discussed here, but it is important to remember that disturbances in this process may lead to pathological states [93,96,97].

A total of 37 genes are included in mtDNA, encoding 11 mRNA molecules (translated to 13 proteins), 22 tRNA molecules, and 2 rRNA molecules (12S and 16S) (Figure 1). Encoding sequences are embedded in both strands of mtDNA and divide among 12 proteins and 14 tRNAs encoded by the H chain and 1 protein and 8 tRNAs encoded by the L chain [98]. The genetic code of mtDNA is slightly different from nDNA. In nDNA, UGA is a stop codon and in mtDNA, it is coding Trp, AUA is coding Met in mtDNA instead of Ile, and there are four possible stop codons in mtDNA: AGA, AGG, UAA, and UAG [93,99].



**Figure 1.** Schematic representation of human mitochondrial DNA (mtDNA). The circular molecule (16,569 bp) contains genes coding for 7 subunits of complex I (ND1–ND6, NADH ubiquinone oxidoreductase chain 1–6) (blue line), 1 subunit of complex III (CYTB, cytochrome B) (purple line), 3 subunits of complex IV (COX1–COX3, cyclooxygenase) (green line), and 2 subunits of complex V (ATP synthase 6 and 8) (red line). Moreover, mtDNA encodes 2 rRNAs (orange line) and 22 tRNAs for specific amino acids (marked with black lines with letter designation for specific amino acids) (based on [9]).

Characteristic features of human mtDNA are a lack of introns and high gene density. The exception is the non-coding region (NCR) that contains a D-loop—the starting point of replication and promoters for transcription. D-loop contains hypervariable fragments that differ among individuals, which is useful for population genetics and forensic medicine [100]. All 13 mitochondrial proteins take part



in ATP generation by OXPHOS. These proteins are membrane subunits of the respiratory chain: 7 of 45 subunits of complex I (NADH: ubiquinone oxidoreductase), 1 of the 11 subunits of complex III (ubiquinol:cytochrome C oxidoreductase), 3 of 14 subunits of complex IV (cytochrome C oxidase), and 2 of 16 subunits of complex V (ATP synthase) [101,102]. Details of why the OXPHOS subunits in humans are encoded by mtDNA are yet unclear [16,35,78,98]. Two hypotheses give reasons for this phenomenon. One of the hypothesis is that to efficiently regulate ETC, some genes must be expressed “on site”. In the case of changes in the redox state, the adjustment of OXPHOS complexes is needed. Therefore, when mtDNA is present “on site”, mitochondria may rapidly regulate protein expression to prevent malfunctions of ETC, excessive ROS production, and subsequent damage to the cell [103]. The second hypothesis, which was recently revisited, stresses the fact that the majority of mtDNA-encoded proteins are large and hydrophobic. Hence, if expressed in the nucleus, they would be most probably directed to the endoplasmic reticulum instead of mitochondria [104]. It is worth mentioning that both theories are not exclusive, but further studies in this field are necessary to fully understand the reasons why mitochondria need its genetic material [2].

### 3.2. Comparison of Human mtDNA and Bacterial DNA

Since the endosymbiotic theory describes  $\alpha$ -proteobacteria as an ancestor of mitochondria, many common features have been discovered over the years between mitochondrial and prokaryotic genomes. The bacterial genomes size varies in the range of approximately 1000–9000 kbp [105]. The genome of *Escherichia coli* is described as 4700 kbp, double-stranded, circular DNA (circular bacterial chromosome), and it is the most popular model for molecular studies [106]. During the endosymbiotic process, a significant reduction of bacterial genome size occurred as a result of gene transfer to the host. Hence, mtDNA has a much smaller size than the average bacterial cell, and it lost many functional genes [107]. The bacterial genome is located in the central part of bacteria in the form of compacted nucleoid. In some bacteria, such as *E. coli*, DNA is supported by multiple plasmids located nearby that encode e.g., antibiotic resistance genes. Human mitochondria have many copies of double-stranded, circular DNA [39]. Same as in bacteria, mtDNA is associated with proteins and shaped into nucleoids, which indicates a possible evolutionary correlation of the two [9]. In the case of mitochondria, TFAM proteins are the main components that compact DNA. The same phenomenon is observed in bacteria where the set of nucleoid-associated proteins (NAPs) compacts genome into nucleoid [108,109]. They are able to bind to DNA and change its structure. Two major DNA binding proteins involved in this process are DNA-binding protein HU and histone-like nucleoid-structuring (H-NS) protein. They have different functions within the bacterial genome: HU takes part in transcription and cellular growth, while H-NS silences transcription and may arrest the cell cycle [108]. Both proteins are involved in the compacting of the bacterial DNA, and by regulating the dynamics of the nucleoid, they influence gene expression [47]. Bacterial DNA contains mostly functional regions that encode proteins [105]. Therefore, usually, its genome size corresponds with proteome size [110]. The length of DNA in bacteria is also associated with its content of G::C pairs, which is beneficial for the cell as it decreases the chance of denaturing [111]. Characteristic for bacterial DNA are also conserved unmethylated CpG motifs. They are also described within mtDNA, which is one more evidence for the evolutionary connection of bacterial and mitochondrial genomes [16].

Gene expression machinery in mitochondria is distinct from nuclear expression, which also aligns with the endosymbiotic theory of mitochondrial origin. On the other hand, many of the proteins involved in genome maintenance correspond not with bacterial but with bacteriophage lineage (e.g., POLRMT, Twinkle) [35]. POLRMT is homologous to T7-like bacteriophage’s polymerase. It may indicate that the polymerase-based transcription system was incorporated in eukaryotes early in the evolutionary process or that the proteobacterial system was replaced by phages in the process of evolution [84]. On the other hand, Pol $\gamma$  belongs to the family-A DNA polymerases to which the bacterial DNA polymerase I (PolI) also belongs [35]. The bacterial chromosome is replicated bidirectionally starting from the site of origin and transcription and translation occur simultaneously

during the cell cycle. These processes are well known and will not be described here in detail [112–115]. The replication of prokaryotic and mitochondrial DNA has a different course. The bacterial replication is bidirectional and starts at the same time on both strands. The replication of mtDNA is more complex and requires partial replication of the H strand to activate the process on the L strand [35,116]. Mitochondria contain their own transcriptional and translational machinery—genes are transcribed as mRNA, which is subjected to polyadenylation as post-transcriptional processing [95]. It is another indicator that the mitochondria, as a semi-autonomous organelle, may be a remnant of bacteria in the cell. Until recently, it was believed that mitochondrial transcription machinery is distinct from the whole cell and operates on its own. What supported this theory was that mitochondria create polycistronic transcripts, as bacteria do and have clustered RNA genes, which are typical for eubacteria [7]. In addition, TFB2M is homologous to the rRNA methyltransferase family in bacteria and archaea [35]. However, a new study shows that nuclear regulatory factors also take part in the regulation of mitochondrial gene expression [117].

Taking into consideration common structural and genetic features linking mitochondria and bacteria, it may be assumed that the endosymbiotic theory is correct in the light of current knowledge. The mitochondrial genome seems to be a direct remnant of its prokaryotic ancestor despite differences that arose throughout evolution. Therefore, it may be suspected that other molecular machinery such as DNA repair in mitochondria may also have a bacterial origin. However, the presence of the genetic material in mitochondria has its evolutionary consequences. The major drawback is that mtDNA is exposed to ROS action and hence is highly vulnerable to oxidative DNA damage formation. The next section describes oxidative DNA damage, its formation within mitochondria, and mechanisms of mitochondrial redox homeostasis regulation.

#### 4. DNA Damage in Human Mitochondria

##### 4.1. Oxidative DNA Damage

The mitochondrial genome is subjected to the same damaging factors as nDNA and even more. DNA damage may occur as single nucleotide damage (e.g., 8-oxoguanine (8-oxo-G)), structural damage (e.g., intrastrand/interstrand cross-linking) or damage to DNA core (e.g., apurinic/aprimidinic (AP) site). The most frequently mentioned DNA damage types are the oxidation of bases, single-strand breaks (SSBs, e.g., as a result of ROS), the alkylation or deamination of bases, insertion of the incorrect base during replication, the formation of pyrimidine dimers (e.g., as a result of UV radiation), double-strand breaks (DSBs, e.g., as a result of ionizing radiation), the formation of base derivatives (e.g., as a result of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> or polycyclic hydrocarbons present in smoke), the formation of cross-links between DNA strands (e.g., as a result of vinyl chloride) [118]. DNA damage is also divided into endogenous or exogenous. Endogenous damage is caused by the products of cellular metabolic processes (e.g., ROS and reactive nitrogen species (RNS)) or by the errors emerging during replication. Exogenous damage is caused by external factors e.g., UV radiation, high temperature, toxins of plant origin, aromatic mutagens, or radio- and chemotherapy. Ionizing radiation may lead to the formation of cracks in both DNA strands and complex lesions that are a characteristic feature for radiation. As a result of UV light, pyrimidine dimers may be formed between adjacent cytosine (C) and thymine (T) or two T residues [14]. The likelihood of the oxidative damage in mtDNA is the highest of all cellular locations due to OXPHOS reactions which occur close to mitochondrial genetic material. Furthermore, in the process of mtDNA replication, the H-chain is separated for some time, making it more vulnerable to mutagenic agents [78].

To date, more than 100 different types of oxidative DNA damage have been identified [119]. Each nucleobase is vulnerable to oxidative damage. Changes in base structures lead to transversion or transitions in mtDNA, which causes mutations and subsequent diseases. The most frequently oxidized base is guanine (G) due to its low oxidation potential: it occurs 10<sup>5</sup> times per day/per cell [120]. The 8-oxo-G is generated through the oxidation of C8 in G and its

presence leads to G::C→ A::T transversions. 8-oxo-G may be further oxidized to the form of 2,6-diamino-4-hydroxy-5-formamidopyrimidine (FapyG), which is reported to be even more mutagenic [121]. 8-oxo-G is well described and is often used in studies on repair systems in cells due to its chemical stability. Adenine (A) undergoes similar conversions; however, the yield of 8-oxo-A and 4,6-diamino-5-formamidopyrimidine (FapyA) formation is lower than for G. 8-oxo-A and FapyA lead to A::T→ G::C transversions. FapyA is one of the most frequent A lesions resulting from radiation. The mutagenic potential of A-derived damage is lower than those of G due to its lower structural stability in the DNA strand. Thymine glycol (TG) is the most frequent lesion of T, which blocks polymerase activity during replication [122]. Other examples of T lesions are 5,6-dihydrothymine (DTH) and 5-hydroxymethyluracil (5HmU). While the first one is not reported to be cytotoxic or mutagenic, the latter causes T::A→ G::C transitions. Oxidative products of C are 5-hydroxy-2'-deoxycytidine (OH5C), which leads to C::G→ T::A transitions and 5-methylcytosine (5mC) which, apart from lesion forming potential, has a gene regulation function [119]. Oxidative DNA lesions are mostly formed as a result of ROS action. Taking into consideration that proteins involved in OXPHOS are encoded by mtDNA and are on the “first line” of exposure, the proper redox homeostasis is crucial for the organism to support mitochondrial genome integrity [123].

#### 4.2. Mitochondrial ROS Production and Redox Homeostasis

MtDNA is highly sensitive to oxidative lesions; therefore, the mutagenesis rate in mtDNA may be even 10 to 20-fold higher than in nDNA [78,124]. The mtDNA seems to be an easy target for the free radicals due to a lack of chromatin structure (protection of histones). However, TFAM must be mentioned here, as the protein is able to compact mtDNA into a nucleoid [35]. Nucleoids resemble the tight structure of chromatin; thus, it is assumed that mtDNA is shielded from the action of ROS at least until the moment of loosening the structure before replication or transcription. TFAM also operates in coordination with POLRMT during transcription to bypass oxidative damage (e.g., 8-oxo-G), which otherwise would stop the process [125]. Apart from the mutagenic potential, ROS are important regulators of the molecular pathways (e.g., gene expression or cell differentiation) [126]. ROS are mainly generated during physiological processes, the metabolism of chemical compounds, or as a response to a stress factor (e.g., ionizing radiation). Endogenously, radicals are formed through enzymatic cellular systems such as cytochrome P450 reductase, nitric oxide synthase (NOS), or as a result of “electron leakage” in ETC [127,128]. Respiration generates a high amount of ROS (about 90%) [129]. They include H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, superoxide anion (O<sub>2</sub><sup>•−</sup>), singlet oxygen (<sup>1</sup>O<sub>2</sub>), ozone (O<sub>3</sub>), and hydroxyl radical (•OH). ROS are produced mostly as a result of the reaction between O<sub>2</sub> and electrons, which come mostly from complexes I and III of ETC. Some electrons “leak” from the ETC before full, four-electron reduction, causing a direct reduction of O<sub>2</sub> to O<sub>2</sub><sup>•−</sup> that is the most devastating radical generated in high quantities (2–3 nmol/min/mg of protein) [130]. IMM is impermeable for O<sub>2</sub><sup>•−</sup>. The anion formed by complex I is directed into the mitochondrial matrix, but complex III may direct some amount also into the intermembrane space [128].

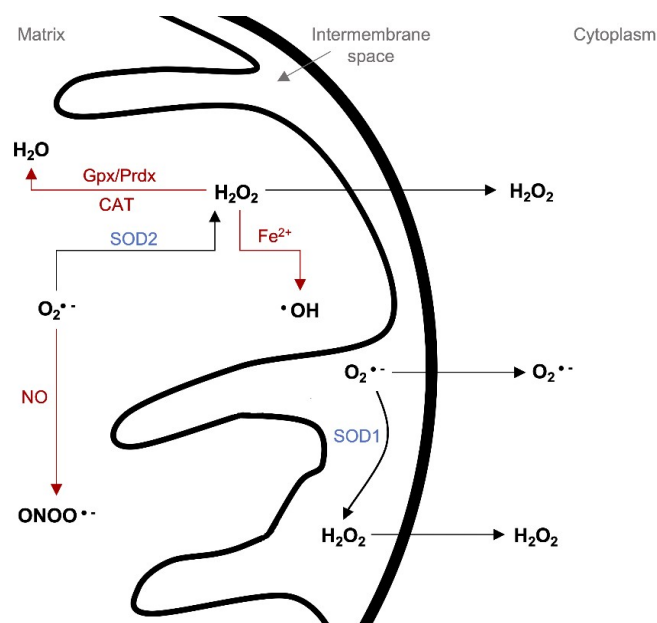
Free radicals are neutralized in mitochondria by a variety of endogenous enzymatic (e.g., superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (Gpx), peroxiredoxin (Prdx), hemeoxygenase-1 (HO-1), and thioredoxin (Trx)) and non-enzymatic (e.g., urate, ascorbate, glutathione (GSH), β-carotene, and flavonoids/polyphenols) antioxidants [131,132]. SOD seems to be the first line of defense against ROS (Figure 2). It neutralizes O<sub>2</sub><sup>•−</sup> through its degradation to O<sub>2</sub> and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. The *SOD1* gene is located on chromosome 21q22.1. *SOD1* overexpression may lead to an increase in the ROS level in the cell. Available results indicate that in patients with chromosome 21 trisomy (Down Syndrome, DS), *SOD1* levels are elevated in different types of cells and organs. In addition to morphological disorders, DS is associated with impaired learning, memory, and mental development. Genes actively involved in the degeneration of nerve tissue, among others, have been identified as responsible for cognitive functions such as learning, memory, or behavioral disorders. The most commonly described genes in this context include *Sod1*, *App*, or *Sim2* [133]. Moreover, an important

factor associated with DS pathologies is oxidative stress [134]. Trisomy 21 is associated with the impairment of mitochondrial function, which leads to an increased level of free radicals and oxidative stress. However, there is no clear evidence of whether SOD1 overexpression is directly responsible or it is rather the result of damaged mitochondria in the DS patient's brain. There are two types of SOD in mitochondria—SOD1 in the intermembrane space and SOD2 in the mitochondrial matrix [129]. Gulesserian et al. observed differences in SOD expression in the brain of DS patients compared to Alzheimer patients. SOD1 levels in DS were significantly elevated, while in the case of Alzheimer's disease, they were lowered. Interestingly, SOD2, which is necessary for the proper functioning of mitochondria and neurite growth, did not show significant differences in its amount or distribution in the brain [135]. The authors conclude that SOD1 overexpression in DS may be neuroprotective and constitute a compensatory mechanism for increased oxidative stress, which is also supported by other authors [136,137]. However, different studies show that SOD1 overexpression may partially cause the DS [138].

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> has moderate reactivity and is not a direct threat to macromolecules, but in metal-catalyzed reactions, it is converted to •OH. The hydroxyl radical is the most reactive radical that causes nucleobases modifications impacting DNA structure [139]. Therefore, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> may be converted to O<sub>2</sub> and H<sub>2</sub>O by CAT or Gpx/GSH [129]. CAT is less efficient than GSH, but while GSH is a major antioxidant for the entire cell, in mitochondria, it occurs in low quantities. Gpx utilizes GSH to enable the transformation of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> to H<sub>2</sub>O; then, GSH is regenerated by glutathione reductase (GR). The Prdx/Trx system operates similarly—Prdx reduces H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> to O<sub>2</sub> and utilizes Trx to regenerate itself [129]. The oxygen level is controlled by specific hypoxia-inducible transcription factors (HIFs). They inhibit ROS generation by the regulation of acetyl-CoA synthesis, mitochondrial proteins synthesis, and mitophagy. A decreased level of O<sub>2</sub> leads to HIFs activation, which subsequently leads to a decrease in the production of mtROS or an increase in the production of ROS scavengers. HIFs occur in abundance in tumor tissues that are rich in hypoxic areas. Therefore, HIFs inhibition may serve as a potential therapeutic target in the inhibition of tumor growth [140]. The consequences of ROS in cells are dependent on their concentration. In non-stress conditions, when the ROS level is well-regulated, the redox signaling maintains physiological cell functions, such as cellular differentiation and tissue regeneration. However, in the case of ROS overgeneration or the inhibition of ROS scavengers, the intracellular redox homeostasis is disrupted. It leads to the state of oxidative stress, which is the combination of the impaired ability of tissues to detoxify/compensate overall damage with an overgeneration of ROS. Oxidative stress may induce iron ions, which in turn catalyze the formation of highly reactive •OH [131]. The accumulation of ROS can also disrupt the mitochondrial membrane stability and lead to the activation of the fusion/fission control system or mitophagy [69,141]. Oxidative stress is the main source of SSBs and DSBs, which are the most abundant damage in mtDNA. They impair mitochondria functions through decreasing the ETC protein activity [98]. ROS action may result in substitutions, deletions, and missense mutations at a lower concentration in mtDNA than in nDNA [78]. Experiments on rat cardiomyocytes show that after treating cells with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, the oxidative stress arises and causes a decrease in the activity of complexes I, III, and IV by 50% within 10 min [9].

Furthermore, oxidative stress induces lipid peroxidation. As a result, reactive lipid peroxidation products are generated e.g., 4-hydroxy-2-nonenal (4-HNE). 4-HNE is produced mainly in mitochondria and is considered as an oxidative stress biomarker. It may form adducts with DNA, proteins, and membrane phospholipids, especially within mitochondria [142]. Studies show that such adducts lead to the onset of cancer, mtDNA damage, reduced membrane integrity, reduced ETC activity, and apoptosis (e.g., through the regulation of proteins involved in cellular stress response to UV, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, or oxidants) [142,143]. 4-HNE may form HNE-DNA bulky adducts and/or bond with all nucleobases (it reacts with the highest efficiency with G and C). The adduct of 4-HNE and G may be removed from DNA by BER, nucleotide excision repair (NER), or recombination [142]. In the case of nDNA, 4-HNE-dG plays a crucial role in human cancers as it causes p53 mutation and subsequently may lead to the death of cancerous cells [142]. The exact role of 4-HNE-dG within mtDNA is not yet described,

but the interaction of 4-HNE with mitochondrial macromolecules is considered as a potential target for cancer treatment.



**Figure 2.** Schematic representation of reactive oxygen species (ROS) signaling in human mitochondria. Superoxide anion ( $O_2^{\bullet-}$ ) emerges in the mitochondrial matrix and intermembrane space and can be converted to hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ) by superoxide dismutase (SOD1 or SOD2).  $H_2O_2$  gets through the membrane into the cytoplasm.  $O_2^{\bullet-}$  may also react with nitric oxide (NO) forming peroxynitrite ( $ONOO^{\bullet-}$ ), which blocks  $O_2^{\bullet-}$  conversion into  $H_2O_2$ . In the presence of metal ions ( $Fe^{2+}$ ),  $H_2O_2$  generates hydroxyl radical ( $\bullet OH$ ). Hydrogen peroxide may be transformed into the water by enzymes: catalase (CAT), glutathione peroxidase (Gpx), or peroxiredoxins (Prdx) (based on [144]).

It is worth mentioning that similar processes of the generation and neutralization of free radicals occur in aerobic bacteria, where ROS also play an important role in their metabolism and emerges as a result of stressors (e.g., exposure to antibiotics) [145]. A model organism for such discussion is *E. coli* (facultative anaerobe) [146]. A four-electron reduction of  $O_2$  is observed in bacteria, resulting in ROS production. *E. coli* cell contains a set of scavenging enzymes: three types of SOD (Fe-SOD, Mn-SOD, and CuZn-SOD), 2 types of CAT, and alkyl hydroperoxide reductase (Ahp, which reduces  $H_2O_2$  to  $H_2O$ ). Those enzymes regulate intracellular ROS concentrations, but in the case of additional, exogenous stress factors and higher ROS levels, they are insufficient. Therefore, bacteria have two systems neutralizing exogenous oxidative stress (OxyR and SoxRS), which will not be discussed here [146]. ROS cause serious consequences for bacteria. They impair amino acids, lipids, DNA, or proteins, which may lead to the accumulation of ROS and subsequent cell death. As previously mentioned, 4-HNE is a result of ROS reactions with mitochondrial lipids. It is mutagenic in both mammalian and bacterial cells [142]. During oxidative stress, levels of 4-HNE may increase up to 50  $\mu M$  and form adducts with DNA [147]. As a response to such DNA damage, the SOS system may be triggered, which is a main system activated in the case of UV action upon DNA. Bacterial defense mechanism concerns also repair of damaged DNA, which is discussed further in this review. In *E. coli*, 4-HNE adducts may be repaired by NER or homologous recombination [147]. The interesting fact is that in the light of ROS, bacteria and mitochondria suffer comparable damage and have similar mechanisms of protection.

The impact of mitochondrial ROS (mtROS) on the cell and human health is considered to be complex. Oxidative stress may cause cell death due to interactions of ROS with cellular proteins, lipids,

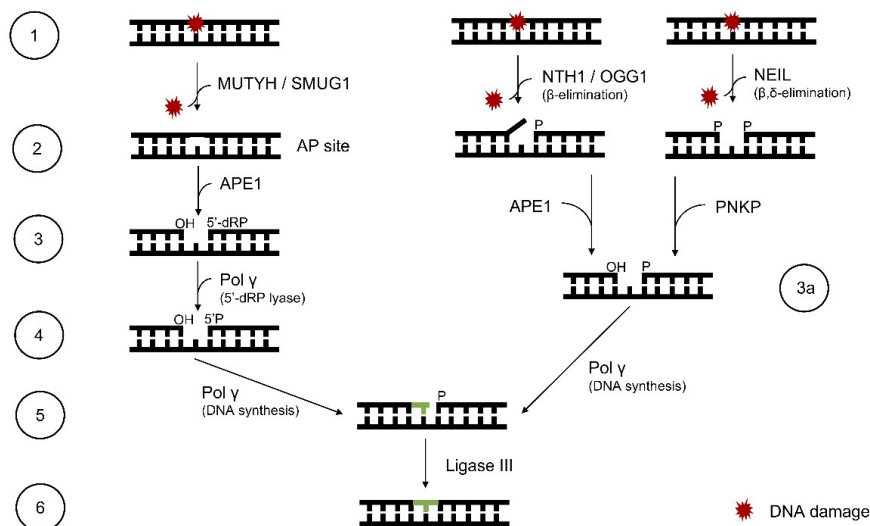
and DNA [16]. Moreover, mtROS may target DNA repair proteins, which impairs repair systems and increases the number of DNA lesions in the mitochondrial genome [148]. The main repair system in mitochondria is BER, which targets oxidative lesions in mtDNA. Therefore, it is essential that the repair mechanisms within the cell operate properly. A better understanding of the BER mechanism and its elements will allow preventing genomic instability and later diseases.

## 5. Mitochondrial BER System

Every living cell is constantly exposed to many factors, both internal and external, that interact with its genetic material. Products of cellular metabolism, ROS, environmental factors, food contaminants, ionizing radiation, and chemotherapeutics can cause DNA damage (2–7·10<sup>4</sup> lesions forming per day/per human cell) [148]. The lesions can block gene transcription and lead to mutations. Therefore, cellular repair systems must be constantly active, detect, and mitigate the effects of damage. The effectiveness of repair mechanisms depends on many factors, including the type of cell and the type of damage. In a situation where there are too many lesions or DNA repair systems that do not function effectively, the cell enters the path of apoptosis. Repair systems observed in mitochondria are base excision repair (BER), mismatch repair (MMR), and non-homologous end-joining (NHEJ) [149]. Homologous recombination (HR) is essential for mtDNA repair in plants and yeast, but it is not confirmed to operate in human mitochondria. In addition, nucleotide excision repair (NER) action is not identified in mitochondria [124]. BER is recognized as a predominant system in mitochondria and repairs lesions resulting from oxidation, deamination, alkylation, and SSBs [78]. It is worth noting that the repair process of mtDNA is slower than nDNA, and any defects in its operation may cause serious consequences for the entire cell. On the other hand, errors may also occur as a result of incorrect polymerase action during BER. The polymerase may mispair a base opposite the original lesion site, which often goes undetected and results in mutations. A majority of these mutations are single nucleotide deletions—it is the most common error in BER system [150]. To avoid genetic instability in mitochondria and an impaired action of respiratory pathways, the cell must be ready to repair occurring damage in a highly controlled way.

### 5.1. Mitochondrial BER Overview

The BER system is designed to repair damaged DNA by cutting out a single base (SP-BER) or a fragment of 2–10 nucleotides (LP-BER). The ability to excise a single base is a feature that distinguishes BER from other DNA repair mechanisms [151]. The BER system removes about 10<sup>4</sup> lesions per day in human cells and is based on the few steps (Figure 3): recognition of the lesion by specific glycosylases, excision of the damaged base, AP site removal, processing of strand ends, insertion of the correct nucleotide, and strands ligation [152].



**Figure 3.** The base excision repair (BER) system in mitochondria. (1) The first step is the action of DNA glycosylases. Depending on the type of damage, different glycosylases are recruited: monofunctional—molecule and adenine DNA glycosylase (MUTYH), single-strand selective monofunctional uracil DNA glycosylase (SMUG1), or bifunctional—endonuclease III homolog 1 (NTH1), 8-oxo-G DNA glycosylase 1 (OGG1), Nei-like 1 (NEIL). DNA glycosylase cleaves the  $\beta$ -N-glycosidic bond and releases the damaged base. (2) In the case of monofunctional glycosylases, an apurinic/aprimidinic (AP) site is created. Bifunctional glycosylases have AP endonuclease activity—they create a gap in the strand without AP endonuclease. (3) The AP site is incised by AP endonuclease (APE1). (3a) The AP site is processed by APE1 or polynucleotide kinase 3'-phosphatase (PNKP). (4) DNA polymerase  $\gamma$  (Poly) processes the 5'-end of the strand. (5) The gap in the strand is filled with correct nucleotide by Poly. (6) Strand is ligated by DNA ligase III (based on [78]).

Most of the lesions affect the spatial arrangement of the DNA helix, which improves the detection of the lesion by the cell. Specific repair proteins are recruited to bind to the damaged site so that subsequent repair elements can operate. Enzyme complexes consist of different proteins depending on the type of cell, type of damage, and the phase of the cell cycle. DNA glycosylases find the damaged site and cleave the  $\beta$ -N-glycosidic bond between the base and deoxyribose. This creates an AP site that is recognized by the AP endonuclease [153]. Various glycosylases are known, each of which is responsible for identifying a different type of damage. There are monofunctional glycosylases that cross  $\beta$ -N-glycosidic bonds and bifunctional glycosylases, which additionally can remove AP sites (by  $\beta$ -elimination or  $\beta,\gamma$ -elimination), resulting in a gap of only one nucleotide (they create SSB). Examples of mitochondrial monofunctional enzymes are uracil DNA glycosylase (UDG), which finds and excises uracil (U) from a single- or double-stranded DNA (ssDNA or dsDNA) molecule and adenine DNA glycosylase (MUTYH), which removes A mispaired with oxidized G. The AP endonuclease (APE1) hydrolyzes the phosphodiester linkage 5' from the AP site and thereby cleaves the DNA strand. Bifunctional glycosylases such as endonuclease III homolog 1 (NTH1) carries out both stages—recognition and removal of the lesion and AP site cleavage. However, to properly process strand ends, APE1 and polynucleotide kinase 3'-phosphatase (PNKP) are also needed. The free 3'-OH end formed this way allows DNA polymerase  $\gamma$  (Poly) to add the missing nucleotide. Poly is still commonly accepted as the only one (from 17) mammalian polymerase reported functioning in mitochondria, despite recent advances in the field [90,154]. BER in mitochondria resembles the one in the nucleus. For SP-BER, a single nucleotide is inserted, while for LP-BER, a longer fragment is inserted: the flap structure. Before the strands are ligated, the flap fragment is cut off by flap structure-specific endonuclease 1 (FEN1) with the assistance of exo/endonuclease G (EXO1) [155]. The last few years revealed an alternative LP-BER pathway. It does not involve FEN1 action and instead, it employs

DNA replication helicase/nuclease 2 (DNA2). DNA2 can stimulate Poly on its own or in coordination with FEN1 [149,156]. Eventually, a fragment of the DNA chain is “replaced” with a new one. The final stage of the BER mechanism is the joining of the new nucleotide fragment with the “old” strand by the action of LigIII [155]. At first, it was believed that in mitochondria, only SP-BER is present, but studies have already confirmed the activity of LP-BER. The removal of 2-deoxyribonolactone (dL) may be an example. DL covalently binds to Poly and blocks the SP-BER pathway. However, experiments with dL show that it is removed from mtDNA with the FEN1 endonuclease, which is the key protein in the LP-BER pathway [149]. LP-BER allows repairing more complex lesions such as tandem (lesions of two subsequent nucleobases) and/or clustered lesions (2 or more lesions present within 1–2 turns of the helix) [157]. However, the presence of accumulated damage sites may reduce the activity of BER enzymes [158]. On the other hand, it is reported that in the case of clustered lesions, they are preferentially repaired one by one, mainly by SP-BER, to avoid possible errors or DSBs while cutting out the nucleotide fragments on both strands [159]. Besides, depending on the type and mutual location of damage, only the first lesion can be effectively repaired. TFAM is also believed to be connected to BER action [160]. As BER acts on mtDNA, which is located close to the IMM and compacted within the nucleoid, the theory seems to be probable. Studies show that TFAM binds also to DNA containing 8-oxo-G and that it inhibits BER action in mtDNA. It is suggested that this inhibition is a necessary step for the mitochondria to “assess” the extent of damage and have time to import repair proteins from cytosol [155]. Mitochondrial glycosylases are encoded by nDNA, and those containing the mitochondrial targeting signal (MTS) are translocated into mitochondria [161,162]. The evidence is still limited, but some studies show that repair proteins are imported to mitochondria only in response to stress signals [155]. It is believed that the BER system has a bacterial origin, as the organelle itself [124]. Hence, the next chapter describes human mitochondrial and bacterial BER proteins and stresses their homology and overlapping functions.

### 5.2. BER Proteins in Human Mitochondria and Bacteria

The BER system is highly conserved throughout all organisms [124]. Bacterial DNA repair systems differ according to the species of bacteria and are dependent on the environment they inhabit [163]. However, the bacterial BER corresponds with the mitochondrial one. This repair pathway is crucial for maintaining genetic stability, especially in the context of oxidative damage. Enzymes responsible for repairing DNA in mitochondria and bacteria show common characteristics and functions. Moreover, bacteria are evolutionarily older than mitochondria, and the majority of bacterial BER proteins have homologs in human mitochondria (Table 1). Therefore, it should be considered as at least partial evidence for their shared origin, which supports to some extent the evolutionary theory of the bacterial origin of mitochondria.

The most important proteins in the BER pathway are glycosylases, as they initiate the repair process through detecting and the subsequent excision of DNA lesions. Glycosylases are divided into 4 families: the UDG family (contains characteristic  $\alpha/\beta$  fold), HtH family (contains characteristic helix-hairpin-helix structure), 3-methyl-purine (MPG) family also known as alkyladenine DNA (AAG) family (focused on alkylation damage), and formamidopyrimidine-DNA glycosylase (Fpg)/endonuclease VIII (Nei) family (contains characteristic helix-two turn-helix structure) [162]. Human mitochondria contain a set of glycosylases—UNG1, MUTYH, N-methylpurine DNA glycosylase (AAG/MPG), 8-oxoguanine glycosylase (OGG1), NTH1, and Nei-like 1 and 2 (NEIL1 and NEIL2) [78,124]. Bacteria also contain a set of glycosylases: Ung, Mug, endonucleases III (Nth), alkyladenine DNA glycosylases (Alka), adenine DNA glycosylase (MutY), 8-oxo-dGTP diphosphatase (MutT), MutM (also known as Fpg), Nei, and N-methylpurine-DNA glycosylase II (MpgII) [151,152].

The first glycosylase family (UDG family) contains 6 subfamilies, of which only the uracil N-glycosylase (UNG) subfamily is found in mitochondria [161]. Its mitochondrial isoform (UNG1) has a 30 amino acid MTS sequence, which is cleaved after entering IMM. UNG1 and its bacterial homolog Ung are monofunctional conserved enzymes that have the same functionality—the excision of U from



ss- and dsDNA [161]. U, in this case, may be paired with any canonical base. Interestingly, Ung was the first glycosylase ever discovered in *E. coli* by Lindahl [164]. Human *UNG* and *E. coli Ung* genes show over 55% identity and are believed to be one of the most ancient glycosylase genes [165].

**Table 1.** The BER system's main proteins in human mitochondria and bacteria [151,155,161,162].

	<i>H. sapiens</i>	<i>E. coli</i>
<u>DNA glycosylases</u>		
UDG family	UNG1	Ung Mug
HtH family	NTH1 OGG1 MUTYH MTH1	Nth MutY MutT MpgII AlkA
AAG family	AAG-A, AAG-B	
Fpg/Nei family	NEIL1, NEIL2	Fpg (mutM), Nei
<u>AP endonucleases</u>		
Xth family	APE1, APE2	ExoIII (XthA)
Nfo family		Endo IV (Nfo)
<u>DNA polymerases</u>		
Family A	Pol $\gamma$	PolI
Family X	Pol $\beta$	
Family AEP	PrimPol	
<u>DNA ligases</u>		
ATP-dependent	LigIII $\alpha$	
NAD <sup>+</sup> -dependent		LigA
<u>Other</u>		
Flap endonuclease	FEN1	

The HtH family of glycosylases includes six subfamilies: Nth, MutY, AlkA, MpgII, 8-oxo-G DNA glycosylase 1 (Ogg1), 8-oxo-G DNA glycosylase 2 (Ogg2), and OGG1. As the most abundant damage excised by the BER system is 8-oxo-G, its repair is studied extensively. The first described repair system that removed 8-oxo-G from DNA was recognized in *E. coli* and named the “GO-system”. It involved 3 repair enzymes: MutT (captures free, damaged bases from nucleotide pool to prevent their incorporation to the DNA strand), MutM (cleaves 8-oxo-G from DNA), and MutY (removes A mispaired with 8-oxo-G) [119]. In human mitochondria, the repair of 8-oxo-G is initiated by OGG1 [161]. OGG1 is a bifunctional enzyme with N-terminal MTS. It has isoforms specific for mitochondrial repair (OGG1-1b and c, OGG1-2a-2e), but their individual roles are still not fully understood [155,161]. Experiments on mitochondrial extracts of *ogg1*<sup>(-/-)</sup> mice show a higher amount of 8-oxo-G in mitochondria compared to the nucleus. It implies that nDNA has alternative repair pathways for such damage that are not present in mitochondria [166]. OGG1 also repairs a product of 8-oxo-G oxidation—FapyG. Glycosylases repairing 8-oxo-G in mitochondria have their bacterial homologs; for example, MutY corresponds with MUTYH [167]. Interestingly, MutY, the representative of MutY subfamily, is the first described enzyme that cleaves undamaged nucleobases—A mismatched with G. Monofunctional MUTYH has the same role of removing mismatched A from A::8-oxo-G, A::G, or A::C pairs. Among about 15 transcripts of the MUTYH enzyme, only one is present in mitochondria—MUTYH- $\alpha$ 3 with 14 amino acid MTS [161]. Another pair of homologs is 7,8-dihydro-8-guanine triphosphatase (MTH1, also known as NUDT1) and bacterial MutT. MTH1 neutralizes oxidized bases (e.g., 8-oxo-dGTP) from a nucleotide pool, preventing their incorporation into DNA during replication [168]. However, MTH1 was also found in mitochondria as an additional enzyme excising 8-oxo-G in the case of high 8-oxo-G concentration [169]. NTH1, a bifunctional glycosylase, is also expressed in the mitochondria and named after its bacterial

prototype Nth [161]. It recognizes lesions such as TG, 5-hydroxycytosine (5hC), 5-hydroxyuracil (5hU), and Fapy.

Monofunctional glycosylases from the AAG family excise deaminated and/or alkylated bases—3mA, 1-methylguanine (1mG), 7-methylguanine (7mG), hypoxanthine, and etheno adducts in ss- and ds-DNA. Two isoforms are identified in mitochondria: AAG-A (17 amino acid MTS) and AAG-B (12 amino acid MTS) [161]. AlkA glycosylase is present in many bacteria species and corresponds with the AAG mitochondrial enzymes. Bacterial AlkA lacks one HtH motif in its structure, but it recognizes the same substrates as AAG [161]. *E. coli* has also a second enzyme that is able to excise 3mA—DNA-3-methyladenine glycosylase 1 (Tag), which is about 10-fold less active than AlkA [152]. In Gram-positive bacteria and single-celled eukaryotes, other glycosylases are also observed as a part of the BER pathway e.g., alkylpurine glycosylase D (AlkD), which excises bulky alkylpurine adducts and alkylpurine glycosylase C (AlkC), which deals mostly with 3mA [170,171].

The Fpg/Nei family of human glycosylases recognizes oxidized pyrimidines such as G or FapyA, hydroxyuracil (HydU), TG, and hydantoin lesions. In bacteria, Fpg and Nei scan the bacterial genome for any distortions of the DNA helix, especially oxidized pyrimidines [152]. While Fpg has no mammalian homologs, Nei corresponds with NEIL glycosylases. NEILs are bifunctional glycosylases that excise damaged base through  $\beta,\delta$ -elimination. They are responsible for the excision of oxidative lesions such as 5hU, 5hC, and Fapy (8-oxo-G is not a preferred substrate). Two out of three NEIL isoforms identified in eukaryotes are present in mitochondria—NEIL1 (with 89 amino acid MTS), which repairs dsDNA, and NEIL2 (MTS length is not yet known), which repairs ssDNA [161]. NEIL glycosylases need a subsequent action of PNKP that removes 3'-phosphate and allows Poly to work [155]. PNKP seems not to play a role in bacterial BER; however, studies show it is essential for RNA repair in many bacteria species [172].

Endonucleases are another group of BER enzymes. They are translocated into mitochondria in response to oxidative stress signals [173,174]. Mitochondrial APE1 (MTS not identified) and APE2 (15 amino acid MTS) are both homologs to exonuclease III (ExoIII) in *E. coli* [175]. ExoIII (also known as XthA) and endonuclease IV (EndoIV, also known as Nfo) excises ribose and allows PolI action during BER in bacteria. If any errors appear, the post-replication recombination is another scenario that bacteria use to repair their DNA.

Polymerases are crucial for the BER mechanism. In mitochondria, Poly  $\gamma$  is commonly accepted as the only polymerase and well described [154]. The catalytic subunit of the enzyme has 3'→5' polymerase activity and 5'-deoxyribose lyase activity, which is essential for proper base excision and strand ends processing [176]. Poly  $\gamma$  is yet another BER component similar to bacterial ones. It is a homolog of family A polymerases such as PolI from *E. coli* or polymerase from bacteriophage T7. Recently, other types of polymerases are reported in mitochondria [177–180]. An interesting example of novel polymerase is PrimPol [181,182]. It is responsible for replication maintenance. When bulky damage appears and replication is stalled, PrimPol can bypass those lesions (e.g., 8-oxo-G or AP sites) and restart replication. Cell lines lacking PrimPol show a slower mtDNA replication rate [181]. Interestingly, it belongs to the archaeal asparaginyl endopeptidase (AEP) superfamily of polymerases. Studies describe in human mitochondria also other types of polymerases (e.g., polymerase  $\beta$ ), but results are inconclusive and still need further verifying [177].

The final element of the BER system is ligase. Bacterial and mitochondrial ligases belong to different subfamilies—mitochondrial LigIII is ATP-dependent, while LigA from *E. coli* needs a NAD<sup>+</sup> as its cofactor. LigIII is essential for proper mtDNA repair. It also seems to play a role in mitophagy [183]. While in nDNA it acts in coordination with X-ray repair cross-complementing protein 1 (XRCC1), in mitochondria, this cooperation is not observed [184]. However, some authors describe XRCC1 present in mitochondria as a scaffold for other BER proteins (e.g., NTH1 or NEIL1) [183]. An additional protein related to BER is poly(ADP-ribose) polymerase 1 (PARP1). It forms a complex with LigIII and mtDNA and interacts with EXOG1, TFAM, and Poly  $\gamma$ , serving as a negative regulator of repair processes [155].

Some human mitochondrial BER proteins do not have direct bacterial homologs described. However, other enzymes in bacteria may play those roles. For example, FEN1 endonuclease activity was first described in studies on bacterial polymerase complex, and now we know that bacteria use exonuclease activity of PolI instead of FEN1 during LP-BER [185]. In addition, PARP1 has no homologs in bacteria nor archaea—it may have been lost as a result of EGT during evolution [186]. On the other hand, some repair enzymes are highly conserved in many organisms. Human and bacterial UDG structures show identity in about 70% of amino acid residues [187]. Interestingly, enzymes of the BER system are also reported in archaea with high homology to eukaryotes. It may be considered as another piece of evidence of the archaeal origin of the ancestral host [188].

## 6. Conclusions

Mitochondria are crucial for maintaining the health of the cell and the integrity of the whole organism. Therefore, the origin of mitochondria and their similarity to bacteria have been discussed for many years. The theory of endosymbiosis is now well confirmed. It states that mitochondria originate from ancient  $\alpha$ -proteobacteria that have been engulfed by the host's cells over the course of evolution. Molecular machinery and mtDNA maintenance differ from their nuclear equivalents. It may yet be another argument in favor of their dissimilar origin. Similarities between human mitochondria and bacteria are observed in many aspects, ranging from the structure and physiology of the organelle to the construction and regulation of the genetic material. The BER system is a particularly interesting aspect to compare. As mitochondria are the site of OXPHOS, their genetic material is susceptible to oxidative DNA damage resulting from ROS action. Radicals may affect nucleobases in mtDNA and lead to subsequent mutations. Therefore, it is of crucial importance for the entire cell that the mitochondrion has effective repair systems (e.g., BER) which protect the integrity of mitochondrial genetic information. The majority of mtDNA mutations lead to degeneration diseases, e.g., in the heart and muscles. However, given the role of mtDNA in ATP production, mtDNA mutations may influence many other cell functions. As a result of its involvement in the most basic mitochondrial functionalities, mtDNA provides a lot of information about stress conditions affecting the cells. Moreover, taking into consideration that mitochondria are responsible for cellular respiration, any damage to mtDNA or other mitochondrial elements may cause long-term multisystemic failures and therefore lead to high morbidity and mortality [189]. To date, the main epidemiological factors of mitochondrial diseases remain still to be investigated and described. Mitochondria may contain both mutated and not mutated DNA molecules (heteroplasmy), which has far-reaching influence on cellular functions [78]. Specific symptoms of the disease and their intensity are highly dependent on the ratio of damaged to undamaged mtDNA molecules inside each mitochondrion. Moreover, the threshold of mtDNA heteroplasmy varies depending on the type of mutation and the type of tissue that is involved in the pathological process [78]. As a result, the patient may have some tissues with healthy and some tissues with mutated mtDNA. It causes variable symptoms throughout the course of the disease, which makes diagnosis more difficult [57]. Several hereditary diseases are mainly diagnosed based on family history due to a lack of diagnostic techniques that are able to cope with so many variables in the context of mtDNA mutations. Novel techniques are emerging, such as next-generation sequencing (NGS) or CRISPR/Cas9, which are promising in the context of mitochondrial disease studies [190]. Mitochondrial diseases are often associated with ATP synthesis defects; therefore, common symptoms include muscle weakness, cognitive defects, and brain degeneration, as all those cell types need a high amount of energy for proper functioning. It is roughly estimated that every 1 in 5000 people has some kind of mitochondrial mutation [10]. One of the most interesting is chloramphenicol toxicity, which results from mtDNA mutations. It is believed that mitochondrial sensitivity to antibiotics is related to its bacterial origin [191]. Examples of diseases related to dysfunctions in mitochondrial repair mechanisms and biochemical processes are presented in Table 2.

**Table 2.** Examples of diseases related to mitochondrial repair system; FEN1—flap endonuclease, AMP—adenosine monophosphate, dRP—deoxyribose phosphate lyase, PNKP—polynucleotide kinase 3'-phosphatase, APTX—aprataxin, TDP1—tyrosyl-DNA phosphodiesterase 1, ATM—ataxia telangiectasia mutated, LigIII—ligase III, OMIM database—Online Mendelian Inheritance in Man [192–196].

Disease	Clinical Symptoms of Disease	Impaired Protein	Protein Function in Mitochondria
Huntington's disease (HD) OMIM #143100	decrease in cognitive and motor functions	FEN1	Endonuclease, takes part in LP-BER
Microcephaly, seizures, and developmental delay (MCSZ) OMIM #613402	early infantile epileptic encephalopathy, cerebellar atrophy, peripheral neuropathy	PNKP	Occurs with Poly and NEIL2, major 3'-phosphatase
Ataxia-oculomotor apraxia 1 (AOA1) OMIM #208920	cerebellar ataxia with peripheral axonal neuropathy, oculomotor apraxia, hypoalbuminemia	APTX	Removes 5'-AMP and 5'-AMP-dRP from DNA
Spinocerebellar ataxia with axonal neuropathy-1 (SCAN1) OMIM #607250	cerebellar atrophy, peripheral neuropathy, gait disturbance, sensory impairment	TDP1	Takes part in the repair of 3'-abasic sites and topoisomerase I-linked DNA adducts
Ataxia-telangiectasia (A-T) OMIM #208900	cerebellar ataxia, immune defects, cells are highly sensitive to ionizing radiation	ATM	Regulates mtDNA copy number, LigIII, and mitophagy

Recently, mitochondrial disorders are also observed in relation to cancer development, neurodegenerative diseases, aging, and metabolic syndrome [78,197,198]. In the case of cancer, it is believed that mutations in mtDNA that lead to impaired respiration contribute to the propagation of cancerous phenotype. Moreover, the number of mtDNA copies have been correlated with different types of cancer. The decrease is reported for breast, liver, lung, and kidney cancers, while in prostate and head and neck cancers, excessive mtDNA copies are observed [199–201]. At the same time, cancer cell's mitochondria are considered as therapeutic targets, which may be a feature of personalized medicine in the future [202]. As for neurodegenerative disorders, our understanding of Alzheimer's and Parkinson's disease is far from ideal. Up-to-date studies linked a higher level of DNA damage (e.g., resulting from inactive OGG1) with Alzheimer's disease and mutations in genes coding for subunits of complex I of ETC with Parkinson's disease [192,193,203]. Quite recently, "free radical theory of aging" was the most commonly accepted. It states that aging is related to mitochondria and toxic ROS action, which in time impair cellular integrity, leading to aging and subsequent cell death. The theory has been challenged over the years, and interestingly, in recent studies, aging was shown from the new perspective as the remnant of the symbiotic evolution of mitochondria [204]. The authors claim that apoptosis (resulting in excessive fission) undergoes a process resembling phagosomal lysis in *Rickettsia*. Moreover, novel observations correlate metabolic disease with mtDNA integrity—if repair enzymes of the BER system are inactive, it may increase the risk of obesity and insulin resistance [78]. Mitochondrial functions have also been connected with physiological stress where interdependence is discussed [205].

The origin of mitochondria is important for the full understanding of the pathologies that emerge with mtDNA mutations. The background of mitochondrial diseases is highly complex—the diagnosis is tricky due to many variable factors, and the experimental studies are challenging. Therefore, studies on mtDNA damage and mutation may benefit from contrasting perspectives. Having this in mind, we show that modern bacteria species are not as different from human mitochondria as previously thought. Common features at the molecular level should be taken into account, because choosing bacteria as the experimental model may be of great use in the field of mitochondrial disease studies. Mitochondrial repair mechanisms are the central "protector" of mtDNA integrity from oxidative DNA damage. Therefore, the full understanding of the mitochondrial BER system may contribute greatly to the advancement of mitochondrial disease therapies [10,30].

**Author Contributions:** K.B. (70%): concept and design, acquisition, analysis, and interpretation of literature data, drafting the article, critical review in relation to important intellectual content, revision of the article, final approval of the version to be published; M.S. (5%): analysis and interpretation of literature data, revision of the article, final approval of the version to be published; J.K.-B. (5%): critical review in relation to important

intellectual content, revision of the article, final approval of the version to be published; B.T.K. (20%): analysis and interpretation of literature data, drafting the article, critical review in relation to important intellectual content, final approval of the version to be published. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This study was supported by the Medical University of Lodz (503/3-045-02/503-31-002) and by the National Science Center, Poland (grant No. 2016/23/B/NZ7/03367).

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

## Abbreviations

mtDNA	Mitochondrial DNA
nDNA	Nuclear DNA
OXPPOS	Oxidative phosphorylation
ROS	Reactive oxygen species
BER	Base excision repair
SP-BER	Short-patch BER
LP-BER	Long-patch BER
ETC	Electron transport chain
IMM	Inner mitochondrial membrane
OMM	Outer mitochondrial membrane
CL	Cardiolipin
PG	Peptidoglycan
D-loop	Displacement loop
Poly $\gamma$	DNA polymerase $\gamma$
PoI	DNA polymerase I
POLRMT	DNA-dependent RNA polymerase
TFAM	Mitochondrial transcription factor A
LigIII	DNA ligase III
8-oxo-G	8-oxoguanine
SSB	Single-strand break
DSB	Double strand break
AP site	Apurinic/aprimidinic site
SOD	Superoxide dismutase
CAT	Catalase
Gpx	Glutathione peroxidase
Trx	Thioredoxin
Prdx	Peroxiredoxin
GSH	Glutathione
OGG1	8-oxoguanine glycosylase
NEIL	Nei-like endonuclease
NTH1	Endonuclease III homolog 1
MUTYH	Human adenine DNA glycosylase
UDG	Uracil DNA glycosylase
UNG	Uracil N-glycosylase
APE1	AP endonuclease
PNKP	Polynucleotide kinase 3'-phosphatase
FEN1	Flap endonuclease
MTS	Mitochondrial targeting sequence
Fpg	Formamidopyrimidine-DNA glycosylase
Nei	Endonuclease VIII
AAG	N-methylpurine DNA glycosylase
AlkA	Alkyladenine DNA glycosylase
MutY	Adenine DNA glycosylase
MutT	8-oxo-dGTP diphosphatase

## References

1. Martin, W.F.; Garg, S.; Zimorski, V. Endosymbiotic theories for eukaryote origin. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* **2015**, *370*, 20140330. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Roger, A.J.; Muñoz-Gómez, S.A.; Kamikawa, R. The Origin and Diversification of Mitochondria. *Curr. Biol.* **2017**, *27*, 1177–1192. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Wang, Z.; Wu, M. An integrated phylogenomic approach toward pinpointing the origin of mitochondria. *Sci. Rep.* **2015**, *5*. [[CrossRef](#)]
4. Eme, L.; Ettema, T.J.G. The eukaryotic ancestor shapes up. *Nature* **2018**, *562*, 352–353. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Romano, A.H.; Conway, T. Evolution of carbohydrate metabolic pathways. *Res. Microbiol.* **1996**, *147*, 448–455. [[CrossRef](#)]
6. Lange, B.M.; Rujan, T.; Martin, W.; Croteau, R. Isoprenoid biosynthesis: The evolution of two ancient and distinct pathways across genomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2000**, *97*, 13172–13177. [[CrossRef](#)]
7. Gray, M.W. Mitochondrial evolution. *Science* **1999**, *283*. [[CrossRef](#)]
8. Booth, A.; Doolittle, W.F. Eukaryogenesis, how special really? *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2015**, *112*, 10278–10285. [[CrossRef](#)]
9. Lee, S.R.; Han, J. Mitochondrial Nucleoid: Shield and Switch of the Mitochondrial Genome. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2017**, *2017*, 1–15. [[CrossRef](#)]
10. Gorman, G.S.; Schaefer, A.M.; Ng, Y.; Gomez, N.; Blakely, E.L.; Alston, C.L.; Feeney, C.; Horvath, R.; Yu-Wai-Man, P.; Chinnery, P.F.; et al. Prevalence of nuclear and mitochondrial DNA mutations related to adult mitochondrial disease. *Ann. Neurol.* **2015**, *77*, 753–759. [[CrossRef](#)]
11. Gorman, G.S.; Chinnery, P.F.; DiMauro, S.; Hirano, M.; Koga, Y.; McFarland, R.; Suomalainen, A.; Thorburn, D.R.; Zeviani, M.; Turnbull, D.M. Mitochondrial diseases. *Nat. Rev. Dis. Prim.* **2016**, *2*, 1–23. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Liu, P.; Qian, L.; Sung, J.-S.; De Souza-Pinto, N.C.; Zheng, L.; Bogenhagen, D.F.; Bohr, V.A.; Wilson, D.M.; Shen, B.; Demple, B. Removal of Oxidative DNA Damage via FEN1-Dependent Long-Patch Base Excision Repair in Human Cell Mitochondria. *Mol. Cell. Biol.* **2008**, *28*, 4975–4987. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Akbari, M.; Visnes, T.; Krokan, H.E.; Otterlei, M. Mitochondrial base excision repair of uracil and AP sites takes place by single-nucleotide insertion and long-patch DNA synthesis. *DNA Repair* **2008**, *7*, 605–616. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Holzerová, E.; Prokisch, H. Mitochondria: Much ado about nothing? How dangerous is reactive oxygen species production? *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **2015**, *63*, 16–20. [[CrossRef](#)]
15. Burke, P.J. Mitochondria, Bioenergetics & Apoptosis in Cancer. *Trends Cancer* **2017**, *3*, 857–870. [[CrossRef](#)]
16. Meyer, A.; Laverny, G.; Bernardi, L.; Charles, A.L.; Alsaleh, G.; Pottecher, J.; Sibilía, J.; Geny, B. Mitochondria: An organelle of bacterial origin controlling inflammation. *Front. Immunol.* **2018**, *9*, 1–8. [[CrossRef](#)]
17. De Stefani, D.; Raffaello, A.; Teardo, E.; Szabò, I.; Rizzuto, R. A 40 kDa protein of the inner membrane is the mitochondrial calcium uniporter. *Nature* **2011**, *476*, 336–340. [[CrossRef](#)]
18. Lill, R.; Hoffmann, B.; Molik, S.; Pierik, A.J.; Rietzschel, N.; Stehling, O.; Uzarska, M.A.; Webert, H.; Wilbrecht, C.; Mühlhoff, U. The role of mitochondria in cellular iron-sulfur protein biogenesis and iron metabolism. *Biochim. Biophys. Acta* **2012**, *1823*, 1491–1508. [[CrossRef](#)]
19. Veatch, J.R.; McMurray, M.A.; Nelson, Z.W.; Gottschling, D.E. Mitochondrial dysfunction leads to nuclear genome instability: A link through iron-sulfur clusters. *Cell* **2009**, *137*, 1247–1258. [[CrossRef](#)]
20. Lackner, L.L. Determining the shape and cellular distribution of mitochondria: The integration of multiple activities. *Curr. Opin. Cell Biol.* **2013**, *25*, 471–476. [[CrossRef](#)]
21. D’Erchia, A.M.; Atlante, A.; Gadaleta, G.; Pavesi, G.; Chiara, M.; De Virgilio, C.; Manzari, C.; Mastropasqua, F.; Prazzoli, G.M.; Picardi, E.; et al. Tissue-specific mtDNA abundance from exome data and its correlation with mitochondrial transcription, mass and respiratory activity. *Mitochondrion* **2015**, *20*, 13–21. [[CrossRef](#)]
22. Taylor, S.W.; Fahy, E.; Zhang, B.; Glenn, G.M.; Warnock, D.E.; Wiley, S.; Murphy, A.N.; Gaucher, S.P.; Capaldi, R.A.; Gibson, B.W.; et al. Characterization of the human heart mitochondrial proteome. *Nat. Biotechnol.* **2003**, *21*, 281–286. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Pagliuso, A.; Cossart, P.; Stavru, F. The ever-growing complexity of the mitochondrial fission machinery. *Cell. Mol. Life Sci.* **2018**, *75*, 355–374. [[CrossRef](#)]

24. Bartolák-Suki, E.; Imsirovic, J.; Nishibori, Y.; Krishnan, R.; Suki, B. Regulation of Mitochondrial Structure and Dynamics by the Cytoskeleton and Mechanical Factors. *Int. J. Mol. Sci.* **2017**, *18*, 1812. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Boesch, P.; Weber-Lotfi, F.; Ibrahim, N.; Tarasenko, V.; Cosset, A.; Paulus, F.; Lightowlers, R.N.; Dietrich, A. DNA repair in organelles: Pathways, organization, regulation, relevance in disease and aging. *Biochim. Biophys. Acta* **2011**, *1813*, 186–200. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Schmidt, O.; Pfanner, N.; Meisinger, C. Mitochondrial protein import: From proteomics to functional mechanisms. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2010**, *11*, 655–667. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Scanlon, D.P.; Salter, M.W. Strangers in strange lands: Mitochondrial proteins found at extra-mitochondrial locations. *Biochem. J.* **2019**, *476*, 25–37. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Calvo, S.E.; Mootha, V.K. The Mitochondrial Proteome and Human Disease. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* **2010**, *11*, 25–44. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
29. Becker, T.; Song, J.; Pfanner, N. Versatility of Preprotein Transfer from the Cytosol to Mitochondria. *Trends Cell Biol.* **2019**, *29*, 534–548. [[CrossRef](#)]
30. Ryan, M.T. Mitochondria—The energy powerhouses. *Semin. Cell Dev. Biol.* **2018**, *76*, 130–131. [[CrossRef](#)]
31. Paradies, G.; Paradies, V.; Ruggiero, F.M.; Petrosillo, G. Role of Cardiolipin in Mitochondrial Function and Dynamics in Health and Disease: Molecular and Pharmacological Aspects. *Cells* **2019**, *8*, 728. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Frohman, M.A. Role of mitochondrial lipids in guiding fission and fusion. *J. Mol. Med.* **2015**, *93*, 263–269. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Mileykovskaya, E.; Dowhan, W. Cardiolipin Membrane Domains in Prokaryotes and Eukaryotes. *Biochim. Biophys. Acta* **2009**, *1788*, 2084–2091. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Kojima, R.; Kakimoto, Y.; Furuta, S.; Itoh, K.; Sesaki, H.; Endo, T.; Tamura, Y. Maintenance of Cardiolipin and Crista Structure Requires Cooperative Functions of Mitochondrial Dynamics and Phospholipid Transport. *Cell Rep.* **2019**, *26*, 518–528. [[CrossRef](#)]
35. Gustafsson, C.M.; Falkenberg, M.; Larsson, N.-G. Maintenance and Expression of Mammalian Mitochondrial DNA. *Annu. Rev. Biochem.* **2016**, *85*, 133–160. [[CrossRef](#)]
36. Schulz, H.N.; Jørgensen, B.B. Big acteria. *Annu. Rev. Microbiol.* **2001**, *55*, 105–137. [[CrossRef](#)]
37. Taheri-Araghi, S.; Bradde, S.; Sauls, J.T.; Hill, N.S.; Levin, P.A.; Paulsson, J.; Vergassola, M.; Jun, S. Cell-size control and homeostasis in bacteria. *Curr. Biol.* **2015**, *25*, 385–391. [[CrossRef](#)]
38. Prashar, A.; Bhatia, S.; Gigliozzi, D.; Martin, T.; Duncan, C.; Guyard, C.; Terebiznik, M.R. Filamentous morphology of bacteria delays the timing of phagosome morphogenesis in macrophages. *J. Cell Biol.* **2013**, *203*, 1081–1097. [[CrossRef](#)]
39. Williams, C. Who are you calling simple? *New Sci.* **2011**, *211*, 38–41. [[CrossRef](#)]
40. Ng, W.; Bassler, B.L. Bacterial Quorum-Sensing Network Architectures. *Annu. Rev. Genet.* **2009**, *43*, 197–222. [[CrossRef](#)]
41. Sochacki, K.A.; Shkel, I.A.; Record, M.T.; Weisshaar, J.C. Protein diffusion in the periplasm of E. coli under osmotic stress. *Biophys. J.* **2011**, *100*, 22–31. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Cabeen, M.T.; Jacobs-Wagner, C. Bacterial cell shape. *Nat. Rev. Microbiol.* **2005**, *3*, 601–610. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Huang, Z.; London, E. Cholesterol lipids and cholesterol-containing lipid rafts in bacteria. *Chem. Phys. Lipids* **2016**, *199*, 11–16. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Bramkamp, M.; Lopez, D. Exploring the Existence of Lipid Rafts in Bacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **2015**, *79*, 81–100. [[CrossRef](#)]
45. Michel, V.; Bakovic, M. Lipid rafts in health and disease. *Biol. Cell* **2007**, *99*, 129–140. [[CrossRef](#)]
46. Cossins, B.P.; Jacobson, M.P.; Guallar, V. A new view of the bacterial cytosol environment. *PLoS Comput. Biol.* **2011**, *7*. [[CrossRef](#)]
47. Hoppert, M.; Mayer, F. Principles of macromolecular organization and cell function in bacteria and archaea. *Cell Biochem. Biophys.* **1999**, *31*, 247–284. [[CrossRef](#)]
48. Lutkenhaus, J. Bacterial cytokinesis: Let the light shine in. *Curr. Biol.* **1997**, *7*, 573–575. [[CrossRef](#)]
49. Baranova, N.; Radler, P.; Hernández-Rocamora, V.M.; Alfonso, C.; López-Pelegrín, M.; Rivas, G.; Vollmer, W.; Loose, M. Diffusion and capture permits dynamic coupling between treadmilling FtsZ filaments and cell division proteins. *Nat. Microbiol.* **2020**, *5*, 407–417. [[CrossRef](#)]

50. Strahl, H.; Bürmann, F.; Hamoen, L.W. The actin homologue MreB organizes the bacterial cell membrane. *Nat. Commun.* **2014**, *5*, 3442. [[CrossRef](#)]
51. Wernegreen, J.J. Endosymbiont evolution: Predictions from theory and surprises From Genomes. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **2016**, *1360*, 71. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
52. Harish, A.; Kurland, C.G. Akaryotes and Eukaryotes are independent descendants of a universal common ancestor. *Biochimie* **2017**, *138*, 168–183. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
53. Archibald, J.M. Endosymbiosis and eukaryotic cell evolution. *Curr. Biol.* **2015**, *25*, R911–R921. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. Liesa, M.; Benador, I.; Miller, N.; Shirihai, O.S. Mitochondrial Function, Dynamics, and Quality Control. In *The Liver: Biology and Pathology*; Arias, I.M., Alter, H.J., Boyer, J.L., Cohen, D.E., Shafritz, D.A., Thorgeirsson, S.S., Wolkoff, A.W., Eds.; John Wiley & Sons, Inc.: Hoboken, NJ, USA, 2020; pp. 86–93.
55. Carré, M.; André, N.; Carles, G.; Borghi, H.; Brichese, L.; Briand, C.; Braguer, D. Tubulin Is an Inherent Component of Mitochondrial Membranes That Interacts with the Voltage-dependent Anion Channel. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 33664–33669. [[CrossRef](#)]
56. Torralba, D.; Baixauli, F.; Sánchez-Madrid, F. Mitochondria know no boundaries: Mechanisms and functions of intercellular mitochondrial transfer. *Front. Cell Dev. Biol.* **2016**, *4*, 1–11. [[CrossRef](#)]
57. Hahn, A.; Zuryn, S. The Cellular Mitochondrial Genome Landscape in Disease. *Trends Cell Biol.* **2019**, *29*, 227–240. [[CrossRef](#)]
58. Berridge, M.V.; McConnell, M.J.; Grasso, C.; Bajzikova, M.; Kovarova, J.; Neuzil, J. Horizontal transfer of mitochondria between mammalian cells: Beyond co-culture approaches. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **2016**, *38*, 75–82. [[CrossRef](#)]
59. Xia, M.F.; Zhang, Y.Z.; Jin, K.; Lu, Z.T.; Zeng, Z.; Xiong, W. Communication between mitochondria and other organelles: A brand-new perspective on mitochondria in cancer. *Cell Biosci.* **2019**, *9*, 1–19. [[CrossRef](#)]
60. Sansone, P.; Savini, C.; Kurelac, I.; Chang, Q.; Amato, L.B.; Strillacci, A.; Stepanova, A.; Iommarini, L.; Mastrolo, C.; Daly, L.; et al. Packaging and transfer of mitochondrial DNA via exosomes regulate escape from dormancy in hormonal therapy-resistant breast cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2017**, *114*, E9066–E9075. [[CrossRef](#)]
61. Yutin, N.; Wolf, M.Y.; Wolf, Y.I.; Koonin, E.V. The origins of phagocytosis and eukaryogenesis. *Biol. Direct* **2009**, *4*. [[CrossRef](#)]
62. Muñoz-Gómez, S.A.; Wideman, J.G.; Roger, A.J.; Slamovits, C.H.; Agashe, D. The origin of mitochondrial cristae from alphaproteobacteria. *Mol. Biol. Evol.* **2017**, *34*, 943–956. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
63. Horvath, S.E.; Daum, G. Lipids of mitochondria. *Prog. Lipid Res.* **2013**, *52*, 590–614. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
64. Walker, J.E. The ATP synthase: The understood, the uncertain and the unknown. *Biochem. Soc. Trans.* **2013**, *41*, 1–16. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
65. Guo, H.; Suzuki, T.; Rubinstein, J.L. Structure of a bacterial atp synthase. *Elife* **2019**, *8*, 1–17. [[CrossRef](#)]
66. Pallen, M.J. Time to recognise that mitochondria are bacteria? *Trends Microbiol.* **2011**, *19*, 58–64. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
67. Meyer, J.N.; Leuthner, T.C.; Luz, A.L. Mitochondrial fusion, fission, and mitochondrial toxicity. *Toxicology* **2017**, *391*, 42–53. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
68. Bach, D.; Pich, S.; Soriano, F.X.; Vega, N.; Baumgartner, B.; Oriola, J.; Dagaard, J.R.; Lloberas, J.; Camps, M.; Zierath, J.R.; et al. Mitofusin-2 determines mitochondrial network architecture and mitochondrial metabolism: A novel regulatory mechanism altered in obesity. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 17190–17197. [[CrossRef](#)]
69. Farmer, T.; Naslavsky, N.; Caplan, S. Tying trafficking to fusion and fission at the mighty mitochondria. *Traffic* **2018**, *19*, 569–577. [[CrossRef](#)]
70. Ciarlo, L.; Vona, R.; Manganelli, V.; Gambardella, L.; Raggi, C.; Marconi, M.; Malorni, W.; Sorice, M.; Garofalo, T.; Matarrese, P. Recruitment of mitofusin 2 into “lipid rafts” drives mitochondria fusion induced by Mdivi-1. *Oncotarget* **2018**, *9*, 18869–18884. [[CrossRef](#)]
71. Chen, H.; Vermulst, M.; Wang, Y.E.; Chomyn, A.; Prolla, T.A.; McCaffery, J.M.; Chan, D.C. Mitochondrial fusion is required for mtdna stability in skeletal muscle and tolerance of mtDNA mutations. *Cell* **2010**, *141*, 280–289. [[CrossRef](#)]
72. Wong, Y.C.; Ysselstein, D.; Krainc, D. Mitochondria-lysosome contacts regulate mitochondrial fission via RAB7 GTP hydrolysis. *Nature* **2018**, *554*, 382–386. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]



73. Nagashima, S.; Tábara, L.C.; Tilokani, L.; Paupe, V.; Anand, H.; Pogson, J.H.; Zunino, R.; McBride, H.M.; Prudent, J. Golgi-derived PI(4)P-containing vesicles drive late steps of mitochondrial division. *Science* **2020**, *367*, 1366–1371. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
74. Schnupf, P.; Gaboriau-Routhiau, V.; Gros, M.; Friedman, R.; Moya-Nilges, M.; Nigro, G.; Cerf-Bensussan, N.; Sansonetti, P.J. Growth and host interaction of mouse segmented filamentous bacteria in vitro. *Nature* **2015**, *520*, 99–103. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
75. Vedyaykin, A.D.; Ponomareva, E.V.; Khodorkovskii, M.A.; Borchsenius, S.N.; Vishnyakov, I.E. Mechanisms of Bacterial Cell Division. *Microbiology* **2019**, *88*, 245–260. [[CrossRef](#)]
76. Harry, E.; Monahan, L.; Thompson, L. Bacterial Cell Division: The Mechanism and Its Precision. *Int. Rev. Cytol.* **2006**, *253*, 27–94. [[CrossRef](#)]
77. Spier, A.; Sachse, M.; Tham, N.T.; Matondo, M.; Cossart, P.; Stavru, F. Bacterial FtsZ Induces Mitochondrial Fission in Human Cells. *bioRxiv* **2020**. [[CrossRef](#)]
78. Sharma, P.; Sampath, H. Mitochondrial DNA Integrity: Role in Health and Disease. *Cells* **2019**, *8*, 100. [[CrossRef](#)]
79. Wallace, D.C.; Chalkia, D. Mitochondrial DNA genetics and the heteroplasmy conundrum in evolution and disease. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* **2013**, *3*, 1–47. [[CrossRef](#)]
80. Wang, Y.; Bogenhagen, D.F. Human mitochondrial DNA nucleoids are linked to protein folding machinery and metabolic enzymes at the mitochondrial inner membrane. *J. Biol. Chem.* **2006**, *281*, 25791–25802. [[CrossRef](#)]
81. Harner, M.; Körner, C.; Walther, D.; Mokranjac, D.; Kaesmacher, J.; Welsch, U.; Griffith, J.; Mann, M.; Reggiori, F.; Neupert, W. The mitochondrial contact site complex, a determinant of mitochondrial architecture. *EMBO J.* **2011**, *30*, 4356–4370. [[CrossRef](#)]
82. Bonekamp, N.A.; Larsson, N.G. SnapShot: Mitochondrial Nucleoid. *Cell* **2018**, *172*, 388–388.e1. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
83. Kukat, C.; Wurm, C.A.; Spähr, H.; Falkenberg, M.; Larsson, N.G.; Jakobs, S. Super-resolution microscopy reveals that mammalian mitochondrial nucleoids have a uniform size and frequently contain a single copy of mtDNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2011**, *108*, 13534–13539. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
84. Hillen, H.S.; Temiakov, D.; Cramer, P. Structural basis of mitochondrial transcription. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2018**, *25*, 754–765. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
85. Robberson, D.L.; Kasamatsu, H.; Vinograd, J. Replication of mitochondrial DNA. Circular replicative intermediates in mouse L cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1972**, *69*, 737–741. [[CrossRef](#)]
86. Yasukawa, T.; Kang, D. An overview of mammalian mitochondrial DNA replication mechanisms. *J. Biochem.* **2018**, *164*, 183–193. [[CrossRef](#)]
87. Zinovkina, L.A. DNA Replication in Human Mitochondria. *Biochemistry* **2019**, *84*, 884–895. [[CrossRef](#)]
88. Herbers, E.; Kekäläinen, N.J.; Hängas, A.; Pohjoismäki, J.L.; Goffart, S. Tissue specific differences in mitochondrial DNA maintenance and expression. *Mitochondrion* **2019**, *44*, 85–92. [[CrossRef](#)]
89. Zheng, W.; Khrapko, K.; Coller, H.A.; Thilly, W.G.; Copeland, W.C. Origins of human mitochondrial point mutations as DNA polymerase  $\gamma$ -mediated errors. *Mutat. Res. Fundam. Mol. Mech. Mutagenes.* **2006**, *599*, 11–20. [[CrossRef](#)]
90. Kotrys, A.V.; Szczesny, R.J. Mitochondrial Gene Expression and Beyond—Novel Aspects of Cellular Physiology. *Cells* **2020**, *9*, 17. [[CrossRef](#)]
91. Litonin, D.; Sologub, M.; Shi, Y.; Savkina, M.; Anikin, M.; Falkenberg, M.; Gustafsson, C.M.; Temiakov, D. Human mitochondrial transcription revisited: Only TFAM and TFB2M are required for transcription of the mitochondrial genes in vitro. *J. Biol. Chem.* **2010**, *285*, 18129–18133. [[CrossRef](#)]
92. Terzioglu, M.; Ruzzenente, B.; Harmel, J.; Mourier, A.; Jemt, E.; López, M.D.; Kukat, C.; Stewart, J.B.; Wibom, R.; Meharg, C.; et al. MTERF1 Binds mtDNA to prevent transcriptional interference at the light-strand promoter but is dispensable for rRNA gene transcription regulation. *Cell Metab.* **2013**, *17*, 618–626. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
93. Hällberg, B.M.; Larsson, N.G. Making proteins in the powerhouse. *Cell Metab.* **2014**, *20*, 226–240. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
94. Agrawal, R.K.; Sharma, M.R. Structural aspects of mitochondrial translational apparatus. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2012**, *22*, 797–803. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

95. D'Souza, A.R.; Minczuk, M. Mitochondrial transcription and translation: Overview. *Essays Biochem.* **2018**, *62*, 309–320. [[CrossRef](#)]
96. Yarham, J.W.; Al-Dosary, M.; Blakely, E.L.; Alston, C.L.; Taylor, R.W.; Elson, J.L.; Mcfarland, R. A comparative analysis approach to determining the pathogenicity of mitochondrial tRNA mutations. *Hum. Mutat.* **2011**, *32*, 1319–1325. [[CrossRef](#)]
97. Blakely, E.L.; Yarham, J.W.; Alston, C.L.; Craig, K.; Poulton, J.; Brierley, C.; Park, S.M.; Dean, A.; Xuereb, J.H.; Anderson, K.N.; et al. Pathogenic mitochondrial tRNA point mutations: Nine novel mutations affirm their importance as a cause of mitochondrial disease. *Hum. Mutat.* **2013**, *34*, 1260–1268. [[CrossRef](#)]
98. Garcia, I.; Jones, E.; Ramos, M.; Innis-Whitehouse, W.; Gilkerson, R. The little big genome: The organization of mitochondrial DNA. *Front. Biosci.* **2017**, *22*, 710–721.
99. Van Haute, L.; Powell, C.A.; Minczuk, M. Dealing with an unconventional genetic code in mitochondria: The biogenesis and pathogenic defects of the 5-formylcytosine modification in mitochondrial tRNAMet. *Biomolecules* **2017**, *7*, 24. [[CrossRef](#)]
100. Chemale, G.; Paneto, G.G.; Menezes, M.A.M.; De Freitas, J.M.; Jacques, G.S.; Cicarelli, R.M.B.; Fagundes, P.R. Development and validation of a D-loop mtDNA SNP assay for the screening of specimens in forensic casework. *Forensic Sci. Int. Genet.* **2013**, *7*, 353–358. [[CrossRef](#)]
101. Stroud, D.A.; Surgenor, E.E.; Formosa, L.E.; Reljic, B.; Frazier, A.E.; Dibley, M.G.; Osellame, L.D.; Stait, T.; Beilharz, T.H.; Thorburn, D.R.; et al. Accessory subunits are integral for assembly and function of human mitochondrial complex I. *Nature* **2016**, *538*, 123–126. [[CrossRef](#)]
102. Sousa, J.S.; D'Imprima, E.; Vonck, J. Mitochondrial Respiratory Chain Complexes. In *Subcellular Biochemistry*; Springer Nature Switzerland AG.: Cham, Switzerland, 2018; ISBN 9789811077579.
103. Allen, J.F. Why chloroplasts and mitochondria retain their own genomes and genetic systems: Colocalization for redox regulation of gene expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2015**, *112*, 10231–10238. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
104. Björkholm, P.; Ernst, A.M.; Hagström, E.; Andersson, S.G.E. Why mitochondria need a genome revisited. *FEBS Lett.* **2017**, *591*, 65–75. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
105. Bobay, L.M.; Ochman, H. The evolution of bacterial genome architecture. *Front. Genet.* **2017**, *8*, 1–6. [[CrossRef](#)]
106. Trevors, J.T. Genome size in bacteria. *Antonie Leeuwenhoek Int. J. Gen. Mol. Microbiol.* **1996**, *69*, 293–303. [[CrossRef](#)]
107. Nilsson, A.I.; Koskiniemi, S.; Eriksson, S.; Kugelberg, E.; Hinton, J.C.D.; Andersson, D.I. Bacterial genome size reduction by experimental evolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2005**, *102*, 12112–12116. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
108. Dillon, S.C.; Dorman, C.J. Bacterial nucleoid-associated proteins, nucleoid structure and gene expression. *Nat. Rev. Microbiol.* **2010**, *8*, 185–195. [[CrossRef](#)]
109. Wang, W.; Li, G.W.; Chen, C.; Xie, X.S.; Zhuang, X. Chromosome organization by a nucleoid-associated protein in live bacteria. *Science* **2011**, *333*, 1445–1449. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
110. Ranea, J.A.G.; Buchan, D.W.A.; Thornton, J.M.; Orengo, C.A. Evolution of Protein Superfamilies and Bacterial Genome Size. *J. Mol. Biol.* **2004**, *336*, 871–887. [[CrossRef](#)]
111. Almpanis, A.; Swain, M.; Gatherer, D.; McEwan, N. Correlation between bacterial G+C content, genome size and the G+C content of associated plasmids and bacteriophages. *Microb. Genom.* **2018**, *4*, 168. [[CrossRef](#)]
112. Woldringh, C.L.; Jensen, P.R.; Westerhoff, H.V. Structure and partitioning of bacterial DNA: Determined by a balance of compaction and expansion forces? *FEMS Microbiol. Lett.* **1995**, *131*, 235–242. [[CrossRef](#)]
113. Robinson, A.; Van Oijen, A.M. Bacterial replication, transcription and translation: Mechanistic insights from single-molecule biochemical studies. *Nat. Rev. Microbiol.* **2013**, *11*, 303–315. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
114. Rodnina, M.V. Translation in prokaryotes. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **2018**, *10*, 1–22. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
115. Dorman, C.J.; Dorman, M.J. DNA supercoiling is a fundamental regulatory principle in the control of bacterial gene expression. *Biophys. Rev.* **2016**, *8*, 89–100. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
116. Murray, B.E.  $\beta$ -Lactamase-producing enterococci. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1992**, *36*, 2355–2359. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
117. Barshad, G.; Marom, S.; Cohen, T.; Mishmar, D. Mitochondrial DNA Transcription and Its Regulation: An Evolutionary Perspective. *Trends Genet.* **2018**, *34*, 682–692. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

118. Akhmedov, A.T.; Marín-García, J. Mitochondrial DNA maintenance: An appraisal. *Mol. Cell. Biochem.* **2015**, *409*, 283–305. [[CrossRef](#)]
119. Whitaker, A.M.; Schaich, M.A.; Smith, M.S.; Flynn, T.S.; Freudenthal, B.D. Base excision repair of oxidative DNA damage from mechanism to disease. *Front. Biosci.* **2017**, *22*, 1493–1522. [[CrossRef](#)]
120. Ba, X.; Boldogh, L. 8-Oxoguanine DNA glycosylase 1: Beyond repair of the oxidatively modified base lesions. *Redox Biol.* **2018**, *14*, 669–678. [[CrossRef](#)]
121. Greenberg, M.M. The Formamidopyrimidines: Purine Lesions Formed in Competition With 8-Oxopurines From Oxidative Stress. *ACC Chem. Res.* **2012**, *45*, 588–597. [[CrossRef](#)]
122. Kusumoto, R.; Masutani, C.; Iwai, S.; Hanaoka, F. Translesion synthesis by human DNA polymerase  $\eta$  across thymine glycol lesions. *Biochemistry* **2002**, *41*, 6090–6099. [[CrossRef](#)]
123. Dobbs, T.A.; Palmer, P.; Maniou, Z.; Lomax, M.E.; O'Neill, P. Interplay of two major repair pathways in the processing of complex double-strand DNA breaks. *DNA Repair (Amst)* **2008**, *7*, 1372–1383. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
124. Garcia-Lepe, U.O.; Bermudez-Cruz, R. Mitochondrial Genome Maintenance: Damage and Repair Pathways. In *DNA Repair—An Update*; IntechOpen: London, UK, 2019; p. 21. ISBN 978-1-83880-784-9.
125. Posse, V.; Shahzad, S.; Falkenberg, M.; Hällberg, B.M.; Gustafsson, C.M. TEFM is a potent stimulator of mitochondrial transcription elongation in vitro. *Nucleic Acids Res.* **2015**, *43*, 2615–2624. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
126. Das, K.C.; White, C.W. Redox systems of the cell: Possible links and implications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, *99*, 9617–9618. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
127. Bazinet, L.; Doyen, A. Antioxidants, mechanisms, and recovery by membrane processes. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **2017**, *57*, 677–700. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
128. Jastroch, M.; Divakaruni, A.S.; Mookerjee, S.; Treberg, J.R.; Brand, M.D. Mitochondrial proton and electron leaks. *Essays Biochem.* **2010**, *47*, 53–67. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
129. Gao, L.; Laude, K.; Cai, H. Mitochondrial Pathophysiology, Reactive Oxygen Species, and Cardiovascular Diseases. *Vet. Clin. N. Am. Small Anim. Pract.* **2008**, *38*, 137–154. [[CrossRef](#)]
130. Inoue, M.; Sato, E.F.; Nishikawa, M.; Park, A.-M.; Kira, Y.; Imada, I.; Utsumi, K. Mitochondrial Generation of Reactive Oxygen Species and its Role in Aerobic Life. *Curr. Med. Chem.* **2005**, *10*, 2495–2505. [[CrossRef](#)]
131. Venditti, P.; Di Stefano, L.; Di Meo, S. Mitochondrial metabolism of reactive oxygen species. *Mitochondrion* **2013**, *13*, 71–82. [[CrossRef](#)]
132. Birben, E.; Sahiner, U.M.; Sackesen, C.; Erzurum, S.; Kalayci, O. Oxidative stress and antioxidant defense. *World Allergy Organ. J.* **2012**, *5*, 9–19. [[CrossRef](#)]
133. Antonarakis, S.E.; Lyle, R.; Dermitzakis, E.T.; Reymond, A.; Deutsch, S. Chromosome 21 and Down syndrome: From genomics to pathophysiology. *Nat. Rev. Genet.* **2004**, *5*, 725–738. [[CrossRef](#)]
134. Coskun, P.E.; Busciglio, J. Oxidative stress and mitochondrial dysfunction in Down's syndrome: Relevance to aging and dementia. *Curr. Gerontol. Geriatr. Res.* **2012**, *2012*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
135. Gulesserian, T.; Seidl, R.; Hardmeier, R.; Cairns, N.; Lubec, G. Superoxide dismutase SOD1, encoded on chromosome 21, but not SOD2 is overexpressed in brains of patients with Down Syndrome. *J. Invest. Med.* **2001**, *49*, 41–46. [[CrossRef](#)]
136. Patel, Y.; Moraes, Y.C.; Latchman, D.; Coffin, R.; De Belleruche, J. Neuroprotective effects of copper/zinc-dependent superoxide dismutase against a wide variety of death-inducing stimuli and proapoptotic effect of familial amyotrophic lateral sclerosis mutations. *Mol. Brain Res.* **2002**, *109*, 189–197. [[CrossRef](#)]
137. Cristiano, F.; De Haan, J.B.; Iannello, R.C.; Kola, I. Changes in the levels of enzymes which modulate the antioxidant balance occur during aging and correlate with cellular damage. *Mech. Ageing Dev.* **1995**, *80*, 93–105. [[CrossRef](#)]
138. Lei, X.G.; Zhu, J.H.; Cheng, W.H.; Bao, Y.; Ho, Y.S.; Reddi, A.R.; Holmgren, A.; Arnér, E.S.J. Paradoxical roles of antioxidant enzymes: Basic mechanisms and health implications. *Physiol. Rev.* **2015**, *96*, 307–364. [[CrossRef](#)]
139. Cadet, J.; Wagner, J.R. DNA Base Damage by Reactive Oxygen Species, Oxidizing Agents, and UV Radiation. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **2013**, *5*, a012559. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
140. Samanta, D.; Semenza, G.L. Maintenance of redox homeostasis by hypoxia-inducible factors. *Redox Biol.* **2017**, *13*, 331–335. [[CrossRef](#)]

141. He, L.; He, T.; Farrar, S.; Ji, L.; Liu, T.; Ma, X. Antioxidants Maintain Cellular Redox Homeostasis by Elimination of Reactive Oxygen Species. *Cell. Physiol. Biochem.* **2017**, *44*, 532–553. [[CrossRef](#)]
142. Zhong, H.; Yin, H. Role of lipid peroxidation derived 4-hydroxynonenal (4-HNE) in cancer: Focusing on mitochondria. *Redox Biol.* **2015**, *4*, 193–199. [[CrossRef](#)]
143. Ji, Y.; Dai, Z.; Wu, G.; Wu, Z. 4-Hydroxy-2-nonenal induces apoptosis by activating ERK1/2 signaling and depleting intracellular glutathione in intestinal epithelial cells. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 1–13. [[CrossRef](#)]
144. Shadel, G.S.; Horvath, T.L. Mitochondrial ROS signaling in organismal homeostasis. *Cell* **2015**, *163*, 560–569. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
145. McBee, M.E.; Chionh, Y.H.; Sharaf, M.L.; Ho, P.; Cai, M.W.L.; Dedon, P.C. Production of superoxide in bacteria is stress- and cell state-dependent: A gating-optimized flow cytometry method that minimizes ROS measurement artifacts with fluorescent dyes. *Front. Microbiol.* **2017**, *8*, 1–17. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
146. Imlay, J.A. The molecular mechanisms and physiological consequences of oxidative stress: Lessons from a model bacterium. *Nat. Rev. Microbiol.* **2013**, *11*, 443–454. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
147. Janowska, B.; Komisarski, M.; Prorok, P.; Sokolowska, B.; Kuśmierk, J.; Janion, C.; Tudek, B. Nucleotide excision repair and recombination are engaged in repair of trans-4-hydroxy-2-nonenal adducts to DNA bases in *Escherichia coli*. *Int. J. Biol. Sci.* **2009**, *5*, 611–620. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
148. Alnajjar, K.S.; Sweasy, J.B. A new perspective on oxidation of DNA repair proteins and cancer. *DNA Repair (Amst)* **2019**, *76*, 60–69. [[CrossRef](#)]
149. Muftuoglu, M.; Mori, M.P.; Souza-Pinto, N.C.D. Formation and repair of oxidative damage in the mitochondrial DNA. *Mitochondrion* **2014**, *17*, 164–181. [[CrossRef](#)]
150. Copeland, W.C. The Mitochondrial DNA Polymerase in Health and Disease. *Subcell. Biochem.* **2010**, *50*, 17–42. [[CrossRef](#)]
151. Zharkov, D.O. Base excision DNA repair. *Cell. Mol. Life Sci.* **2008**, *65*, 1544–1565. [[CrossRef](#)]
152. Krwawicz, J.; Arczewska, K.D.; Speina, E.; Maciejewska, A.; Grzesiuk, E. Bacterial DNA repair genes and their eukaryotic homologues: 1. Mutations in genes involved in base excision repair (BER) and DNA-end processors and their implication in mutagenesis and human disease. *Acta Biochim. Pol.* **2007**, *54*, 413–434. [[CrossRef](#)]
153. Wallace, S. Base excision repair: A critical player in many games. *DNA Repair (Amst)* **2014**, *19*, 14–26. [[CrossRef](#)]
154. Krasich, R.; Copeland, W.C. DNA polymerases in the mitochondria: A critical review of the evidence. *Front. Biosci.* **2017**, *22*, 692–709. [[CrossRef](#)]
155. Zinovkina, L.A. Mechanisms of Mitochondrial DNA Repair in Mammals. *Biochemistry* **2018**, *83*, 233–249. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
156. De Souza-Pinto, N.C.; Aamann, M.D.; Kulikowicz, T.; Stevnsner, T.V.; Bohr, V.A. Mitochondrial helicases and mitochondrial genome maintenance. *Mech. Ageing Dev.* **2010**, *131*, 503–510. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
157. Cadet, J.; Ravanat, J.-L.; TavernaPorro, M.; Menoni, H.; Angelov, D. Oxidatively generated complex DNA damage: Tandem and clustered lesions. *Cancer Lett.* **2012**, *327*, 5–15. [[CrossRef](#)]
158. Lomax, M.E.; Cunniffe, S.; O'Neill, P. 8-OxoG retards the activity of the ligase III/XRCC1 complex during the repair of a single-strand break, when present within a clustered DNA damage site. *DNA Repair (Amst)* **2004**, *3*, 289–299. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
159. Lomax, M.E.; Cunniffe, S.; O'Neill, P. Efficiency of repair of an abasic site within DNA clustered damage sites by mammalian cell nuclear extracts. *Biochemistry* **2004**, *43*, 11017–11026. [[CrossRef](#)]
160. Canugovi, C.; Maynard, S.; Bayne, A.C.V.; Sykora, P.; Tian, J.; De Souza-Pinto, N.C.; Croteau, D.L.; Bohr, V.A. The mitochondrial transcription factor A functions in mitochondrial base excision repair. *DNA Repair (Amst)* **2010**, *9*, 1080–1089. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
161. Prakash, A.; Doublet, S. Base Excision Repair in the Mitochondria. *J. Cell Biochem.* **2015**, *116*, 1490–1499. [[CrossRef](#)]
162. Krokan, H.E.; Bjoras, M. Base excision repair. *DNA Repair Genet. Instab. Cancer* **2013**, *5*, 1–22. [[CrossRef](#)]
163. Van Der Veen, S.; Tang, C.M. The BER necessities: The repair of DNA damage in human-adapted bacterial pathogens. *Nat. Rev. Microbiol.* **2015**, *13*, 83–94. [[CrossRef](#)]
164. Lindahl, T. An N-Glycosidase from *Escherichia coli* That Releases Free Uracil from DNA Containing Deaminated Cytosine Residues *Biochemistry: Lindahl. Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1974**, *71*, 3649–3653. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

165. Krokan, H.E.; Nilsen, H.; Skorpen, F.; Skjelbred, C.; Akbari, M.; Arne, P.; As, A.; Slupphaug, G. Properties and Functions of Human Uracil-DNA Glycosylase from the UNG Gene. *Nucleic Acids Res.* **2001**, *29*, 365–386.
166. De Souza-Pinto, N.C.; Eide, L.; Hogue, B.A.; Thybo, T.; Stevnsner, T.; Seeberg, E.; Klungland, A.; Bohr, V.A. Repair of 8-oxodeoxyguanosine lesions in mitochondrial DNA depends on the oxoguanine DNA glycosylase (OGG1) gene and 8-oxoguanine accumulates in the mitochondrial DNA of OGG1-defective mice. *Cancer Res.* **2001**, *61*, 5378–5381.
167. Hwang, B.J.; Shi, G.; Lu, A.L. Mammalian MutY homolog (MYH or MUTYH) protects cells from oxidative DNA damage. *DNA Repair (Amst)* **2014**, *13*, 10–21. [[CrossRef](#)]
168. Takahashi, M.; Yamagata, Y.; Iwai, S.; Nakabeppu, Y. Structure of Human MTH1, a Nudix Family Hydrolase That Selectively Degrades Oxidized Purine Nucleoside Triphosphates. *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 33806–33815. [[CrossRef](#)]
169. Nakabeppu, Y.; Kajitani, K.; Sakamoto, K. Mini review MTH1, an oxidized purine nucleoside triphosphatase, prevents the cytotoxicity and neurotoxicity of oxidized purine nucleotides. *DNA Repair (Amst)* **2006**, *5*, 761–772. [[CrossRef](#)]
170. Mullins, E.A.; Shi, R.; Eichman, B.F. Toxicity and repair of DNA adducts produced by the natural product yatakemycin. *Nat. Chem. Biol.* **2017**, *13*, 1002–1008. [[CrossRef](#)]
171. Shi, R.; Mullins, E.A.; Shen, X.; Lay, K.T.; Yuen, P.K.; David, S.S.; Rokas, A.; Eichman, B.F. Selective base excision repair of DNA damage by the non-base-flipping DNA glycosylase AlkC. *EMBO J.* **2018**, *37*, 63–74. [[CrossRef](#)]
172. Wang, L.K.; Das, U.; Smith, P.; Shuman, S. Structure and mechanism of the polynucleotide kinase component of the bacterial Pnpk-Hen1 RNA repair system. *RNA* **2012**, *18*, 2277–2286. [[CrossRef](#)]
173. Tsuchimoto, D. Human APE2 protein is mostly localized in the nuclei and to some extent in the mitochondria, while nuclear APE2 is partly associated with proliferating cell nuclear antigen. *Nucleic Acids Res.* **2001**, *29*, 2349–2360. [[CrossRef](#)]
174. Frossi, B.; Tell, G.; Spessotto, P.; Colombatti, A.; Vitale, G.; Pucillo, C. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> induces translocation of APE/Ref-1 to mitochondria in the Raji B-cell line. *J. Cell. Physiol.* **2002**, *193*, 180–186. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
175. Hadi, M.Z.; Wilson, D.M. Second human protein with homology to the escherichia coli abasic endonuclease exonuclease III. *Environ. Mol. Mutagen.* **2000**, *36*, 312–324. [[CrossRef](#)]
176. De Souza-Pinto, N.C.; Wilson, D.M.; Stevnsner, T.V.; Bohr, V.A. Mitochondrial DNA, base excision repair and neurodegeneration. *DNA Repair (Amst)* **2008**, *7*, 1098–1109. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
177. Prasad, R.; Caglayan, M.; Dai, D.-P.; Nadalutti, C.A.; Zhao, M.-L.; Gressman, N.; Janoshazi, A.K.; Stefanick, D.; Horton, J.K.; Krasich, R.; et al. DNA polymerase  $\beta$ : A missing link of the base excision repair machinery in mammalian mitochondria. *DNA Repair (Amst)* **2017**, *60*, 77–88. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
178. Rudd, S.G.; Bianchi, J.; Doherty, A.J. PrimPol—A new polymerase on the block. *Mol. Cell. Oncol.* **2014**, *1*, 1–10. [[CrossRef](#)]
179. Singh, B.; Li, X.; Owens, K.M.; Vanniarajan, A.; Liang, P.; Singh, K.K. Human REV3 DNA polymerase zeta localizes to mitochondria and protects the mitochondrial genome. *PLoS ONE* **2015**, *10*, e0140409. [[CrossRef](#)]
180. Wisnovsky, S.; Sack, T.; Pagliarini, D.J.; Laposa, R.R.; Kelley, S.O. DNA Polymerase  $\theta$  Increases Mutational Rates in Mitochondrial DNA. *ACS Chem. Biol.* **2018**, *13*, 900–908. [[CrossRef](#)]
181. Bailey, L.J.; Bianchi, J.; Doherty, A.J. PrimPol is required for the maintenance of efficient nuclear and mitochondrial DNA replication in human cells. *Nucleic Acids Res.* **2019**, *47*, 4026–4038. [[CrossRef](#)]
182. Torregrosa-Muñumer, R.; Forslund, J.M.E.; Goffart, S.; Pfeiffer, A.; Stojković, G.; Carvalho, G.; Al-Furoukh, N.; Blanco, L.; Wanrooij, S.; Pohjoismäki, J.L.O. PrimPol is required for replication reinitiation after mtDNA damage. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2017**, *114*, 11398–11403. [[CrossRef](#)]
183. Sun, H.; Wang, X. *Mitochondrial DNA and Diseases*; Springer: New York, NY, USA, 2017; ISBN 9789811066733.
184. Akbari, M.; Keijzers, G.; Maynard, S.; Scheibye-Knudsen, M.; Desler, C.; Hickson, I.D.; Bohr, V.A. Overexpression of DNA ligase III in mitochondria protects cells against oxidative stress and improves mitochondrial DNA base excision repair. *DNA Repair (Amst)* **2014**, *16*, 44–53. [[CrossRef](#)]
185. Balakrishnan, L.; Bambara, R.A. Flap Endonuclease 1. *Annual Rev. Biochem.* **2013**, *82*, 119–138. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
186. Perina, D.; Mikoč, A.; Ahel, J.; Četković, H.; Žaja, R.; Ahel, I. Distribution of protein poly(ADP-ribosyl)ation systems across all domains of life. *DNA Repair (Amst)* **2014**, *23*, 4–16. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
187. Olsen, L.C.; Aasland, R.; Wittwer, C.U.; Krokan, H.E.; Helland, D.E. Molecular cloning of human uracil-DNA glycosylase, a highly conserved DNA repair enzyme. *EMBO J.* **1989**, *8*, 3121–3125. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

188. Grasso, S.; Tell, G. Base excision repair in Archaea: Back to the future in DNA repair. *DNA Repair (Amst)* **2014**, *21*, 148–157. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
189. Steele, H.E.; Horvath, R.; Lyon, J.J.; Chinnery, P.F. Monitoring clinical progression with mitochondrial disease biomarkers. *Brain* **2017**, *140*, 2530–2540. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
190. Craven, L.; Alston, C.L.; Taylor, R.W.; Turnbull, D.M. Recent Advances in Mitochondrial Disease. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* **2017**, *18*, 257–275. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
191. McKusick, V.A. # 515000 CHLORAMPHENICOL TOXICITY Dostępne na. Available online: <https://omim.org/entry/515000> (accessed on 16 June 2019).
192. Akbari, M.; Morevati, M.; Croteau, D.; Bohr, V.A. The role of DNA base excision repair in brain homeostasis and disease. *DNA Repair (Amst)* **2015**, *32*, 172–179. [[CrossRef](#)]
193. Leandro, G.S.; Sykora, P.; Bohr, V.A. The impact of base excision DNA repair in age-related neurodegenerative diseases. *Mutat. Res. Fundam. Mol. Mech. Mutagenes.* **2015**, *776*, 31–39. [[CrossRef](#)]
194. Sykora, P.; Croteau, D.L.; Bohr, V.A.; Wilson, D.M. Aprataxin localizes to mitochondria and preserves mitochondrial function. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2011**, *108*, 7437–7442. [[CrossRef](#)]
195. Croteau, D.L.; Fang, E.F.; Nilsen, H.; Bohr, V.A. NAD<sup>+</sup> in DNA repair and mitochondrial maintenance. *Cell Cycle* **2017**, *16*, 491–492. [[CrossRef](#)]
196. Jackson, S.P.; Bartek, J. The DNA-damage response in human biology and disease. *Nature* **2010**, *461*, 1071–1078. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
197. Fakouri, N.B.; Hou, Y.; Demarest, T.G.; Christiansen, L.S.; Okur, M.N.; Mohanty, J.G.; Croteau, D.L.; Bohr, V.A. Toward understanding genomic instability, mitochondrial dysfunction and aging. *FEBS J.* **2019**, *286*, 1058–1073. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
198. Son, J.M.; Lee, C. Mitochondria: Multifaceted regulators of aging. *BMB Rep.* **2019**, *52*, 13–23. [[CrossRef](#)]
199. Reznik, E.; Miller, M.L.; Şenbabaoglu, Y.; Riaz, N.; Sarungbam, J.; Tickoo, S.K.; Al-Ahmadie, H.A.; Lee, W.; Seshan, V.E.; Hakimi, A.A.; et al. Mitochondrial DNA copy number variation across human cancers. *Elife* **2016**, *5*, 1–20. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
200. Chen, J.; Zhang, L.; Yu, X.; Zhou, H.; Luo, Y.; Wang, W.; Wang, L. Clinical application of plasma mitochondrial DNA content in patients with lung cancer. *Oncol. Lett.* **2018**, *16*, 7074–7081. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
201. Lee, H.C.; Li, S.H.; Lin, J.C.; Wu, C.C.; Yeh, D.C.; Wei, Y.H. Somatic mutations in the D-loop and decrease in the copy number of mitochondrial DNA in human hepatocellular carcinoma. *Mutat. Res. Fundam. Mol. Mech. Mutagenes.* **2004**, *547*, 71–78. [[CrossRef](#)]
202. Shoshan, M. On mitochondrial metabolism in tumor biology. *Curr. Opin. Oncol.* **2017**, *29*, 48–54. [[CrossRef](#)]
203. Elfawy, H.A.; Das, B. Crosstalk between mitochondrial dysfunction, oxidative stress, and age related neurodegenerative disease: Etiologies and therapeutic strategies. *Life Sci.* **2019**, *218*, 165–184. [[CrossRef](#)]
204. Greenberg, E.F.; Vatolin, S. Symbiotic Origin of Aging. *Rejuvenation Res.* **2018**, *21*, 225–231. [[CrossRef](#)]
205. Picard, M.; McEwen, B.S. Psychological Stress and Mitochondria: A Systematic Review. *Psychosom. Med.* **2018**, *80*, 141–153. [[CrossRef](#)]



© 2020 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

13.2. Publikacja II

**Boguszevska K.**, Karwowski B.T., Kaźmierczak-Barańska J.,

*The Usefulness of Autoradiography for DNA Repair Proteins Activity Detection in the Cytoplasm towards Radiolabeled Oligonucleotides Containing 5',8-Cyclo-2'-deoxyadenosine [w:] Chemosensors, 2022, 10 (6), 204,*

doi: 10.3390/chemosensors10060204

**IF<sub>2022</sub>=4,229, MEiN<sub>2022</sub>=20 pkt**

Article

# The Usefulness of Autoradiography for DNA Repair Proteins Activity Detection in the Cytoplasm towards Radiolabeled Oligonucleotides Containing 5',8-Cyclo-2'-deoxyadenosine

Karolina Boguszewska , Bolesław T. Karwowski \*  and Julia Kaźmierczak-Barańska 

DNA Damage Laboratory, Food Science Department, Faculty of Pharmacy, Medical University of Lodz, Ul. Muszynskiego 1, 90-151 Lodz, Poland; karolina.boguszewska@umed.lodz.pl (K.B.); julia.kazmierczak-baranska@umed.lodz.pl (J.K.-B.)

\* Correspondence: boleslaw.karwowski@umed.lodz.pl; Tel.: +48-42-677-91-36



**Citation:** Boguszewska, K.; Karwowski, B.T.; Kaźmierczak-Barańska, J. The Usefulness of Autoradiography for DNA Repair Proteins Activity Detection in the Cytoplasm towards Radiolabeled Oligonucleotides Containing 5',8-Cyclo-2'-deoxyadenosine. *Chemosensors* **2022**, *10*, 204. <https://doi.org/10.3390/chemosensors10060204>

Academic Editors: Chaoxing Liu, Michela Alessandra Denti and Hyun Gyu Park

Received: 14 April 2022

Accepted: 26 May 2022

Published: 28 May 2022

**Publisher's Note:** MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



**Copyright:** © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

**Abstract:** Autoradiography of  $^{32}\text{P}$ -radiolabeled oligonucleotides is one of the most precise detection methods of DNA repair processes. In this study, autoradiography allowed assessing the activity of proteins in the cytoplasm involved in DNA repair. The cytoplasm is the site of protein biosynthesis but is also a target cellular compartment of synthetic therapeutic oligonucleotide (STO) delivery. The DNA-based drugs may be impaired by radiation-induced lesions, such as clustered DNA lesions (CDL) and/or 5',8-cyclo-2'-deoxypurines (cdPu). CDL and cdPu may appear in the sequence of STO after irradiation and subsequently impair DNA repair, as shown in previous studies. Hence, the interesting questions are (1) is it safe to combine STO treatment with radiotherapy; (2) are repair proteins active in the cytoplasm; and (3) is their activity different in the cytoplasm than in the nucleus? This unique study examined whether the proteins involved in the DNA repair are affected by the CDL while they are still present in the cytoplasm of xrs5, BJ, and XPC cells. Double-stranded oligonucleotides with bi-stranded CDL were used (containing AP site in one strand and a (5'S) or (5'R) 5',8-cyclo-2'-deoxyadenosine (cdA) in the other strand located 1 or 4 bp in both directions). The results have shown that the proteins involved in the repair were active in the cytoplasm, but less than in the nucleus. The general trends aligned for cytoplasm and nucleus—lesions located in the 5'-end direction inhibited the course of DNA repair. The combination of STO with radiotherapy should be applied carefully, as unrepaired lesions within STO may impair their therapeutic efficiency.

**Keywords:** 5',8-cyclo-2'-deoxyadenosine (cdA); 5',8-cyclo-2'-deoxypurine (cdPu); nucleic acids; DNA repair; DNA damage; clustered DNA lesions; cytoplasm; therapeutic oligonucleotides; gene therapy; autoradiography

## 1. Introduction

Autoradiography of  $^{32}\text{P}$ -radiolabeled material is one of the most precise detection methods of DNA repair processes. The technique has been known for over 70 years in the context of biological applications, such as single-cell analysis [1]. Although it requires specially trained personnel, specialized instruments, and meeting special requirements (which comprise the major limitations of the technique), it remains a low-cost, simple, and highly sensitive detection technique. Thanks to its efficiency, it is commonly used in nucleic acid studies [2–10]. In this study, the autoradiography of  $^{32}\text{P}$ -radiolabeled oligonucleotides allowed the detection of changes within oligonucleotides after treatment with cytoplasmic extracts (CE). Samples were radiolabeled (Figure 1A), treated with CE (Figure 1B), and subsequently separated by polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE). The results were visualized on the autoradiography film (Figure 1C). Ionizing radiation (IR) emitted during the decay of  $^{32}\text{P}$  isotope (here, located on the 5'-end of double-stranded oligonucleotides) interacts with the silver halide grains of the emulsion on the autoradiography film. The visible image with blackened spots is obtained after photographic development [11]. The



spatial distribution and the amount of the radioactivity corresponding to each reaction product were assessed by densitometric analysis (Figure 1C) [12]. This way, the quantitative changes of  $^{32}\text{P}$ -5'-end-labeled oligonucleotides after reactions with CE have been detected. Subsequently, the activity of proteins involved in the DNA repair was evaluated based on the quantity of each reaction product (Figure 1C).

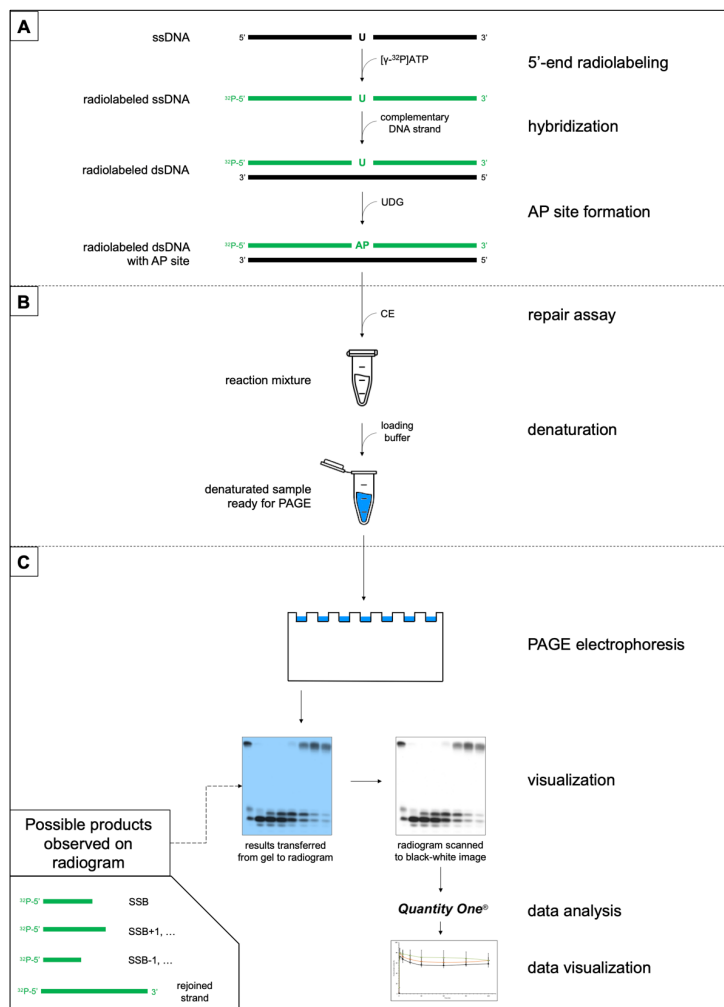
IR is one of the most dangerous factors acting upon the DNA molecule. As the base of radiotherapy, it induces complex DNA damage that leads to the death of cancer cells (including clusters containing double-strand breaks (DSB) and non-DSB lesions) [13]. The dose of 4 Gy (considered lethal to humans) generates approximately 5000 base lesions, 5000 single-strand breaks (SSB), 600 cross-links, or 160 DSB per cell per day [14]. The IR may lead, among others, to the 5',8-cyclo-2'-deoxypurines (cdPus) formation. CdPus, represented in this article by a 5',8-cyclo-2'-deoxyadenosine (cdA), are bulky structures (Figure 2A) assigned to the group of tandem lesions [15].

CdPus result from the formation of the covalent bond between C5' and C8. This extra bond stiffens the lesion structure. Subsequently, the rigidity of the neighboring part of the DNA increases, leading to distortion of the double-stranded DNA helix [16]. CdA may appear within clusters with non-DSB lesions resulting from IR action [17]. CdA occurs in two diastereomeric forms—5'S and 5'R (Figure 2A), which show different biological impacts, as previously described [10,18–24]. The levels of cdA are estimated as 0.01 (5'R isomer) and 0.1 (5'S isomer) per every  $10^6$  DNA nucleosides [25].

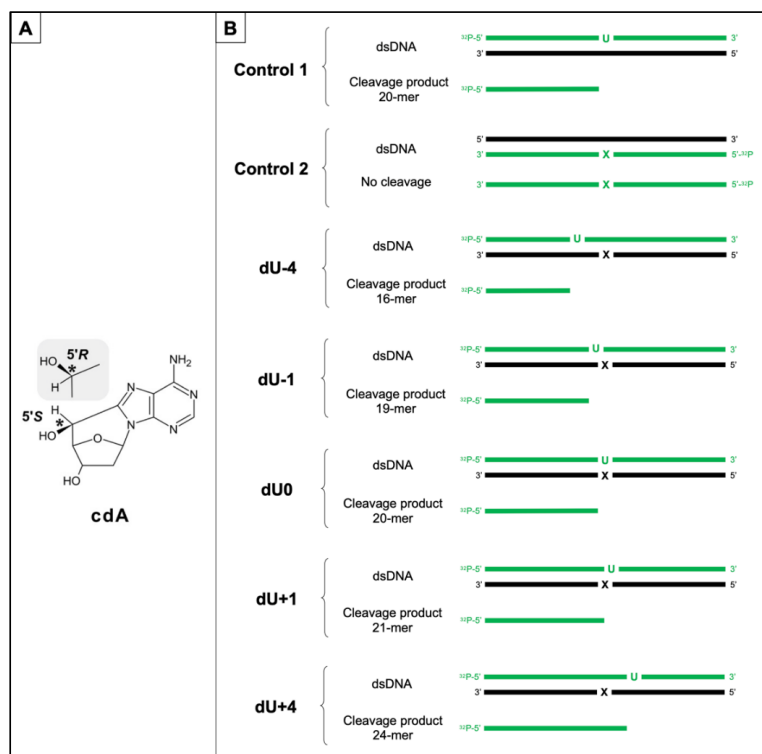
Moreover, cdPus being part of the clustered DNA lesions (CDL, two or more lesions within 1-2 DNA helical turns) impacts the helix structure and subsequently may impair the repair of accompanying lesions [8,10,16,19,26]. The higher the number of individual lesions accumulated on a small fragment of DNA, the more difficult the DNA repair. Such DNA damage accumulation may lead to mutagenesis, subsequent cell death, or pathological states such as carcinogenesis [27]. To prevent it, DNA repair systems coordinate lesion recognition and removal followed by “rebuilding” DNA fragments to regain the correctness of the genetic information [8,10,18]. The DNA repair proteins are synthesized in the cytoplasm and, under certain conditions, are translocated into the nucleus to repair the DNA in the case of lesion occurrence. The individual non-DSB lesions present within the CDL are usually recognized and removed by base excision repair (BER) or the more complicated nucleotide excision repair (NER) in a certain order to avoid the formation of DSB. For example, AP sites are usually cleaved before base damage when located 5 bp from each other, and the resulting SSB is repaired first [28]. Furthermore, studies have shown that the presence of cdA impacts the action of repair proteins and/or the DNA repair efficiency of the second lesion within the cluster [7,8,10,19,29–33].

CdPus, represented in this study by the cdA, are usually removed from the genome by the NER system (with low efficiency) because no specific glycosylases are known (capable of removing a single lesion via BER) [34]. The “problem” with cdA removal occurs when NER machinery is defective/inactive [21,35–37]. In *Xeroderma Pigmentosum* (XP) patients, the defect in the NER system may lead to DNA damage accumulation (mainly lesions caused by IR), subsequent mutations, cells malfunctioning, and enhanced carcinogenesis [36,38]. New therapeutic approaches to increase radiotherapy efficacy are still needed [13,39]. New-generation drugs are represented by synthetic therapeutic oligonucleotides (STO) such as antisense oligonucleotides (ASO), AsiDNA (Poly(ADP-Ribose) Polymerase (PARP) inhibitor), mRNA, or siRNA, which are designed to play a role in regulating the expression of genes, e.g., related to radioresistance [39–44]. The STO delivery to their biological targets (nuclear or cytoplasmic compartments containing DNA and mRNA, respectively) faces many challenges [42,45]. However, when successfully introduced to the cell, all STO are present in the cytoplasm at some point during their trafficking. All molecules present in the cytoplasm are susceptible to the damaging action of IR. It may subsequently lead to dysfunctions in proteins' biosynthesis and further impact the biological pathways (e.g., DNA repair in the nucleus and/or mitochondria, the action of therapeutics such as

STO) [46,47]. Therefore, it is worth investigating if damaged STO (e.g., by radiation) have a chance to be repaired and act according to its therapeutic purpose.



**Figure 1.** The schematic representation of an experimental procedure used in this study. (A) The substrate oligonucleotides' preparation (see Section 2.1). U represents the position of a 2'-deoxyuridine (dU), which served as a precursor of an apurinic/aprimidinic site (AP site); AP represents the position of an AP site within the strand that was obtained from dU after treatment with uracil DNA-glycosylase (UDG); green color represents a radiolabeled strand of ds-oligonucleotide (40 bp). (B) The repair assay experiment (see Section 2.4). Reactions were conducted in 37 °C for 0, 1, 5, 15, 30, 60, 90, and 120 min. The 50 µg of cytoplasmic extracts (CE) was used (see Section 2.3). (C) The visualization of obtained results by PAGE, autoradiography, and data analysis. SSB—single-strand break, reaction product obtained after AP site cleavage resulting from the endonucleolytic activity of CE; SSB+1, ... —reaction products obtained after adding 1 or more nucleotides to the cleaved strand resulting from polymerase activity of CE; SSB−1, ... —reaction products obtained after removal of 1 or more nucleotides from the cleaved strand resulting from the exonucleolytic activity of CE; and rejoined strand—reaction products obtained after reaching full repair of DNA strand.



**Figure 2.** (A) The chemical structure of 5',8-cyclo-2'-deoxyadenosine (cdA) with its 5'S and 5'R diastereomers. (B) The list of investigated double-stranded oligonucleotides. U—the position of an AP site within the strand which was obtained from 2'-deoxyuridine (dU) after treatment with uracil DNA-glycosylase (UDG); X—the position of the cdA within the strand;  $^{32}\text{P}$  marks the 5'-end of the strand radiolabeled with  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ ; green color—a radiolabeled strand of ds-oligonucleotides (40 bp) and corresponding cleavage product (observed on autoradiograms); its length depends on the AP site location); negative numbers—ds-oligonucleotides with clustered DNA lesions placed on two strands where AP site is located 1–4 bp in 3'-end direction; positive numbers—ds-oligonucleotides with clustered DNA lesions placed on two strands where AP site is located 1–4 bp in 5'-end direction.

This study mainly considered the safety of combining radiation treatment with therapeutic oligonucleotides applied as a part of gene/anticancer therapy. If the proteins involved in processing/repair of clustered, complex DNA lesions were to be determined as not active in the cytoplasm, the use of STO before cancer cells' irradiation should be carefully considered in the context of other therapeutic schemes. In this scenario, irradiation might damage the STO sequence, which when left unrepaired could give adverse therapeutic effects. This issue has been investigated by (1) testing whether the proteins involved in DNA damage processing/repair were already active in the cytoplasm and (2) assessing the difference between protein activities involved in the DNA damage processing in the cytoplasm and the nucleus. The article describes the complex case of CDL (containing cdA and an AP site), which may be formed as a result of irradiation [26,29,48–50]. This study showed how (5'S) and (5'R) 5',8-cyclo-2'-deoxyadenosine affect the repair of clustered DNA damage in the cytoplasm of three cell lines (xrs5, BJ, and XPC). The set of double-stranded 40-mer oligonucleotides containing cdA in one strand and an AP site in the complementary strand at different positions (Figure 2B) was used as an experimental model, and autoradiography was used as a detection technique (Figure 1).

The efficiency of proteins involved in nuclear and mitochondrial DNA repair processes of CDL containing cdPu has been widely studied [6–10,19,30,32,51–55]. Nonetheless, the activity of these proteins was not yet assessed in the cytoplasm. As new therapies arise, specially designed to combine with radiation (such as STO), a detailed understanding of the nature, mechanisms, and implications of the cdA and CDL is especially important.

## 2. Materials and Methods

### 2.1. Substrate Oligonucleotides-Containing AP Site

The substrate single-stranded oligonucleotides were synthesized as previously described [56]. The sequences of dsDNA containing cdA in one strand and an AP site in the opposite strand (distanced up to 4 bp in both directions) are presented in Figure 2B and Table S1. Positive numbers (+) were used for dU located in the 5'-end direction and negative numbers (–) were used for dU located in the 3'-end direction from cdA. Substrate oligos were stable in the experimental conditions, as shown previously [8,19]. Moreover, ds-oligos with cdA in their sequence (Control 2) were treated with CE to confirm no additional interactions (Figure S1). Mass spectra of oligonucleotides are presented in Supplementary Materials (Figure S2, Table S2).

The substrate ds-oligonucleotides containing AP sites were prepared as described previously [6–8,10,19,30]. Briefly, ss-oligos were 5'-<sup>32</sup>P-end-labeled using 2 μCi [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]ATP (3000 Ci/mmol, 10 mCi/mL, Hartmann Analytic GmbH, Braunschweig, Germany), hybridized with 1.5-fold excess of the complementary strand and treated with 5U of UDG (New England BioLabs, Ipswich, MA, USA). To confirm AP site formation, samples were treated with 5U human apurinic/aprimidinic endonuclease (hAPE1) (New England BioLabs Ipswich, MA, USA). Each step of the process was verified on 15% native or denaturing polyacrylamide gel (Figure S3). The experimental procedure is shown in Figure 1A.

### 2.2. Cell Cultures

Three cell lines were investigated: xrs5 (X-ray sensitive Chinese hamster ovarian mutant cell line; used as an established model for in vitro studies on CDL repair), BJ (normal human fibroblasts; used as a reference cell line with unimpaired repair systems), and XPC (fibroblasts obtained from *Xeroderma Pigmentosum* patient complementation group C; used as a model of NER-deficient cells). The xrs5 cell line (CRL-2348, ATCC, VA, USA) was cultured in MEM Alpha (Corning Inc., Corning, NY, USA) supplemented with 10% FBS (Biowest, MO, USA), the BJ cell line (CRL-2522, ATCC, Manassas, VA, USA) was cultured in MEM with Earle's salts and non-essential amino acids supplemented (Gibco, Shanghai, China) with 10% FBS (Biowest LLC, Riverside, MO, USA), and the XPC cell line (GM17420 skin fibroblasts, purchased from the Coriell Institute for Medical Research (Camden, NJ, USA)) was cultured in MEM with Earle's salts and non-essential amino acids (Gibco) and supplemented with 15% FBS (Biowest LLC, Riverside, MO, USA).

### 2.3. Preparation of Cytoplasmic Extracts

Cells were harvested in the exponential phase, and the CE was obtained using a NEPER™ Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagents kit (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA) according to the manufacturer's instructions. The protein concentration in CE aliquots was tested using colorimetric Pierce™ 660 nm Protein Assay (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA) and found between 7.4 and 17.3 mg/mL (xrs5), 7.8 and 21.7 mg/mL (BJ), and 7.4 and 13.6 mg/mL (XPC). Aliquots were stored no longer than 6 months at –80 °C.

### 2.4. Repair Assays

The substrate ds-oligos (200 CPS) were incubated with 50 μg of CE in the repair buffer (70 mM Tris-HCl (pH 7.5), 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM DTT, 4 mM ATP, 40 mM P<sub>Cr</sub>, 1.6 μg/mL CK (EC 2.7.3.2), and 0.1 mM of each: dATP, dCTP, dGTP, and dTTP) for 0, 1, 5, 15, 30, 60, 90, and 120 min at 37 °C (Figure 1B). After the required time, a denaturing loading

buffer was added, and samples were examined on a 15% denaturing polyacrylamide gel. Results were visualized by autoradiography (Figure 1C). For consistency, experiments were performed three times. Quantity One software (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) was used for data quantification: the processing of AP sites in time was observed on radiograms and expressed as the % of individual bands' intensity (compared to the total intensity of bands for each lane), as described previously [8].

### 3. Results

The study examined the changes in the activity of proteins involved in DNA damage processing/repair in the cytoplasm of three cell lines (xrs5, BJ, and XPC). The influence of the distance between lesions (cdA and AP site) within CDL was assessed. Moreover, stereoisomers of cdA and their different impacts on protein activity toward the AP site were evaluated.

The synthetic ds-oligonucleotides with AP sites in various positions in one strand and cdA in an opposite strand (ScdA and RcdA) were used as an experimental model (Figure 2, Table S1). Each step of the substrates' preparation was verified: 5'-<sup>32</sup>P-end-labeling of ss-oligos and hybridization (Figure S3), formation of AP sites (derived from dU after UDG digestion), and subsequent formation of SSBs (derived from AP sites after hAPE1 digestion) (Figure S3). The substrate ds-oligos containing cdA were stable during treatment with cellular extracts and pure glycosylases, as shown previously [7,8,10,18,30]. An additional test was performed to determine the influence of CE; the stability of substrate oligos in experimental conditions was confirmed up to 120 min (Figure S1).

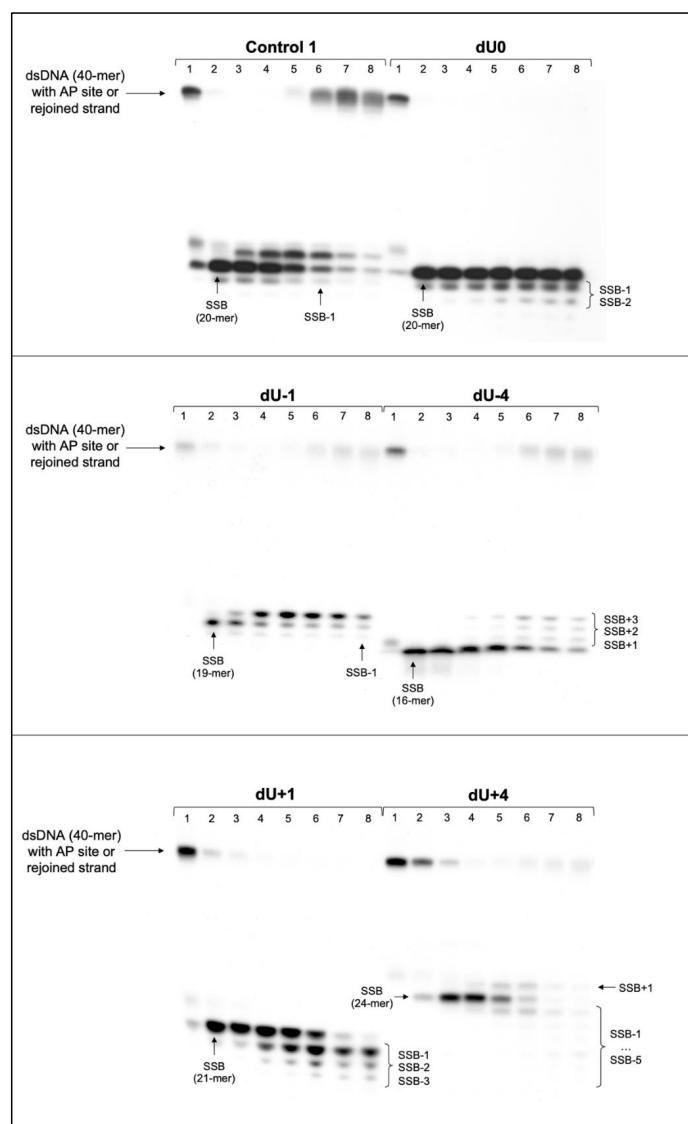
The activity of CE (containing proteins involved in DNA damage processing and repair mechanisms) was verified. The enzymes' activities towards ds-oligonucleotide containing a single AP site (Control 1, Figure 2, Table S1) are presented in Table 1 (endonuclease activity (strand incision, i.e., formation of SSB), polymerase activity (strand elongation, i.e., SSB+1, SSB+2, etc.), and exonuclease activity (strand degradation, i.e., SSB-1, SSB-2, etc.)). The presented values served as a reference activity of CE for further experiments.

**Table 1.** The enzymatic activities of cytoplasmic extracts for Control 1 oligonucleotide (containing a single AP site). Raw numerical data are presented in Supplementary Materials in Tables S3–S5.

	xrs5 [%]	BJ [%]	XPC [%]
Endonucleolytic activity (1 min)	71.0	78.73	64.01
Polymerase activity (30 min)	39.19	31.98	35.82
Exonucleolytic activity (120 min)	2.38	4.69	8.89

Double-stranded DNA (40 bp, Figure 2, Table S1) containing a single cdA lesion in one DNA strand and a single AP site in the opposite DNA strand located up to four nucleobases in both 3'-end and 5'-end directions was incubated with CE (50 µg). The relative positions of lesions were chosen for this study as the most problematic ones based on the previous data [5,7,8,10,30]. This work has focused on the observation of the AP site processing (as a lesion accompanying cdA within CDL). The exemplary autoradiogram is shown in Figure 3.

The evaluation included AP site incision efficiency (endonucleolytic activity), subsequent DNA synthesis (polymerase activity), and strand degradation (exonucleolytic activity) by cytoplasmic proteins involved in DNA damage processing/repair and their comparison between cytoplasmic and nuclear extracts of three cell lines: xrs5, BJ, and XPC (numerical data, graphs with SD, and autoradiograms of individual repeats of each experiment are presented in Supplementary Materials).



**Figure 3.** The exemplary autoradiogram of denaturing PAGE (cytoplasmic extract of *xrs5* cells). The following protein activities can be observed: the endonucleolytic activity (bands denoted as SSB; dsDNA with single-strand break formed after strand incision by endonucleases), the polymerase activity (bands denoted as SSB+1, SSB+2, etc.; dsDNA with a single-strand break after incorporation of 1 or more undamaged nucleotides by polymerases), and exonucleolytic activity (SSB−1, SSB−2, etc.; dsDNA with a single-strand break after removal of 1 or more nucleotides by exonucleases). In some cases, strand rejoining is also observed, but it is not the focus of this article. Each lane corresponds to a different assay time: lane 1—0 min; lane 2—1 min; lane 3—5 min; lane 4—15 min; lane 5—30 min; lane 6—60 min; lane 7—90 min; and lane 8—120 min. Each experiment was performed three times for results consistency (individual replications, numerical data, and graphical representation of results with SD are available in Supplementary Materials).

### 3.1. The DNA Strand Incision—Endonucleolytic Activity of Cytoplasmic Extracts

The incision rate at which dsDNA with an AP site in one strand and cdA in the complementary strand was examined. Endonucleases present in CE produce SSB (observed as bands corresponding to 16-mer for −4 position up to 24-mer for +4 position) (Figures 2, 3 and S4–S9).

SSBs were formed for all investigated substrates in all three cell lines after 1 min of incubation with CE (at a minimum rate of ~53%), showing that proteins with endonucleolytic function are active and quite efficient in all tested CE. Exceptions were noted for xrs5 ScdA/dU+4 and RcdA/dU+4, in the cases of which it took 5 min to reach 65.8% and 51.01%, respectively (Tables S6 and S7); also, RcdA/dU+4 in XPC cells increased from 38.54% after 1 min to 86.58% after 5 min (Table S11). Rates for Control 1 ranged from ~64% (XPC) to ~79% (BJ). Incision yields differed depending on the lesion distribution and were increasing in the order presented in Table 2.

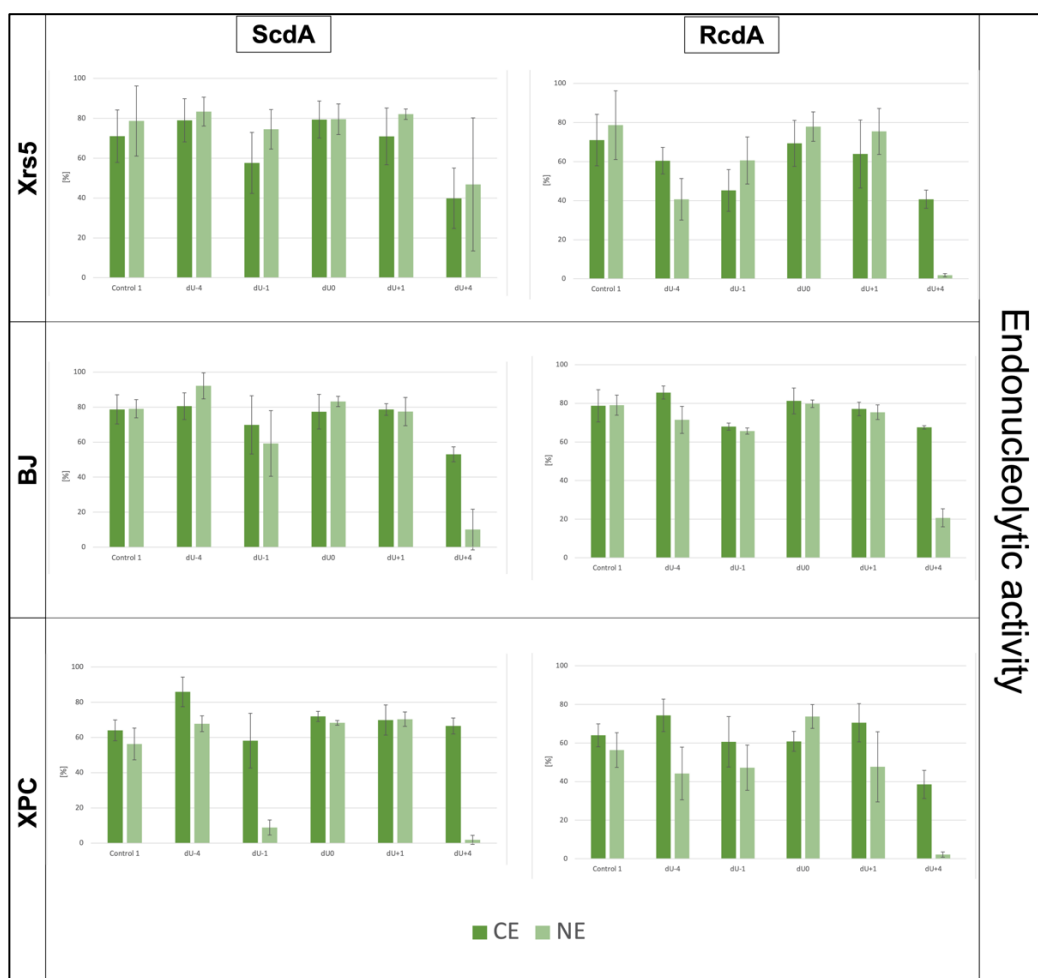
**Table 2.** The general trends of endonucleolytic activity observed after 1 min of reaction time for oligonucleotides containing ds-CDL (shown in Figure 2 and Table S1) treated with cytoplasmic extracts (CE) obtained from three cell lines (raw numerical data is presented in Supplementary Materials in Tables S6–S11) and with nuclear extracts (NE) obtained from three cell lines in previous studies [8,32]. Frames indicate substrates with incision efficiency higher than for corresponding Control 1 (Table 1 and [8,30]).

Strand Incision	xrs5	BJ	XPC
CE	+4 < −1 < +1 < −4 < 0 (ScdA)	+4 < −1 < 0 < +1 < −4 (ScdA)	−1 < +4 < +1 < 0 < −4 (ScdA)
	+4 < −1 < −4 < +1 < 0 (RcdA)	+4 ~ −1 < +1 < 0 < −4 (RcdA)	+4 < −1 ~ 0 < +1 < −4 (RcdA)
NE	+4 < −1 < 0 < +1 < −4 (ScdA)	+4 < −1 < +1 < 0 < −4 (ScdA)	+4 < −1 < −4 < 0 < +1 (ScdA)
	+4 < −4 < −1 < +1 < 0 (RcdA)	+4 < −1 < −4 < +1 < 0 (RcdA)	+4 < −1 < −4 < +1 < 0 (RcdA)

The lowest endonucleolytic activity was observed for dU+4 in the case of all three cell lines for both diastereomers, which corresponded with the activity noted in previous studies concerning NE (Table 2, Figure 4) [8,30]. In the cytoplasm, the lowest enzymatic efficiency for dU+4 ranged from 39.87% for ScdA in xrs5 to 67.57% for RcdA in BJ (Tables S6–S11).

As described previously, RcdA inhibited endonucleolytic activity in NE more than ScdA [8,30]. This phenomenon seems to align with endonucleolytic activity in CE only for xrs5 and, to some extent, for XPC. Xrs5 cells showed approximately 7–19% lower rates for oligos with RcdA than ScdA (Tables S6 and S7, Figure 4). At the same time, the XPC showed an incision efficiency 11–28% lower for RcdA in the cases of dU0, dU−4, and dU+4, while for dU+1 and dU−1, levels were comparable between isomers (ScdA/dU−1: 58.17%, RcdA/dU−1: 60.64%, ScdA/dU+1: 69.91%, and RcdA/dU+1: 70.52%) (Tables S10 and S11). Interestingly, BJ cells presented the opposite trend. RcdA did not inhibit strand incision but enhanced it by approximately 2–14% (except for dU+1, which showed similar levels of ~77–78% for 5'S and 5'R) (Tables S8 and S9).

Moreover, only some substrates have shown efficiency rates higher than their corresponding Control 1 level (Tables 1 and 2, Figure 4); for xrs5: ScdA/dU0, RcdA/dU0, and ScdA/dU−4 with a maximum of 79.41%, for BJ: ScdA/dU−4, RcdA/dU−4, and RcdA/dU0 with a maximum of 85.61%; and for XPC: ScdA/dU0, ScdA/dU−4, RcdA/dU−4, ScdA/dU+1, RcdA/dU+1, and ScdA/dU+4 with a maximum of 85.89% (Tables S6–S11).

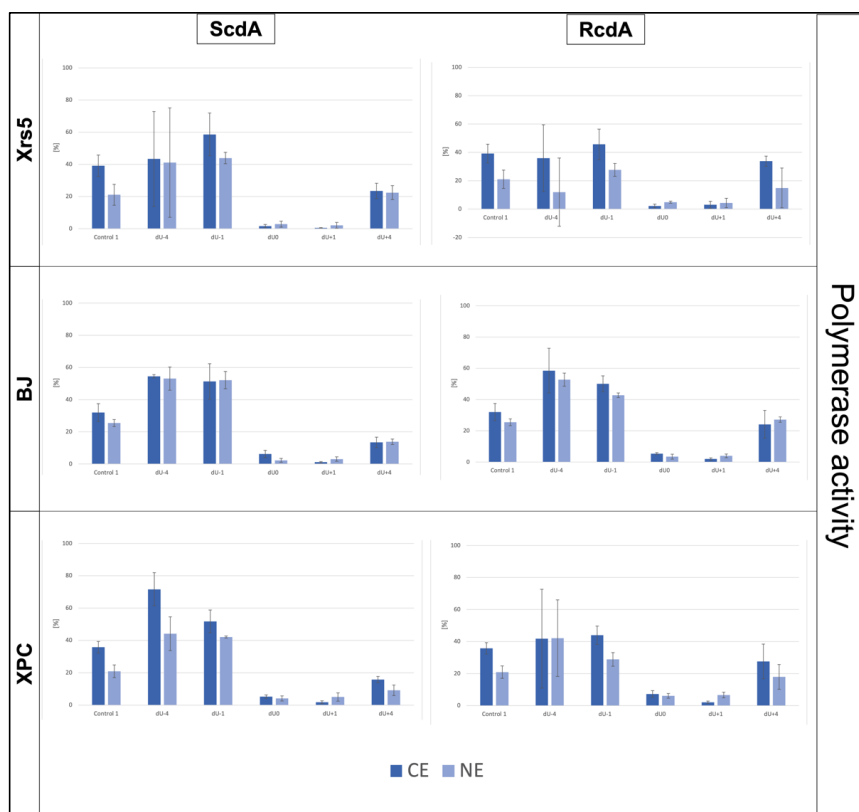


**Figure 4.** The endonucleolytic activity (observed after 1 min of reaction time) for oligonucleotides containing ds-CDL (shown in Figure 2 and Table S1) treated with cytoplasmic extracts (CE) obtained from three cell lines—xrs5, BJ, and XPC (raw numerical data is presented in Supplementary Materials in Tables S6–S11) and with nuclear extracts (NE) obtained from the same cell lines in previous studies [8,30].

### 3.2. The DNA Strand Elongation—Polymerase Activity of Cytoplasmic Extracts

The polymerase activity of CE towards oligonucleotides with CDL has also been considered. In all investigated cases, for lesions denoted as dU0 and dU+1, no incorporation of new nucleotides (no SSB+1 bands) was observed, which is consistent with previous studies [7,8,19,30]. Interestingly, the efficiency of DNA strand elongation after 30 min was the lowest (all cell lines, both diastereomers) for dU+4 (13–33%) (Figure 5, Figures S4–S9, S12 and S13, and Tables S6–S11). It was lower than for Control 1 (32–39%) (Table 1). The polymerase activities for the other oligos differed depending on the examined cell line and diastereomeric form of cda, which is shown in Table 3.





**Figure 5.** The polymerase activity (observed after 30 min of reaction time) for oligonucleotides containing ds-CDL (shown in Figure 2 and Table S1) treated with cytoplasmic extracts (CE) obtained from three cell lines—xrs5, BJ, and XPC (raw numerical data is presented in Supplementary Materials in Tables S6–S11) and with nuclear extracts (NE) obtained from the same cell lines in previous studies [8,30].

**Table 3.** The general trends of polymerase activity observed after 30 min of reaction time for oligonucleotides containing ds-CDL (shown in Figure 2 and Table S1) treated with cytoplasmic extracts (CE) obtained from three cell lines (raw numerical data is presented in Supplementary Materials in Tables S6–S11) and with nuclear extracts (NE) obtained from three cell lines in previous studies [8,32]. Frames indicate substrates with elongation efficiency higher than for corresponding Control 1 (Table 1 and [8,30]).

Strand Elongation	xrs5	BJ	XPC
CE	+4 < -4 < -1 (ScdA)	+4 < -1 < -4 (ScdA)	+4 < -1 < -4 (ScdA)
	+4 < -4 < -1 (RcdA)	+4 < -1 < -4 (RcdA)	+4 < -4 < -1 (RcdA)
NE	+4 < -4 < -1 (ScdA)		+4 < -1 < -4 (ScdA)
	-4 < +4 < -1 (RcdA)		+4 < -1 < -4 (RcdA)

The highest activities of polymerases in CE were noted for ScdA/dU-1 (58.63%) and RcdA/dU-1 (45.68%) in xrs5, ScdA/dU-4 (54.53%) and RcdA/dU-4 (58.47%) in BJ, and ScdA/dU-4 (71.65%) and RcdA/dU-1 (44.0%) in XPC (Figure 5, Tables S6–S11). Interestingly, CE presented a common point with previously studied NE. New 2'-deoxynucleotide units (dNUs) were incorporated the most efficiently for 5'S and 5'R dU-1 in xrs5, for 5'S

and 5′R dU−4 in BJ, and for 5′S and 5′R dU−4 in XPC (except for RcdA in CE, where dU−1 showed the highest polymerase activity) (Table 3).

Furthermore, in the NE of xrs5 cells, polymerase activity was 8–20% lower for RcdA than for ScdA, which agreed with the results obtained for the cytoplasm of xrs5: for RcdA/dU−4 and RcdA/dU−1 enzymes were 9% and 13% less active than for 5′S, respectively [8]. On the contrary, RcdA/dU+4 showed an approximately 10% higher yield than a corresponding oligo with a 5′S isomer (Tables S6 and S7). Experiments involving BJ cells showed different trends in polymerase activity between diastereomers: ScdA/dU+4 was approximately 11% lower than RcdA/dU+4, and ScdA/dU−4 was approximately 4% lower than RcdA/dU−4. Oligo denoted as dU−1 showed a similar yield of strand elongation after 30 min for both isomers (~50–51%) (Tables S8 and S9). Polymerases present in the cytoplasm of the XPC cell line showed the same trends of enzymatic activity as xrs5. Namely, in the case of dU−4 and dU−1, polymerases were 30% and 8% less efficient for RcdA than ScdA, respectively. Moreover, ScdA/dU+4 was elongated with approximately a 12% lower yield than RcdA/dU+4 (Tables S10–S11).

Importantly, the incorporation of more than one dNU was observed for both 5′S and 5′R isomers; 4 dNUs were added to the DNA strand in positions dU−4 and dU+4 (Figures S4–S9) in all three cell lines. This fact indicates that the LP-BER mechanism may have been involved in these lesion processing in the cytoplasm [55]. It was not observed in past studies for NE or ME obtained from xrs5, nor for NE obtained from BJ and XPC cells [7,8,30]. Interestingly, the polymerase activity of the proteins in CE was similar to or even higher than in the NE (Figure 5), which should be further studied.

### 3.3. The DNA Strand Degradation—Exonucleolytic Activity of Cytoplasmic Extracts

As expected, exonucleolytic activity was observed in the cytoplasm of all cell lines. Speculations about the trace activity of exonucleases in NE were described in previous studies. These studies concerned the band’s intensity loss, which might have resulted from some cross-contamination with cytoplasmic proteins [8]. Here, the strand degradation was evident due to the presence of bands corresponding to SSB−1, SSB−2, etc., on the autoradiograms (Figure 3, Figures S4–S9). Strand degradation was observed for oligos denoted as dU0, dU−1, dU+1, and dU+4 (Figure 3, Figures S4–S9 and S14–S15). Some level of exonucleolytic activity was also noted for Control 1 (less than 10%; Table 1, Figures S4–S9, Tables S3–S5); nonetheless, it was much lower than for investigated oligos in CE from all three cell lines (Tables S6–S11). The efficiency of strand degradation increased in the following order (data compared for 120 min of reaction time) for 5′S and 5′R isomers of all three cell lines:  $-1 < 0 < +4 < +1$  (Tables S6–S11).

The strand degradation rate in the cytoplasm differed between oligos containing the 5′S and 5′R form of cdA. In xrs5, substrates with ScdA showed approximately 3% lower exonucleolytic activity than RcdA for dU+1 and dU+4 and approximately 7% lower for ScdA/dU−1 and ScdA/dU0 than for corresponding oligos with RcdA (Tables S6–S7). In the case of BJ cells, degradation rate was 4% and 6% lower for RcdA/dU0 and RcdA/dU+4 than for ScdA, respectively. Oligo denoted as dU−1 showed comparable, low degradation rates (~5%), while for dU+1, degradation was approximately 11% higher for 5′R than 5′S (Tables S8–S10). The CE from XPC cells presented exonucleolytic activity of the 5′R isomer higher than 5′S for dU0 (53.46% for RcdA/dU0 vs. 37.59% ScdA/dU0) and dU−1 (18.05% for RcdA/dU−1 vs. 9.38% ScdA/dU−1) and lower for dU+1 (88.76% for RcdA/dU+1 vs. 94.95% ScdA/dU+1) and dU+4 (61.05% for RcdA/dU+4 vs. 74.41% ScdA/dU+4) (Tables S10–S11).

What is more, the number of “cut off” dNUs differed depending on the relative position of cdA and a gap/SSB (formed after the AP site’s digestion). For xrs5, 2 dNUs were “cut off” in dU0, 1–3 dNUs in dU−1, 4–6 dNUs in dU+4, and 3 dNUs in dU+1 (Figures S4 and S5). For BJ, 2–4 dNUs were released from dU0, 2 or 3 dNUs from dU−1, 6–8 dNUs from dU+4, and 4 dNUs from dU+1 (Figures S6 and S7). For XPC, 3 or 4 dNUs were

removed from dU0, 1-3 dNUs from dU−1, 6 dNUs from dU+4, and 3-5 dNUs from dU+1 (Figures S8 and S9). Control 1 showed a loss of 1 or 2 dNUs in all tested CE (Figures S4–S9).

#### 4. Discussion

Every day, numerous DNA lesions are formed in the human genome because of endogenous (e.g., replication errors, nucleobase modifications, AP site formation) and exogenous (e.g., radiation, chemical agents, environmental stressors) factors [57]. Every hour, approximately  $3 \times 10^{17}$  lesions occur, including the daily formation of  $10^4$  mutagenic AP sites in each human cell [19,57]. The chemical structures of lesions are the same, irrespectively of their source (endogenous or exogenous). The most endogenously abundant lesions include SSB and AP sites (~600 cell/hour), 8-oxo-dG (~200 cell/hour), thymine glycol (~100 cell/hour) and cytidine deamination products, i.e., dU (192 cell/hour) [58,59]. The situation becomes different when external radiation or chemical factors are introduced (e.g., in the form of chemotherapeutics, radiotherapy, or multimodality treatment [60]). The formation of clustered DNA lesions (DSB and non-DSB) is a characteristic feature of IR's impact on the genetic material. Therefore, proper functioning and survival of the cell depend to a great extent on effective DNA damage processing and repair mechanisms.

The observations presented in this study may find their future application in the fast-growing field of oligonucleotide-based therapies [61–63]. Oligonucleotide-based therapeutics are susceptible to the damaging action of factors such as ROS and IR and may become ineffective after the development of complex lesions in their structures (for example, cdA located within a cluster). Hence, it is worth knowing the consequences of those lesions' occurrence and the mechanisms of their cellular processing. On the other hand, cdPus may be intentionally implemented as a part of oligonucleotide-based drugs/therapies (e.g., to inhibit proteins' action). Therefore, a detailed understanding of cdPus' impact on DNA, DNA damage processing, and DNA repair is highly demanded. Further investigation should take into consideration future therapeutical contexts such as gene therapy, antisense strategies, etc. [43,62].

In this study, for the first time, the cytoplasmic processing of dsDNA with CDL containing cdA has been shown. CdA has two diastereomeric forms (5'S and 5'R), which may have a different biological impact and occur in DNA in different amounts [10,18–24]. The lesion distribution and diastereomeric form of cdA affect the interaction of enzymes with the other lesion within the cluster (AP site used as a precursor of SSB). The general trends previously denoted for nuclear extracts align with those observed for cytoplasmic extracts derived from the xrs5, BJ, and XPC cell lines [8,30]. Xrs5 was used, as it is an established model for in vitro studies on CDL repair via the BER system; XPC was used as a human model of NER-deficient cells; and BJ was used as a human reference cell line with unimpaired DNA repair systems.

The endonucleases present in the cytoplasmic extracts of examined cell lines effectively incised the AP site in the DNA with bi-stranded CDL containing two lesions (cdA and AP site) located up to four bases in the 5'-end and 3'-end directions from cdA. Interestingly, the strand incision was inhibited for dsDNA with RcdA compared to ScdA for xrs5 and XPC, while in BJ the trend was reversed (Table 2, Figure 4). The overall incision efficiency was similar in the cytoplasmic and nuclear extracts (Table 2, Figure 4) [8,30].

Polymerases are one of the most important elements of complex repair systems in the cell. Nevertheless, the high-fidelity polymerases are not able to bypass the bulk structure of cdPus, which may result in replication blockage [18,64]. In this study of short oligonucleotides with bi-stranded CDL, for gaps located opposite to cdA (position dU0) and in position dU+1, no dNU incorporation was observed (Figures 3 and 4, Figures S4–S9). Hence, polymerases present in the cytoplasm were not able to bypass such clusters. This observation agreed with previous ones concerning nuclear and mitochondrial extracts [7,8,10,32]. The rate of new nucleotide incorporation was higher for dsDNA containing gaps located in the 3'-end direction from cdA (i.e., dU−1 and dU−4). Up to four dNUs have been inserted for oligonucleotides denoted as dU−4 and dU+4 with both isomers of cdA in all investi-

gated cell lines. It may indicate the predominant action of a long-patch repair mechanism, e.g., long-patch BER (LP-BER), during which a fragment of 2–12 nucleotides is excised and replaced with correct nucleobases [65]. Interestingly, in previous studies with nuclear extracts, LP-BER was also observed for *xrs5* and XPC cell lines [8,30]. However, it occurred randomly and only two dNUs were incorporated. It may indicate the presence of proteins in the cytoplasm that were not translocated to the nucleus, or it may point to a higher activity of proteins necessary for LP-BER in the cytoplasm, prior to their translocation to the nucleus. This issue would need further and detailed investigation to conclude.

The exonucleolytic activity towards ds-oligonucleotides containing bi-stranded CDL (i.e., cdA and a gap) located up to four bases in 5'-end and 3'-end directions was noted for all investigated CE. It confirms the presence of exonucleolytic proteins in the cytoplasm which are responsible, among others, for the degradation of foreign DNA, and therefore, protection of the cell if such DNA appears (e.g., in case of viral infection). Noteworthy is that the higher the level of degradation, the lower the level of lesion processing or strand reconstitution. For example, the highest level of exonucleolytic activity was noted for substrate oligos denoted as dU+1 (up to five removed bases). This study and past studies have shown that the lesion placed +1 to cdPu was not processed by nuclear or mitochondrial polymerases, so the strand could not be rejoined [7,8,30]. Possibly, in this situation, it was redirected onto the degradation path. On the other hand, oligonucleotides denoted as dU−4 have shown no strand degradation in all tested cytoplasmic extracts, but at the same time, the high activity of polymerases was observed (including the incorporation of more than one dNU). The high efficiency of polymerases was also observed for dU−4 treated with nuclear extracts of *xrs5*, BJ, and XPC cells [8,30]. Moreover, in nuclear extracts of the *xrs5* strand, rejoining took place with high efficiency for oligos containing a lesion placed −4 bp from cdA and 5',8-cyclo-2'-deoxyguanosine (cdG), regardless of their diastereomeric form [8]. Therefore, the competitive action of proteins responsible for DNA reconstitution and DNA degradation may be assumed. From the practical point of view, in the case of STO containing complex damage resulting from irradiation, the oligonucleotides might be directed for degradation instead of repair if the AP site were in the most problematic positions (i.e., dU+1, dU+4) in relation to cdPu; hence, the therapeutic effect of the STO would be obstructed.

## 5. Conclusions

In conclusion, the presented study showed that the first steps of effective lesion processing (strand incision and strand elongation) of dsDNA containing bi-stranded CDL (with two lesions: AP site vs. (5'S)/(5'R)cdA) in the cytoplasm depend on the position and distance between both lesions. The overall activity of proteins involved in DNA damage processing/repair in cytoplasmic extracts from *xrs5*, BJ, and XPC cells differed between 5'S and 5'R diastereomers. These observations aligned with the previous studies concerning repair mechanisms in the nucleus [8,30].

This article has shown that proteins involved in DNA damage processing (demonstrating endonucleolytic, exonucleolytic, and polymerase activities) were active in cytoplasmic extracts shortly after their biosynthesis and before translocation into the nucleus. Moreover, 5'S and 5'R diastereomeric forms of cdA have influenced differently the proteins' enzymatic action. Despite the lower activity of proteins in the cytoplasm than in the nucleus, the general trends aligned with the observations from past studies concerning nuclear and mitochondrial extracts [7,8,10,30]. Moreover, enhanced DNA strand degradation was observed when lesions were located +1 nucleobase from cdA within a cluster. These oligonucleotides were not repaired in CE nor in NE from all tested cell lines, which may indicate the competitive action of repair and degradation machinery (when lesions were too complex for repairing, the cytoplasmic degradation rate increased).

Taking into consideration the presented results, the use of synthetic therapeutic oligonucleotides (STO) as a part of anticancer therapy should be carefully considered. The timing of its administration (before, during, or after radiotherapy) seems to be crucial.

STO with complex and clustered DNA lesions in its structure (such as cdA resulting from radiation) might not be effective (e.g., degraded by the cytoplasmic proteins) or even cause adverse effects (due to the possibility of mutations following impaired repair pathway). The results of this study may shed new light on the activity of proteins involved in the DNA damage processing/repair of complex lesions such as CDL and cdPu. Moreover, this article raises some issues to be considered about therapeutic oligonucleotides as a part of anticancer treatment.

**Supplementary Materials:** The following supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/chemosensors10060204/s1>, Figure S1: The stability of “matrix” oligonucleotides, Figure S2: Mass spectra of substrate oligonucleotides containing cdPu, Figure S3: (A) Verification of radiolabeling of single-stranded (ssDNA) and efficient annealing of double-stranded (dsDNA) oligonucleotides (B) Verification of AP sites’ stability/purity and SSBs formation, Figure S4: The autoradiograms presenting results—ScdA by xrs5 Cytoplasmic Extract, S5: The autoradiograms presenting results—RcdA by xrs5 Cytoplasmic Extract, Figure S6: The autoradiograms presenting results—ScdA by BJ Cytoplasmic Extract, S7: The autoradiograms presenting results—RcdA by BJ Cytoplasmic Extract, Figure S8: The autoradiograms presenting results—ScdA by XPC Cytoplasmic Extract, S9: The autoradiograms presenting results—RcdA by XPC Cytoplasmic Extract, Figure S10: Endonucleolytic activity of xrs5 vs. BJ vs. XPC—comparison of individual strands—ScdA Cytoplasmic Extract, Figure S11: Endonucleolytic activity of xrs5 vs. BJ vs. XPC—comparison of individual strands—RcdA Cytoplasmic Extract, Figure S12: Polymerase activity of xrs5 vs. BJ vs. XPC—comparison of individual strands—ScdA Cytoplasmic Extract, Figure S13: Polymerase activity of xrs5 vs. BJ vs. XPC—comparison of individual strands—RcdA Cytoplasmic Extract, Figure S14: Exonucleolytic activity of xrs5 vs. BJ vs. XPC—comparison of individual strands—ScdA Cytoplasmic Extract, Figure S15: Exonucleolytic activity of xrs5 vs. BJ vs. XPC—comparison of individual strands—RcdA Cytoplasmic Extract. Table S1: The full sequence list of substrate oligonucleotides, Table S2: The masses (calculated vs. found) of chosen substrate oligos, Table S3: Xrs5—Control 1. Raw numerical data of densitometry, Table S4: BJ—Control 1. Raw numerical data of densitometry, Table S5: XPC—Control 1. Raw numerical data of densitometry, Table S6: Xrs5—ScdA. Raw numerical data of densitometry, Table S7: Xrs5—RcdA. Raw numerical data of densitometry, Table S8: BJ—ScdA. Raw numerical data of densitometry, Table S9: BJ—RcdA. Raw numerical data of densitometry, Table S10: XPC—ScdA. Raw numerical data of densitometry, Table S11: XPC—RcdA. Raw numerical data of densitometry.

**Author Contributions:** Conceptualization and methodology B.T.K.; validation, K.B., J.K.-B. and B.T.K.; formal analysis, K.B. and B.T.K.; investigation, K.B. and J.K.-B.; resources, J.K.-B. and B.T.K.; data curation, K.B.; writing—original draft preparation, K.B.; writing—review and editing, K.B., J.K.-B. and B.T.K.; visualization, K.B.; supervision, B.T.K.; project administration, B.T.K.; funding acquisition, B.T.K. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This research was funded by the National Science Center, Poland (grant No. 2016/23/B/NZ7/03367).

**Institutional Review Board Statement:** Not applicable.

**Informed Consent Statement:** Not applicable.

**Data Availability Statement:** Not applicable.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

## References

1. Bayley, S.T. Autoradiography of Single Cells. *Nature* **1947**, *160*, 193–194. [[CrossRef](#)]
2. Eccles, L.J.; Lomax, M.E.; O’Neill, P. Hierarchy of Lesion Processing Governs the Repair, Double-Strand Break Formation and Mutability of Three-Lesion Clustered DNA Damage. *Nucleic Acids Res.* **2009**, *38*, 1123–1134. [[CrossRef](#)]
3. Mourgues, S.; Lomax, M.E.; O’Neill, P. Base Excision Repair Processing of Abasic Site/Single-Strand Break Lesions within Clustered Damage Sites Associated with XRCC1 Deficiency. *Nucleic Acids Res.* **2007**, *35*, 7676–7687. [[CrossRef](#)]
4. Lomax, M.E.; Cunniffe, S.; O’Neill, P. Efficiency of Repair of an Abasic Site within DNA Clustered Damage Sites by Mammalian Cell Nuclear Extracts. *Biochemistry* **2004**, *43*, 11017–11026. [[CrossRef](#)]

5. Eccles, L.J.; Menoni, H.; Angelov, D.; Lomax, M.E.; O'Neill, P. Efficient Cleavage of Single and Clustered AP Site Lesions within Mono-Nucleosome Templates by CHO-K1 Nuclear Extract Contrasts with Retardation of Incision by Purified APE1. *DNA Repair* **2015**, *35*, 27–36. [[CrossRef](#)]
6. Karwowski, B.T. (5'S) 5',8-Cyclo-2'-Deoxyadenosine Cannot Stop BER. Clustered DNA Lesion Studies. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 5934. [[CrossRef](#)]
7. Boguszewska, K.; Kaźmierczak-Barańska, J.; Karwowski, B.T. The Influence of 5',8-Cyclo-2'-Deoxypurines on the Mitochondrial Repair of Clustered Dna Damage in Xrs5 Cells: The Preliminary Study. *Molecules* **2021**, *26*, 7042. [[CrossRef](#)]
8. 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*, 725. [[CrossRef](#)]
9. Karwowski, B.; Czarny, P.; Szemraj, J.; Śliwiński, T.; Majchrzak, K.; Merecz-Sadowska, A.; Jabłkowski, M. The Influence of Hepatitis C Virus Therapy on the DNA Base Excision Repair System of Peripheral Blood Mononuclear Cells. *DNA Cell Biol.* **2017**, *36*, 535–540. [[CrossRef](#)]
10. Karwowski, B.T.; Bellon, S.; O'Neill, P.; Lomax, M.E.; Cadet, J. Effects of (5'S)-5',8-Cyclo-2'-Deoxyadenosine on the Base Excision Repair of Oxidatively Generated Clustered DNA Damage. A Biochemical and Theoretical Study. *Org. Biomol. Chem.* **2014**, *12*, 8671–8682. [[CrossRef](#)]
11. Bundy, D. Autoradiography. In *Current Protocols in Protein Science*; John Wiley & Sons Inc.: Hoboken, NJ, USA, 1997; pp. 10.11.1–10.11.6.
12. Voytas, D.; Ke, N. Detection and Quantitation of Radiolabeled Proteins and DNA in Gels and Blots. In *Current Protocols in Immunology*; John Wiley & Sons Inc.: Hoboken, NJ, USA, 2002; pp. A.31.1–A.31.10.
13. Lomax, M.E.; Folkes, L.K.; O'Neill, P. Biological Consequences of Radiation-Induced DNA Damage: Relevance to Radiotherapy. *Clin. Oncol.* **2013**, *25*, 578–585. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Burkart, W.; Jung, T.; Frash, G. Damage Pattern as a Function of Radiation Quality and Other Factors. *Comptes Rendus l'Académie Sci.* **1999**, *322*, 89–101. [[CrossRef](#)]
15. Cadet, J.; Ravanat, J.-L.; TavernaPorro, M.; Menoni, H.; Angelov, D. Oxidatively Generated Complex DNA Damage: Tandem and Clustered Lesions. *Cancer Lett.* **2012**, *327*, 5–15. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Karwowski, B.T. The Influence of Single, Tandem, and Clustered DNA Damage on the Electronic Properties of the Double Helix: A Theoretical Study. *Molecules* **2020**, *25*, 3126. [[CrossRef](#)]
17. Chatgililoglu, C.; Ferreri, C.; Geacintov, N.E.; Krokidis, M.G.; Liu, Y.; Masi, A.; Shafirovich, V.; Terzidis, M.A.; Tsegay, P.S. 5',8-Cyclopurine Lesions in DNA Damage: Chemical, Analytical, Biological, and Diagnostic Significance. *Cells* **2019**, *8*, 513. [[CrossRef](#)]
18. Pande, P.; Das, R.S.; Sheppard, C.; Kow, Y.W.; Basu, A.K. 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* **2012**, *11*, 926–931. [[CrossRef](#)]
19. Karwowski, B.T. 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. *Cells* **2019**, *8*, 1303. [[CrossRef](#)]
20. Jaruga, P.; Rozalski, R.; Jawien, A.; Migdalski, A.; Olinski, R.; Dizdaroglu, M. DNA Damage Products (5'R)- and (5'S)-8,5'-Cyclo-2'-Deoxyadenosines as Potential Biomarkers in Human Urine for Atherosclerosis. *Biochemistry* **2012**, *51*, 1822–1824. [[CrossRef](#)]
21. Mori, T.; Nakane, H.; Iwamoto, T.; Krokidis, M.G.; Chatgililoglu, C.; Tanaka, K.; Kaidoh, T.; Hasegawa, M.; Sugiura, S. High Levels of Oxidatively Generated DNA Damage 8,5'-Cyclo-2'-Deoxyadenosine Accumulate in the Brain Tissues of Xeroderma Pigmentosum Group A Gene-Knockout Mice. *DNA Repair* **2019**, *80*, 52–58. [[CrossRef](#)]
22. Jaruga, P.; Theruvathu, J.; Dizdaroglu, M.; Brooks, P.J. Complete Release of (5'S)-8,5'-Cyclo-2'-Deoxyadenosine from Dinucleotides, Oligodeoxynucleotides and DNA, and Direct Comparison of Its Levels in Cellular DNA with Other Oxidatively Induced DNA Lesions. *Nucleic Acids Res.* **2004**, *32*, e87. [[CrossRef](#)]
23. Pednekar, V.; Weerasooriya, S.; Jasti, V.P.; Basu, A.K. Mutagenicity and Genotoxicity of (5'S)-8,5'-Cyclo-2'-Deoxyadenosine in *Escherichia coli* and Replication of (5'S)-8,5'-Cyclopurine-2'-Deoxynucleosides in Vitro by Dna Polymerase Iv, Exo-Free Klenow Fragment, and Dpo4. *Chem. Res. Toxicol.* **2014**, *27*, 200–210. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Jaruga, P.; Birincioglu, M.; Rodriguez, H.; Dizdaroglu, M. Mass Spectrometric Assays for the Tandem Lesion 8,5'-Cyclo-2'-Deoxyguanosine in Mammalian DNA. *Biochemistry* **2002**, *41*, 3703–3711. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Kuraoka, I.; Bender, C.; Romieu, A.; Cadet, J.; Wood, R.D.; Lindahl, T. 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. USA* **2000**, *97*, 3832–3837. [[CrossRef](#)]
26. Bukowska, B.; Karwowski, B.T. The Clustered DNA Lesions—Types, Pathways of Repair and Relevance to Human Health. *Curr. Med. Chem.* **2018**, *25*, 2722–2735. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Brooks, P.J. The Cyclopurine Deoxynucleosides: DNA Repair, Biological Effects, Mechanistic Insights, and Unanswered Questions. *Free Radic. Biol. Med.* **2017**, *107*, 90–100. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. David-Cordonnier, M.H.; Cunniffe, S.M.T.; Hickson, I.D.; O'Neill, P. Efficiency of Incision of an AP Site within Clustered DNA Damage by the Major Human AP Endonuclease. *Biochemistry* **2002**, *41*, 634–642. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

29. Merez, A.; Karwowski, B.T. DNA Tandem Lesion: 5',8-Cyclo-2'-Deoxyadenosine. The Influence on Human Health. *Mol. Biol.* **2016**, *50*, 793–798. [[CrossRef](#)]
30. Kaźmierczak-Barańska, J.; Boguszewska, K.; Szewczuk, M.; Karwowski, B.T. Effects of 5',8'-Cyclo-2'-Deoxypurines on the Base Excisionrepair of Clustered DNA Lesions in Nuclear Extracts of the Xpc Cell Line. *Cells* **2021**, *10*, 3254. [[CrossRef](#)]
31. 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 BsmI and SspI Restriction Enzymes. *Molecules* **2021**, *26*, 3750. [[CrossRef](#)]
32. 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*, 5177. [[CrossRef](#)]
33. Szewczuk, M.; Karwowski, B. The Influence of CdG on 8-OxodG Excision by OGG1 and FPG Glycosylases. *Acta Biochim. Pol.* **2022**, *69*, 227–232. [[CrossRef](#)]
34. Jaruga, P.; Dizdaroglu, M. 8,5'-Cyclopurine-2'-Deoxynucleosides in DNA: Mechanisms of Formation, Measurement, Repair and Biological Effects. *DNA Repair* **2008**, *7*, 1413–1425. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Brooks, P.J. The 8,5'-Cyclopurine-2'-Deoxynucleosides: Candidate Neurodegenerative DNA Lesions in Xeroderma Pigmentosum, and Unique Probes of Transcription and Nucleotide Excision Repair. *DNA Repair* **2008**, *7*, 1168–1179. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Kraemer, K.H.; Patronas, N.J.; Schiffmann, R.; Brooks, B.P.; Tamura, D.; DiGiovanna, J.J. Xeroderma Pigmentosum, Trichodystrophy and Cockayne Syndrome: A Complex Genotype-Phenotype Relationship. *Neuroscience* **2007**, *145*, 1388–1396. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Fayyad, N.; Kobaisi, F.; Beal, D.; Mahfouf, W.; Ged, C.; Morice-Picard, F.; Fayyad-Kazan, M.; Fayyad-Kazan, H.; Badran, B.; Rezvani, H.R.; et al. Xeroderma Pigmentosum C (XPC) Mutations in Primary Fibroblasts Impair Base Excision Repair Pathway and Increase Oxidative DNA Damage. *Front. Genet.* **2020**, *11*, 1458. [[CrossRef](#)]
38. Shivji, M.K.K.; Eker, A.P.M.; Wood, R.D. DNA Repair Defect in Xeroderma Pigmentosum Group C and Complementing Factor from HeLa Cells. *J. Biol. Chem.* **1994**, *269*, 22749–22757. [[CrossRef](#)]
39. Gong, L.; Zhang, Y.; Liu, C.; Zhang, M.; Han, S. Application of Radiosensitizers in Cancer Radiotherapy. *Int. J. Nanomed.* **2021**, *16*, 1083–1102. [[CrossRef](#)]
40. Herath, N.I.; Berthault, N.; Thierry, S.; Jdey, W.; Lienafa, M.C.; Bono, F.; Noguez-Hellin, P.; Sun, J.S.; Dutreix, M. Preclinical Studies Comparing Efficacy and Toxicity of DNA Repair Inhibitors, Olaparib, and AsidNA, in the Treatment of Carboplatin-Resistant Tumors. *Front. Oncol.* **2019**, *9*, 1097. [[CrossRef](#)]
41. Jdey, W.; Thierry, S.; Russo, C.; Devun, F.; Al Abo, M.; Noguez-Hellin, P.; Sun, J.S.; Barillot, E.; Zinovyev, A.; Kuperstein, I.; et al. Drug-Driven Synthetic Lethality: Bypassing Tumor Cell Genetics with a Combination of AsidNA and PARP Inhibitors. *Clin. Cancer Res.* **2017**, *23*, 1001–1011. [[CrossRef](#)]
42. Gökirmak, T.; Nikan, M.; Wiechmann, S.; Prakash, T.P.; Tanowitz, M.; Seth, P.P. Overcoming the Challenges of Tissue Delivery for Oligonucleotide Therapeutics. *Trends Pharmacol. Sci.* **2021**, *42*, 588–604. [[CrossRef](#)]
43. Hammond, S.M.; Aartsma-Rus, A.; Alves, S.; Borgos, S.E.; Buijssen, R.A.M.; Collin, R.W.J.; Covello, G.; Denti, M.A.; Desviat, L.R.; Echevarria, L.; et al. Delivery of Oligonucleotide-based Therapeutics: Challenges and Opportunities. *EMBO Mol. Med.* **2021**, *13*, e13243. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Ferreira, S.; Foray, C.; Gatto, A.; Larcher, M.; Heinrich, S.; Lupu, M.; Mispelner, J.; Boussin, F.D.; Pouponnot, C.; Dutreix, M. AsidNA Is a Radiosensitizer with No Added Toxicity in Medulloblastoma Pediatric Models. *Clin. Cancer Res.* **2021**, *26*, 5735–5746. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Johannes, L.; Lucchino, M. Current Challenges in Delivery and Cytosolic Translocation of Therapeutic RNAs. *Nucleic Acid Ther.* **2018**, *28*, 178–193. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Topf, U.; Wrobel, L.; Chacinska, A. Chatty Mitochondria: Keeping Balance in Cellular Protein Homeostasis. *Trends Cell Biol.* **2016**, *26*, 577–586. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
47. Chacinska, A.; Rehling, P. Moving Proteins from the Cytosol Intomitochondria. *Biochem. Soc. Trans.* **2004**, *32*, 774–776. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
48. Karwowski, B.T.; Grand, A.; Cadet, J. 5',8-Cyclo-2'-Deoxyadenosine (CdA) Formation by  $\gamma$ -Radiation. Theoretical Quantum Mechanics Study. *Acta Biochim. Pol.* **2009**, *56*, 655–662. [[CrossRef](#)]
49. Karwowski, B.T. Formation of 5',8-Cyclo-2'-Deoxyadenosine in Single Strand DNA. Theoretical Quantum Mechanics Study. *Org. Biomol. Chem.* **2010**, *8*, 1603. [[CrossRef](#)]
50. Guerrero, C.R.; Wang, J.; Wang, Y. Induction of 8,5'-Cyclo-2'-Deoxyadenosine and 8,5'-Cyclo-2'-Deoxyguanosine in Isolated DNA by Fenton-Type Reagents. *Chem. Res. Toxicol.* **2013**, *26*, 1361–1366. [[CrossRef](#)]
51. Kaniak-Golik, A.; Skoneczna, A. Mitochondria-Nucleus Network for Genome Stability. *Free. Radic. Biol. Med.* **2015**, *82*, 73–104. [[CrossRef](#)]
52. Shaughnessy, D.T.; McAllister, K.; Worth, L.; Haugen, A.C.; Meyer, J.N.; Domann, F.E.; van Houten, B.; Mostoslavsky, R.; Bultman, S.J.; Baccarelli, A.A.; et al. Mitochondria, Energetics, Epigenetics, and Cellular Responses to Stress. *Environ. Health Perspect.* **2015**, *122*, 1271–1278. [[CrossRef](#)]
53. Izumi, T.; Mellon, I. *Base Excision Repair and Nucleotide Excision Repair*; Elsevier Inc.: Amsterdam, The Netherlands, 2016; ISBN 9780128033456.
54. Prakash, A.; Doublet, S. Base Excision Repair in the Mitochondria. *J. Cell Biochem.* **2015**, *116*, 1490–1499. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

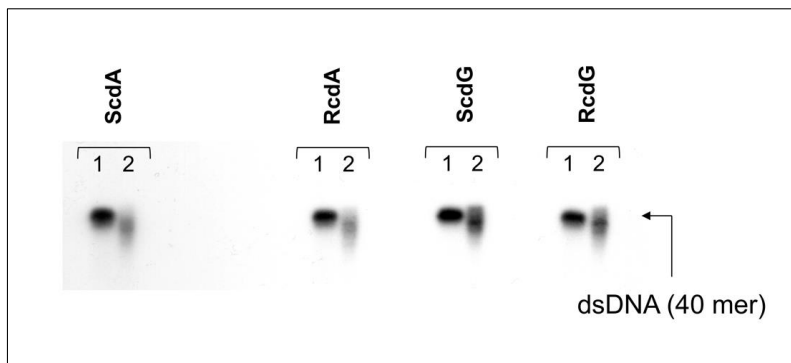
55. Frosina, G.; Fortini, P.; Rossi, O.; Carrozzino, F.; Raspaglio, G.; Cox, L.S.; Lane, D.P.; Abbondandolo, A.; Dogliotti, E. Two Pathways for Base Excision Repair in Mammalian Cells. *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 9573–9578. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
56. Romieu, A.; Gasparutto, D.; Cadet, J. Synthesis and Characterization of Oligonucleotides Containing 5',8- Cyclopurine 2'-Deoxyribonucleosides: (5'R)-5',8-Cyclo-2'-Deoxyadenosine, (5'S)-5',8-Cyclo-2'-Deoxyguanosine, and (5'R)-5',8-Cyclo-2'-Deoxyguanosine. *Chem. Res. Toxicol.* **1999**, *12*, 412–421. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
57. Walker, G.; Chatterjee, N. Mechanisms of DNA Damage, Repair, and Mutagenesis. *Environ. Mol. Mutagenesis* **2017**, *58*, 235–263. [[CrossRef](#)]
58. Vilenchik, M.M.; Knudson, A.G. Endogenous DNA Double-Strand Breaks: Production, Fidelity of Repair, and Induction of Cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, *100*, 12871–12876. [[CrossRef](#)]
59. Tubbs, A.; Nussenzweig, A. Endogenous DNA Damage as a Source of Genomic Instability in Cancer. *Cell* **2017**, *168*, 644–656. [[CrossRef](#)]
60. Jang, B.; Kwon, H.; Katila, P.; Lee, S.J.; Lee, H. Dual Delivery of Biological Therapeutics for Multimodal and Synergistic Cancer Therapies. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2016**, *98*, 113–133. [[CrossRef](#)]
61. Takakura, K.; Kawamura, A.; Torisu, Y.; Koido, S.; Yahagi, N.; Saruta, M. The Clinical Potential of Oligonucleotide Therapeutics against Pancreatic Cancer. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20*, 3331. [[CrossRef](#)]
62. Lundin, K.E.; Gissberg, O.; Smith, C.I.E. Oligonucleotide Therapies: The Past and the Present. *Hum. Gene Ther.* **2015**, *26*, 475–485. [[CrossRef](#)]
63. Roberts, T.C.; Langer, R.; Wood, M.J.A. Advances in Oligonucleotide Drug Delivery. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2020**, *19*, 673–694. [[CrossRef](#)]
64. Jasti, V.P.; Das, R.S.; Hilton, B.A.; Weerasooriya, S.; Zou, Y.; Basu, A.K. (5'S)-8,5'-Cyclo-2'-Deoxyguanosine Is a Strong Block to Replication, a Potent Pol V-Dependent Mutagenic Lesion, and Is Inefficiently Repaired in *Escherichia coli*. *Biochemistry* **2011**, *50*, 3862–3865. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
65. Krokan, H.E.; Bjørås, M. Base Excision Repair. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **2013**, *5*, a012583. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]



# The Usefulness of Autoradiography for DNA Repair Proteins Activity Detection in the Cytoplasm towards Radiolabeled Oligonucleotides Containing 5',8-cyclo-2'-deoxyadenosine

## Supplementary Materials

Page	Item	Title
2	<b>Figure S1</b>	Verification of the stability of oligos with cdPus (Control 2) after xrs5 CE treatment
2	<b>Table S1</b>	The full sequence list of substrate ds-oligonucleotides
3-6	<b>Figure S2</b>	Mass spectra of substrate oligos
6	<b>Table S2</b>	The masses (calculated vs. found) of chosen substrate oligos
7	<b>Figure S3</b>	Verification of the ss-oligos labeling and hybridization and verification of the AP sites' formation (after UDG treatment) and SSBs' formation (after hAPE1 treatment)
9-10	<b>Table S3</b>	Xrs5 – Control 1. Raw numerical data
11	<b>Table S4</b>	BJ – Control 1. Raw numerical data
12	<b>Table S5</b>	XPC – Control 1. Raw numerical data
13-14	<b>Table S6</b>	Xrs5 - ScdA. Raw numerical data
15-16	<b>Table S7</b>	Xrs5 - RcdA. Raw numerical data
17-18	<b>Table S8</b>	BJ - ScdA. Raw numerical data
19-20	<b>Table S9</b>	BJ - RcdA. Raw numerical data
21-22	<b>Table S10</b>	XPC - ScdA. Raw numerical data
23-24	<b>Table S11</b>	XPC - RcdA. Raw numerical data
26-27	<b>Figure S4</b>	The autoradiograms presenting results - ScdA by xrs5 Cytoplasmic Extract
28-29	<b>Figure S5</b>	The autoradiograms presenting results - RcdA by xrs5 Cytoplasmic Extract
30-31	<b>Figure S6</b>	The autoradiograms presenting results - ScdA by BJ Cytoplasmic Extract
32-33	<b>Figure S7</b>	The autoradiograms presenting results - RcdA by BJ Cytoplasmic Extract
34-35	<b>Figure S8</b>	The autoradiograms presenting results - ScdA by XPC Cytoplasmic Extract
36-37	<b>Figure S9</b>	The autoradiograms presenting results - RcdA by XPC Cytoplasmic Extract
39-41	<b>Figure S10</b>	Endonucleolytic activity (strand degradation) [%] of xrs5 vs. BJ vs. XPC – comparison of individual strands – ScdA Cytoplasmic Extract.
42-44	<b>Figure S11</b>	Endonucleolytic activity (strand degradation) [%] of xrs5 vs. BJ vs. XPC – comparison of individual strands – RcdA Cytoplasmic Extract.
45-47	<b>Figure S12</b>	Polymerase activity (strand elongation) [%] of xrs5 vs. BJ vs. XPC – comparison of individual strands – ScdA Cytoplasmic Extract.
48-50	<b>Figure S13</b>	Polymerase activity (strand elongation) [%] of xrs5 vs. BJ vs. XPC – comparison of individual strands – RcdA Cytoplasmic Extract.
51-53	<b>Figure S14</b>	Exonucleolytic activity (strand degradation) [%] of xrs5 vs. BJ vs. XPC – comparison of individual strands – ScdA Cytoplasmic Extract.
54-56	<b>Figure S15</b>	Exonucleolytic activity (strand degradation) [%] of xrs5 vs. BJ vs. XPC – comparison of individual strands – RcdA Cytoplasmic Extract.



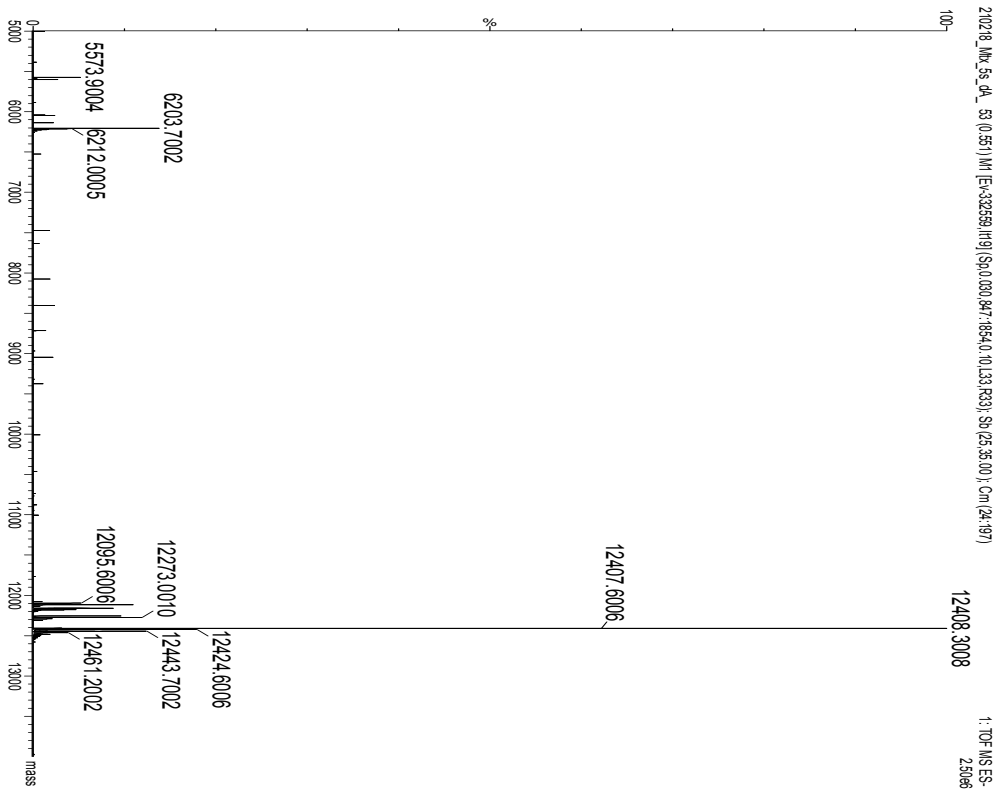
**Figure S1.** The stability of „matrix” oligonucleotides (Control 2) after treatment with 50 µg of xrs5 cytoplasmic extracts (CE). Each lane number corresponds with different assay time: lane 1 - 0 min; lane 2 - 120 min.

**Table S1.** The full sequence list of substrate ds-oligonucleotides with 2'-deoxyuridine (dU) and cdPus.

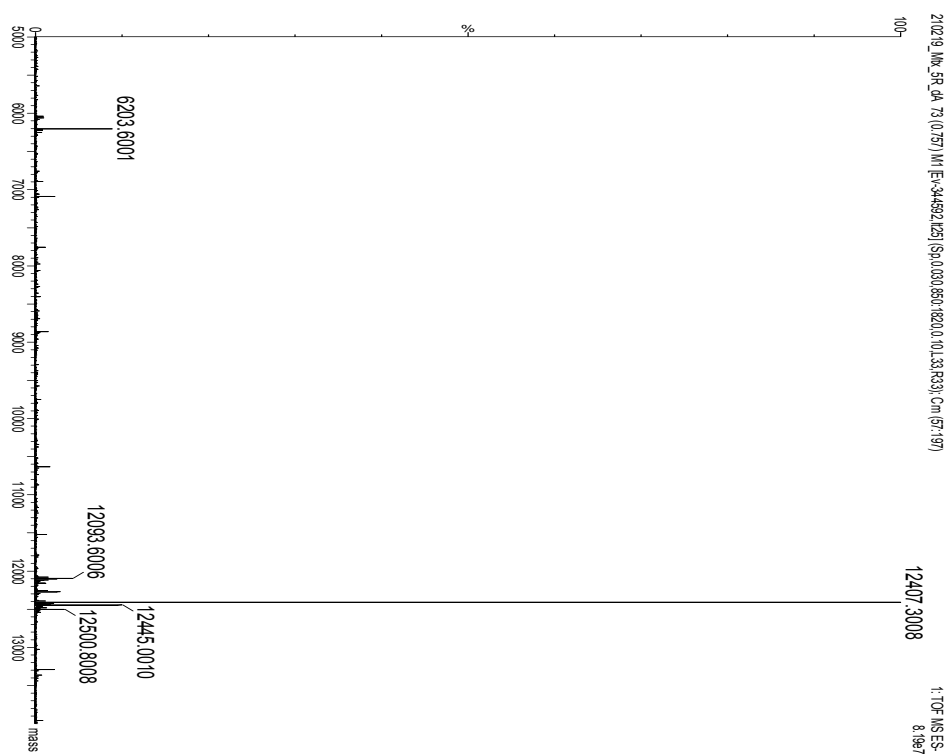
Name	Sequence
Control 1	5' -CTCTTGTCAGGAATATTGTCUCTATGCTCCCACCAAAGGC-3' 3' -GAGAACAGTCCTTATAACAGAGATACGAGGGTGGTTCCG-5'
Control 2	5' -GCCTTTGGTGGGAGCATAGXGACAATATTCCTGACAAGAG-3' 3' -CGGAAACCACCCTCGTATCTCTGTTATAAGGACTGTTCTC-5'
dU-4	5' -CTCTTGTCAGGAATATUGTCTCTATGCTCCCACCAAAGGC-3' 3' -GAGAACAGTCCTTATAACAGXGATACGAGGGTGGTTCCG-5'
dU-1	5' -CTCTTGTCAGGAATATTGTUUTCTATGCTCCCACCAAAGGC-3' 3' -GAGAACAGTCCTTATAACAGXGATACGAGGGTGGTTCCG-5'
dU0	5' -CTCTTGTCAGGAATATTGTCUCTATGCTCCCACCAAAGGC-3' 3' -GAGAACAGTCCTTATAACAGXGATACGAGGGTGGTTCCG-5'
dU+1	5' -CTCTTGTCAGGAATATTGTCTUATGCTCCCACCAAAGGC-3' 3' -GAGAACAGTCCTTATAACAGXGATACGAGGGTGGTTCCG-5'
dU+4	5' -CTCTTGTCAGGAATATTGTCTAUUGCTCCCACCAAAGGC-3' 3' -GAGAACAGTCCTTATAACAGXGATACGAGGGTGGTTCCG-5'

U – represents 2'-deoxyuridine (a precursor of an AP site); X – represents (5'S)-5',8-cyclo-2'-deoxyadenosine (ScdA) or (5'R)-5',8-cyclo-2'-deoxyadenosine (RcdA).

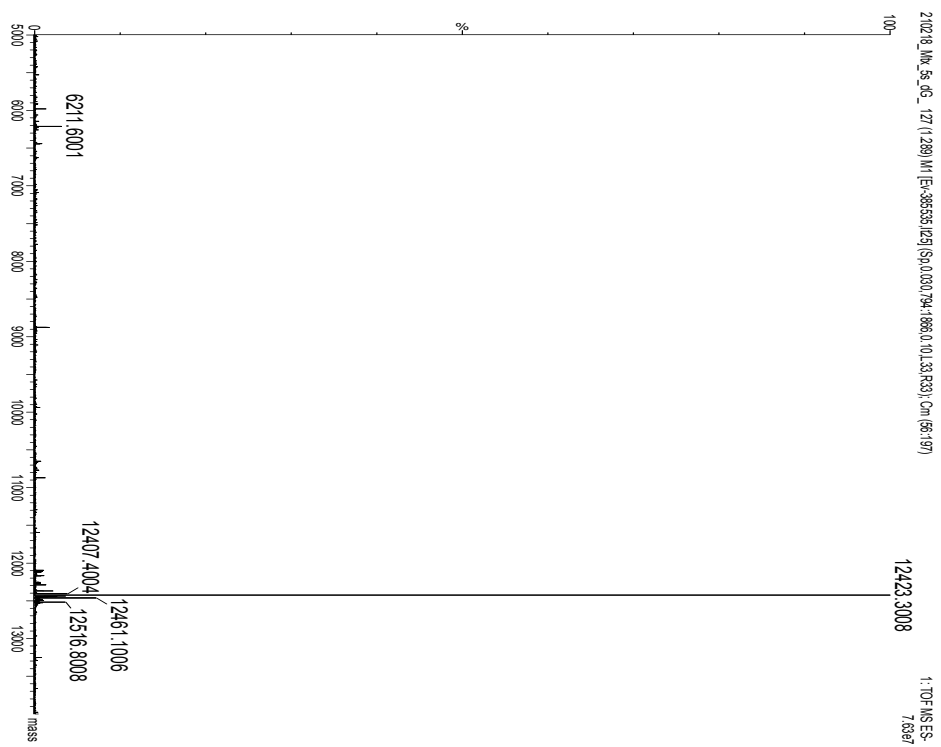
A.



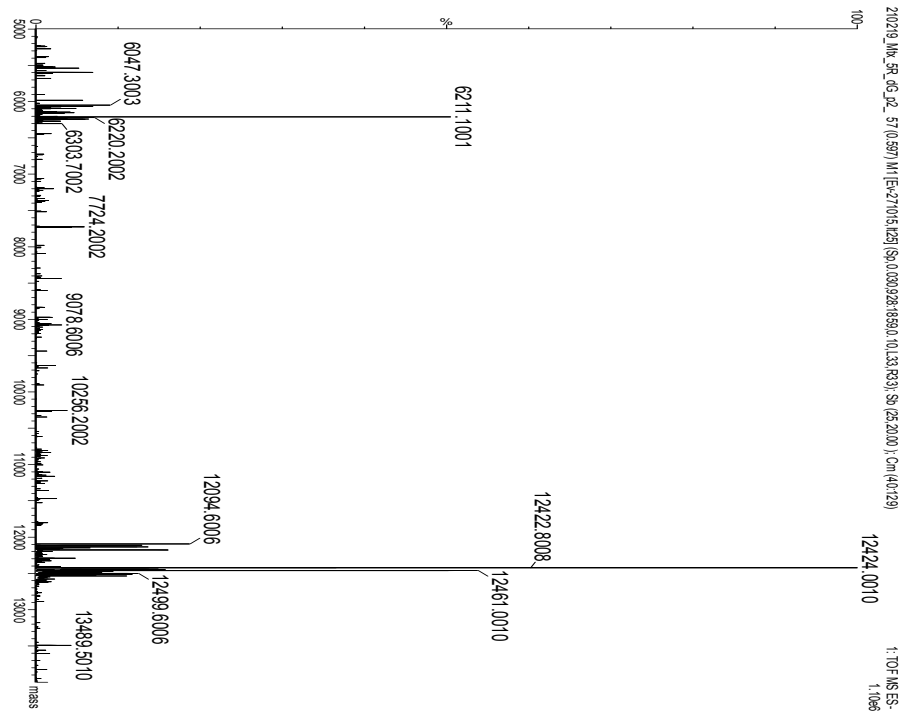
B.



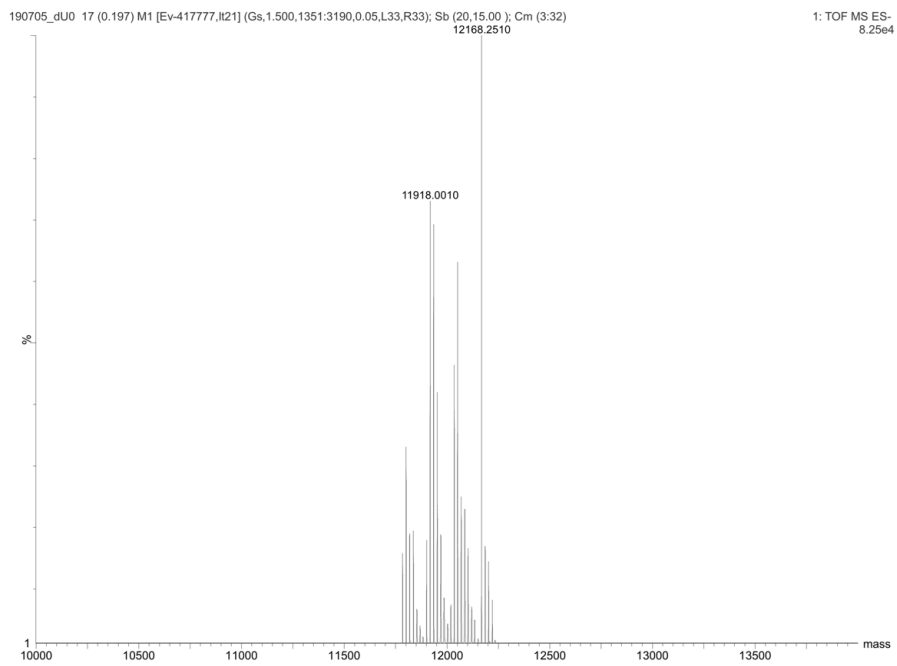
C.



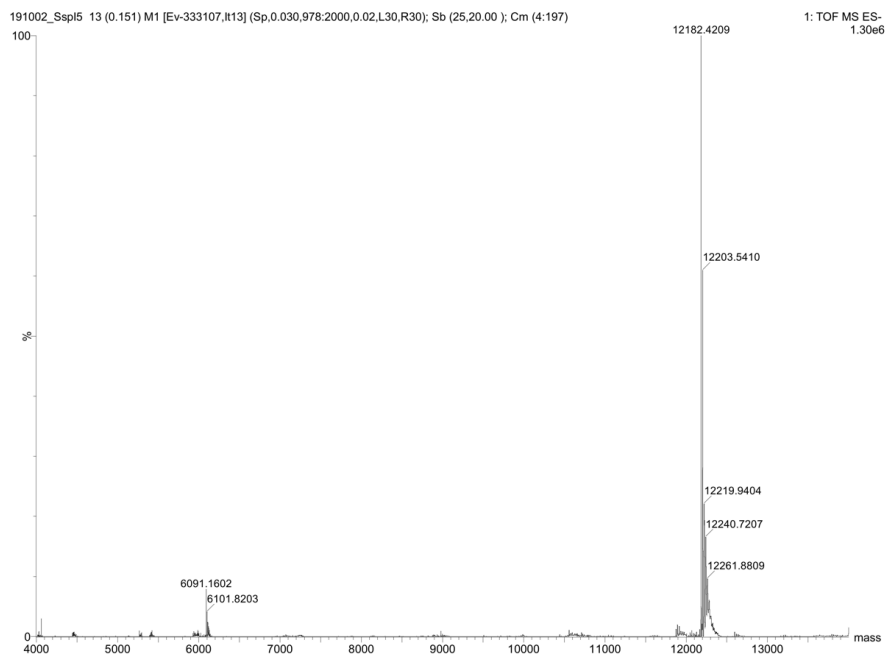
D.



E.



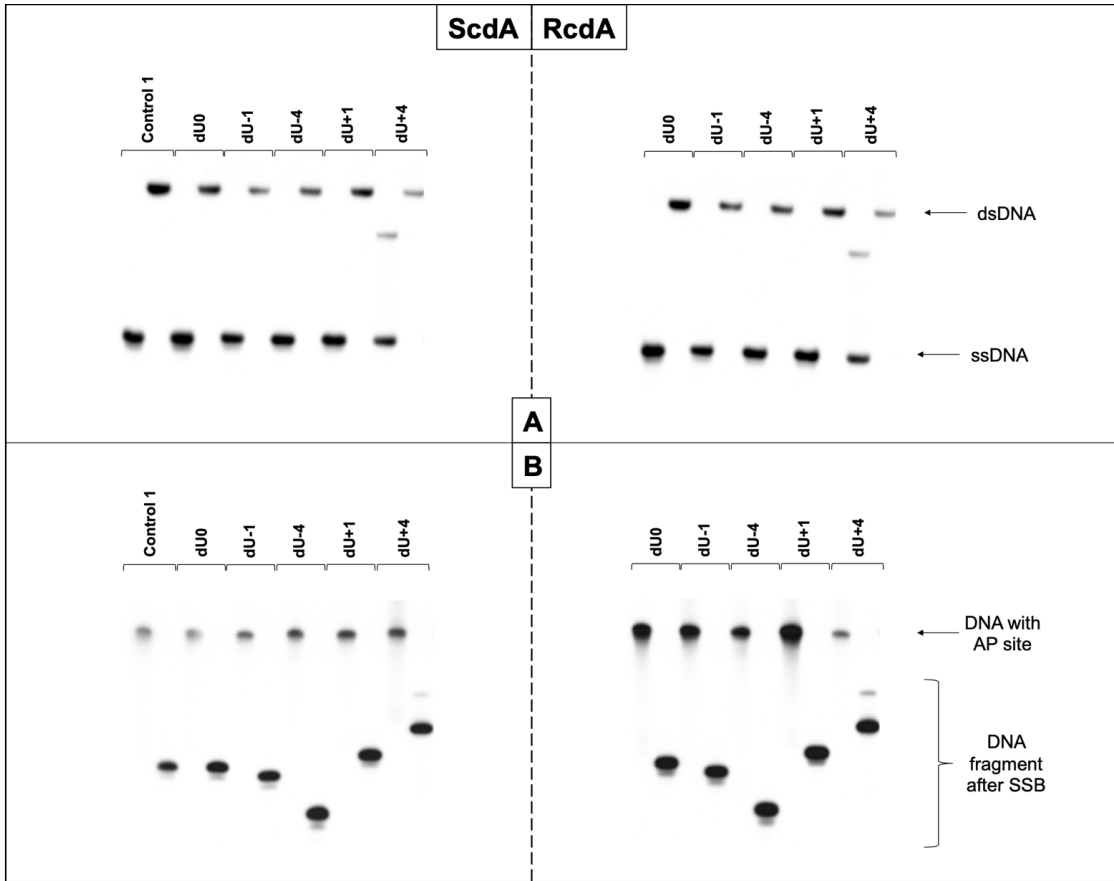
F.



**Figure S2.** Mass spectra of substrate oligonucleotides containing cdPu. (A) ssDNA with (5'S)-5',8-cyclo-2'-deoxyadenosine (Mtx-ScdA); (B) ssDNA with (5'R)-5',8-cyclo-2'-deoxyadenosine (Mtx-RcdA); (C) ssDNA with (5'S)-5',8-cyclo-2'-deoxyguanosine (Mtx-ScdG); (D) ssDNA with (5'R)-5',8-cyclo-2'-deoxyguanosine (Mtx-RcdG); (E) ssDNA with 2'-deoxyuridine (Control 1 – dU strand); (F) native ssDNA (Control 1 – native strand).

**Table S2.** The masses (calculated vs. found) of chosen substrate oligos.

Oligonucleotide	Calculated Mass	Found Mass
Control 1 (dU strand)	12,167.90	12,168.25
Control 1 (native strand)	12,181.98	12,182.42
Mtx-ScdA	12,407.00	12,408.30
Mtx-RcdA	12,407.00	12,407.30
Mtx-ScdG	12,423.00	12,423.30
Mtx-RcdG	12,423.00	12,424.00



**Figure S3. (A)** Verification of radiolabeling of single-stranded (ssDNA) and efficient annealing of double-stranded (dsDNA) oligonucleotides on the 15% native polyacrylamide gel **(B)** Verification of AP sites' stability/purity and SSBs formation (after APE1 treatment) on the 15% denaturing polyacrylamide gel. SSB – single stranded break.

**Table S3.** Xrs5 – Control 1. Raw numerical data of densitometry obtained from Quantity One software.

		Time [min]							
		0	1	5	15	30	60	90	120
Strand	Data set	Endonuclease activity [%]							
Control 1	1.	27,16	87,28	83,54	73,30	54,33	22,16	14,80	12,67
	2.	30,24	67,12	56,67	50,53	43,83	26,37	14,58	12,74
	3.	2,70	53,70	52,80	43,71	35,69	23,62	14,76	7,31
	4.	81,05	80,54	75,51	61,75	44,63	19,35	13,60	10,58
	5.	3,41	64,10	52,09	43,44	38,29	24,70	17,44	9,71
	6.	3,19	46,62	45,36	41,57	38,76	24,98	14,55	8,91
	7.	48,35	78,23	73,57	61,75	56,31	26,62	23,19	5,66
	8.	33,91	85,42	83,60	57,12	44,71	28,11	3,59	1,65
	9.	22,98	62,34	62,62	54,45	48,43	34,05	18,43	10,97
	10.	84,45	82,38	70,51	52,59	33,69	6,89	5,49	6,42
	11.	85,33	80,06	66,44	54,67	35,85	12,44	8,46	7,32
	12.	27,35	64,21	57,68	45,84	36,30	7,69	11,04	6,17
	Avg	37,51	71,00	65,03	53,39	42,57	21,42	13,33	8,34
	SD	30,96	13,16	12,56	9,30	7,48	8,36	5,50	3,23

		Time [min]							
		0	1	5	15	30	60	90	120
Strand	Data set	Polymerase activity [%]							
Control 1	1.	4,54	2,75	7,14	19,16	37,93	36,26	10,28	5,79
	2.	4,60	9,19	23,86	32,15	41,82	30,24	14,72	9,19
	3.	11,39	10,74	20,75	35,97	43,28	37,15	24,37	9,56
	4.	2,88	4,17	10,74	27,44	38,98	26,57	10,83	2,81
	5.	2,44	8,15	16,86	30,99	35,29	31,52	17,12	7,93
	6.	1,88	16,76	24,39	31,99	33,82	27,51	15,21	9,81
	7.	7,68	11,58	16,59	30,07	33,98	31,96	22,51	10,92
	8.	4,70	6,32	10,53	33,82	44,58	42,06	3,20	0,51
	9.	14,30	10,23	13,11	19,07	25,20	26,46	16,68	7,19
	10.	7,42	9,72	20,65	40,36	51,18	29,88	11,61	3,58
	11.	6,84	11,89	26,13	35,06	43,37	32,00	14,93	13,04
	12.	1,15	8,07	18,05	32,67	40,89	25,79	21,87	7,50
	Avg	5,82	9,13	17,40	30,73	39,19	31,45	15,28	7,32
	SD	3,95	3,71	6,07	6,30	6,64	4,95	5,94	3,62

		Time [min]							
		0	1	5	15	30	60	90	120
Strand	Data set	Exonuclease activity [%]							
Control 1	1.	1,57	6,56	8,09	6,04	4,22	2,59	2,34	2,13
	2.	1,11	17,49	16,85	14,62	7,25	4,41	2,07	2,34
	3.	2,05	21,21	21,47	18,66	14,99	11,39	6,27	3,98
	4.	15,54	13,71	12,84	9,20	6,33	3,54	4,23	3,28
	5.	0,00	18,20	25,10	19,99	15,45	9,07	9,65	5,17
	6.	0,56	22,07	22,12	15,25	14,83	9,00	6,12	3,87
	7.	2,39	4,72	6,17	6,08	4,87	3,14	3,05	0,87
	8.	2,62	3,00	3,49	2,67	2,99	2,51	0,97	0,25



	9.	5,54	10,08	10,97	9,92	10,65	8,19	4,33	2,98
	10.	4,80	7,73	8,71	5,34	2,13	0,77	0,51	0,81
	11.	7,68	7,38	6,19	5,39	3,63	1,82	1,56	1,94
	12.	2,35	20,94	20,98	17,19	10,22	1,73	2,72	0,97
	Avg	3,85	12,76	13,58	10,86	8,13	4,85	3,65	2,38
	SD	4,29	6,99	7,42	5,99	4,94	3,57	2,64	1,51

**Table S4. BJ** – Control 1. Raw numerical data of densitometry obtained from Quantity One software. \* rejected values.

		Time [min]							
		0	1	5	15	30	60	90	120
Strand	Data set	Endonuclease activity [%]							
Control 1	1.	2,57	68,18	62,02	56,17	47,33	31,18	18,17	14,96
	2.	3,51	72,08	71,26	64,48	54,26	38,81	27,10	16,75
	3.	0,14	83,51	78,13	31,25	62,51	50,45	38,85	27,99
	4.	1,53	90,92	89,78	84,89	64,48	39,20	23,65	14,83
	5.	6,27	82,02	83,39	77,69	64,12	42,54	26,29	19,13
	6.	0,79	75,68	65,38	51,44	42,91	34,93	30,60	29,85
	Avg	2,47	78,73	75,00	60,99	55,94	39,52	27,45	20,58
	SD	2,22	8,33	10,71	19,30	9,27	6,63	6,96	6,67

		Time [min]							
		0	1	5	15	30	60	90	120
Strand	Data set	Polymerase activity [%]							
Control 1	1.	2,45	9,10	14,33	23,40	38,00	56,45	71,05	72,20
	2.	2,11	8,99	10,74	22,65	27,67	49,41	63,85	76,30
	3.	0,46	4,36	9,36	18,47	27,67	40,78	55,14	66,51
	4.	0,72	2,13	3,91	9,05	28,92	54,32	70,56	79,43
	5.	1,85	6,24	6,08	14,36	29,76	51,89	69,95	77,42
	6.	0,74	8,25	11,65	28,75	39,87	55,26	59,46	59,86
	Avg	1,39	6,51	9,34	19,45	31,98	51,35	65,00	71,95
	SD	0,85	2,82	3,80	7,03	5,48	5,76	6,65	7,49

		Time [min]							
		0	1	5	15	30	60	90	120
Strand	Data set	Exonuclease activity [%]							
Control 1	1.	0,45	21,39	22,36	20,28	14,52	11,03	7,76	6,98
	2.	1,05	17,87	17,49	12,84	17,93	11,25	7,57	4,21
	3.	0,04	10,83	12,42	1,58	9,69	8,39	4,72	2,05
	4.	0,18	5,92	5,81	5,79	5,76	4,18	3,26	2,52
	5.	4,59	11,35	10,23	7,95	6,12	5,57	3,59	3,12
	6.	0,15	15,61	22,77	19,77	17,10	9,16	8,56	9,27
	Avg	1,08	13,83	15,18	11,37	11,85	8,26	5,91	4,69
	SD	1,76	5,56	6,85	7,63	5,41	2,88	2,33	2,85

**Table S5.** XPC – Control 1. Raw numerical data of densitometry obtained from Quantity One software. \* rejected values.

		Time [min]							
		0	1	5	15	30	60	90	120
Strand	Data set	Endonuclease activity [%]							
Control 1	1.	0,62	71,04	68,78	61,72	48,16	34,55	30,01	17,16
	2.	8,64	66,97	63,32	54,93	43,37	24,96	18,53	11,46
	3.	7,04	64,27	63,85	57,44	44,03	28,74	5,98*	8,58*
	4.	5,18	53,37	46,01	46,36	40,94	34,45	30,64	26,27
	5.	0,97	63,01	54,92	57,99	46,49	40,74	31,34	19,44
	6.	0,57	65,40	54,26	52,19	43,80	39,13	40,61	31,96
	Avg	3,84	64,01	58,52	55,11	44,47	33,76	30,22	21,26
SD	3,59	5,91	8,30	5,34	2,53	6,02	7,85	8,00	

		Time [min]							
		0	1	5	15	30	60	90	120
Strand	Data set	Polymerase activity [%]							
Control 1	1.	3,79	8,11	13,72	20,81	34,53	47,47	48,41	48,44
	2.	12,30	12,66	13,46	26,63	41,82	56,56	52,68	47,71
	3.	5,76	14,21	13,38	24,24	36,20	43,08	13,66*	30,34
	4.	9,37	17,26	26,42	27,89	35,74	45,40	42,67	42,45
	5.	5,46	7,86	20,57	20,67	30,83	37,06	48,56	53,82
	6.	4,34	11,17	25,05	26,69	35,78	39,61	38,52	46,32
	Avg	6,84	11,88	18,77	24,49	35,82	44,86	46,17	44,85
SD	3,31	3,63	6,07	3,13	3,54	6,86	5,57	8,00	

		Time [min]							
		0	1	5	15	30	60	90	120
Strand	Data set	Exonuclease activity [%]							
Control 1	1.	0,17	18,73	15,97	17,15	15,98	9,89	9,77	4,84
	2.	1,85	18,27	22,49	18,30	13,50	7,33	7,54	5,38
	3.	1,25	16,72	19,90	16,78	15,21	10,72	1,72	2,92
	4.	0,69	23,06	26,55	25,57	22,52	15,36	19,13	16,06
	5.	0,01	19,01	23,40	20,15	21,14	18,88	12,75	7,73
	6.	0,07	20,37	19,68	20,74	19,47	18,76	19,91	16,43
	Avg	0,67	19,36	21,33	19,78	17,97	13,49	11,80	8,89
SD	0,75	2,16	3,65	3,25	3,60	4,87	6,99	5,90	

**Table S6.** Xrs5 - ScdA. Raw numerical data of densitometry obtained from Quantity One software.

xrs5 / ScdA		Time [min]							
		0	1	5	15	30	60	90	120
Strand	Data set	Endonuclease activity [%]							
dU0	1.	19,35	90,09	86,84	86,76	86,88	86,48	83,78	80,59
	2.	16,68	74,70	72,80	68,97	63,98	63,69	60,44	56,61
	3.	0,61	73,44	73,08	68,24	62,93	60,14	62,70	58,25
	Avg	12,21	79,41	77,57	74,66	71,26	70,11	68,97	65,15
	SD	10,14	9,27	8,03	10,49	13,53	14,29	12,88	13,40
dU-1	1.	2,02	73,91	62,55	30,61	19,89	17,80	16,37	16,80
	2.	2,77	55,27	48,63	44,29	36,96	29,70	27,72	25,56
	3.	0,51	43,55	40,38	31,86	27,36	21,89	18,17	17,11
	Avg	1,77	57,58	50,52	35,58	28,07	23,13	20,75	19,82
	SD	1,15	15,31	11,21	7,56	8,56	6,04	6,10	4,97
dU-4	1.	7,72	83,54	85,31	87,27	83,07	54,26	37,25	32,04
	2.	17,91	86,88	76,85	57,37	39,12	2,95	1,49	2,29
	3.	0,23	66,64	64,83	41,88	23,87	14,27	8,97	8,64
	Avg	8,62	79,02	75,66	62,17	48,69	23,83	15,90	14,33
	SD	8,87	10,85	10,29	23,08	30,74	26,96	18,86	15,67
dU+1	1.	13,15	83,27	86,84	70,91	58,91	36,19	13,76	5,43
	2.	29,74	55,38	51,46	48,97	42,01	30,36	21,76	23,78
	3.	0,97	74,23	70,84	60,04	38,76	20,43	11,20	3,52
	Avg	14,62	70,96	69,71	59,98	46,56	28,99	15,57	10,91
	SD	14,44	14,23	17,72	10,97	10,82	7,97	5,51	11,19
dU+4	1.	0,14	24,44	77,11	78,71	57,71	29,69	10,82	4,62
	2.	0,32	40,38	48,53	45,09	34,97	22,25	13,42	20,87
	3.	0,91	54,80	71,78	50,71	37,18	14,35	7,06	2,38
	Avg	0,46	39,87	65,80	58,17	43,29	22,10	10,43	9,29
	SD	0,41	15,18	15,20	18,01	12,54	7,67	3,20	10,09

xrs5 / ScdA		Time [min]							
		0	1	5	15	30	60	90	120
Strand	Data set	Polymerase activity [%]							
dU0	1.	3,51	0,57	0,57	0,46	0,46	0,77	0,84	0,54
	2.	2,29	2,11	1,92	1,85	2,38	2,95	2,45	1,77
	3.	3,42	3,23	2,34	2,93	1,91	1,55	1,65	1,12
	Avg	3,07	1,97	1,61	1,75	1,58	1,76	1,65	1,14
	SD	0,68	1,34	0,92	1,24	1,00	1,10	0,80	0,62
dU-1	1.	0,73	8,57	25,18	62,55	73,30	67,09	57,36	43,49
	2.	2,44	11,95	32,78	46,06	55,19	51,89	41,64	42,23
	3.	3,12	18,51	33,64	42,81	47,41	45,91	39,54	35,57
	Avg	2,10	13,01	30,54	50,47	58,63	54,96	46,18	40,43
	SD	1,23	5,05	4,65	10,58	13,28	10,92	9,74	4,26
dU-4	1.	0,40	6,53	8,25	7,13	9,81	24,34	26,62	25,39
	2.	3,62	8,65	22,65	41,85	55,01	59,10	54,61	23,76
	3.	0,08	16,25	28,28	53,39	65,25	61,26	56,38	36,14
	Avg	1,37	10,47	19,73	34,12	43,36	48,24	45,87	28,43
	SD	1,95	5,11	10,33	24,08	29,50	20,72	16,70	6,73

dU+1	1.	1,32	1,26	1,10	0,37	0,29	0,09	0,04	0,02
	2.	0,10	0,01	0,00	1,28	0,56	0,41	0,38	0,10
	3.	1,60	3,23	1,48	2,32	0,60	0,36	0,02	0,00
	Avg	1,01	1,50	0,86	1,32	0,48	0,29	0,15	0,04
	SD	0,80	1,63	0,77	0,98	0,17	0,17	0,20	0,06
dU+4	1.	0,26	1,41	4,62	10,61	20,73	24,14	14,38	6,83
	2.	1,32	17,40	22,52	28,73	28,99	19,57	17,44	40,90
	3.	1,46	5,02	9,14	20,61	20,73	16,36	13,18	5,26
	Avg	1,01	7,94	12,09	19,98	23,49	20,03	15,00	17,66
	SD	0,65	8,38	9,31	9,08	4,77	3,91	2,20	20,14

xrs5 / ScdA		Time [min]							
		0	1	5	15	30	60	90	120
Strand	Data set	Exonuclease activity [%]							
dU0	1.	1,05	8,38	12,34	12,73	12,62	12,69	15,27	18,76
	2.	0,68	21,55	24,82	28,59	32,97	32,58	35,98	40,18
	3.	0,08	19,86	24,20	28,75	35,09	38,25	35,57	40,57
	Avg	0,60	16,60	20,45	23,36	26,89	27,84	28,94	33,17
	SD	0,49	7,17	7,03	9,20	12,41	13,42	11,84	12,48
dU-1	1.	0,67	7,18	8,52	4,24	2,77	2,04	2,32	2,81
	2.	0,05	9,57	12,55	8,43	5,17	3,05	3,45	3,50
	3.	0,00	17,53	17,90	15,70	13,71	10,20	9,15	8,95
	Avg	0,24	11,43	12,99	9,46	7,22	5,09	4,97	5,09
	SD	0,38	5,42	4,71	5,80	5,75	4,45	3,66	3,36
dU-4	1.	0,00	6,54	4,74	4,32	3,07	0,81	0,53	0,32
	2.	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	3.	0,15	6,42	4,91	2,14	0,26	0,00	0,00	0,00
	Avg	0,05	4,32	3,22	2,15	1,11	0,27	0,18	0,11
	SD	0,08	3,74	2,79	2,16	1,70	0,47	0,31	0,18
dU+1	1.	0,27	6,08	8,55	28,12	40,49	63,47	86,06	94,36
	2.	2,67	18,84	33,57	47,89	56,40	66,04	76,63	75,62
	3.	0,00	10,81	24,20	36,59	59,93	78,91	88,23	95,64
	Avg	0,98	11,91	22,11	37,53	52,28	69,47	83,64	88,54
	SD	1,47	6,45	12,64	9,91	10,36	8,27	6,17	11,21
dU+4	1.	0,00	0,35	4,64	7,70	16,65	33,54	42,11	42,11
	2.	1,04	4,55	15,84	23,45	28,60	35,94	39,34	31,51
	3.	0,66	3,34	10,06	22,99	33,09	50,19	59,52	64,86
	Avg	0,57	2,75	10,18	18,05	26,11	39,89	46,99	46,16
	SD	0,53	2,16	5,60	8,97	8,49	9,00	10,94	17,04

**Table S7.** Xrs5 - RcdA. Raw numerical data of densitometry obtained from Quantity One software.

xrs5 / RcdA		Time [min]							
		0	1	5	15	30	60	90	120
Strand	Data set	Endonuclease activity [%]							
dU0	1.	77,10	82,72	78,23	71,76	69,85	65,84	62,61	59,21
	2.	0,86	64,58	64,30	60,99	57,99	57,60	55,85	53,80
	3.	0,87	60,76	59,46	59,11	58,90	52,00	51,59	56,45
	Avg	26,28	69,35	67,33	63,95	62,25	58,48	56,68	56,49
	SD	44,01	11,73	9,75	6,82	6,60	6,96	5,56	2,71
dU-1	1.	56,57	57,45	53,38	41,19	30,18	30,37	24,58	18,89
	2.	0,80	40,81	35,30	30,70	26,25	22,98	18,25	12,49
	3.	0,43	37,42	37,79	34,04	33,31	28,89	23,61	17,47
	Avg	19,27	45,23	42,16	35,31	29,91	27,41	22,15	16,28
	SD	32,31	10,72	9,80	5,36	3,54	3,91	3,41	3,36
dU-4	1.	47,73	52,83	54,21	58,37	59,42	38,91	47,36	35,47
	2.	3,70	62,81	59,31	49,05	28,72	11,02	8,84	8,56
	3.	14,30	65,76	69,75	72,18	69,56	56,72	60,00	56,84
	Avg	21,91	60,47	61,09	59,87	52,57	35,55	38,73	33,62
	SD	22,98	6,78	7,92	11,64	21,27	23,04	26,65	24,19
dU+1	1.	74,57	83,80	77,65	66,67	52,03	30,01	15,84	11,99
	2.	3,82	56,35	53,19	43,36	35,70	7,96	11,86	4,42
	3.	3,55	51,54	46,23	40,84	32,56	19,07	12,63	7,56
	Avg	27,32	63,89	59,02	50,29	40,10	19,02	13,44	7,99
	SD	40,93	17,41	16,50	14,24	10,45	11,03	2,11	3,80
dU+4	1.	79,15	23,87	63,19	47,15	25,69	5,70	4,28	3,68
	2.	1,61	44,04	46,27	38,04	23,09	8,87	4,17	1,20
	3.	1,70	37,45	43,58	39,64	30,98	13,67	5,16	1,00
	Avg	27,49	40,74	51,01	41,61	26,59	9,41	4,54	1,96
	SD	44,74	4,66	10,63	4,86	4,02	4,01	0,54	1,49

xrs5 / RcdA		Time [min]							
		0	1	5	15	30	60	90	120
Strand	Data set	Polymerase activity [%]							
dU0	1.	0,72	0,96	0,90	2,55	3,06	2,63	1,97	2,52
	2.	0,79	1,93	0,79	0,52	0,67	0,32	0,28	0,19
	3.	1,13	3,06	2,62	3,09	2,90	2,86	1,09	1,58
	Avg	0,88	1,98	1,43	2,05	2,21	1,93	1,12	1,43
	SD	0,22	1,05	1,03	1,35	1,34	1,40	0,85	1,17
dU-1	1.	12,95	13,85	24,48	44,69	57,71	53,36	45,87	36,91
	2.	4,03	17,03	30,23	37,69	42,23	39,43	34,11	18,66
	3.	1,80	26,13	31,69	35,30	37,10	40,32	29,96	25,60
	Avg	6,26	19,00	28,80	39,23	45,68	44,37	36,65	27,06
	SD	5,90	6,37	3,82	4,88	10,73	7,80	8,25	9,21
dU-4	1.	2,92	5,29	7,42	9,29	25,38	32,42	23,51	28,72
	2.	0,00	0,00	37,19	48,93	62,91	67,89	64,34	63,14
	3.	2,35	11,91	10,70	16,06	19,62	20,89	19,23	14,70
	Avg	1,75	5,73	18,44	24,76	35,97	40,40	35,70	35,52
	SD	1,55	5,97	16,32	21,20	23,51	24,49	24,90	24,92

dU+1	1.	0,51	0,90	0,46	0,45	0,21	0,08	0,06	0,08
	2.	4,79	12,70	8,88	3,88	4,40	0,34	0,63	0,25
	3.	4,64	11,03	10,45	7,58	4,55	1,29	0,48	0,03
	Avg	3,31	8,21	6,60	3,97	3,05	0,57	0,39	0,12
	SD	2,43	6,39	5,37	3,57	2,46	0,64	0,29	0,12
dU+4	1.	2,96	0,27	12,43	28,24	37,83	19,92	14,88	21,45
	2.	5,48	9,22	15,94	26,14	30,86	25,74	18,46	8,71
	3.	6,01	16,93	21,52	30,81	32,64	25,37	17,67	17,66
	Avg	4,82	13,08	16,63	28,40	33,78	23,68	17,00	15,94
	SD	1,63	5,45	4,58	2,34	3,63	3,26	1,88	6,54

xrs5 / RcdA		Time [min]							
		0	1	5	15	30	60	90	120
Strand	Data set	Exonuclease activity [%]							
dU0	1.	21,94	15,97	20,63	25,11	25,08	27,57	30,75	34,10
	2.	0,14	30,45	33,27	38,38	41,23	41,94	43,65	45,81
	3.	0,15	32,18	37,23	37,68	37,98	44,93	47,31	41,71
	Avg	7,41	26,20	30,38	33,72	34,76	38,15	40,57	40,54
	SD	12,59	8,90	8,67	7,47	8,54	9,28	8,70	5,94
dU-1	1.	29,03	21,51	19,73	11,41	7,44	7,39	8,96	8,92
	2.	0,00	15,92	22,07	20,34	17,45	16,13	13,39	12,93
	3.	0,06	25,22	23,78	21,98	18,85	14,84	18,00	14,22
	Avg	9,70	20,88	21,86	17,91	14,58	12,78	13,45	12,03
	SD	16,74	4,68	2,03	5,69	6,22	4,72	4,52	2,77
dU-4	1.	48,86	39,62	37,32	30,37	5,98	1,74	2,83	1,91
	2.	1,00	2,73	3,50	2,02	0,49	0,06	0,00	0,05
	3.	4,05	17,98	17,93	8,84	2,24	0,43	0,27	0,20
	Avg	17,97	20,11	19,58	13,74	2,90	0,74	1,04	0,72
	SD	26,80	18,54	16,97	14,80	2,81	0,89	1,56	1,03
dU+1	1.	24,28	11,31	20,27	32,32	47,17	69,54	83,86	87,59
	2.	0,00	24,51	35,08	51,80	59,21	91,45	87,05	94,66
	3.	0,28	33,01	42,35	51,21	62,67	79,54	86,85	91,93
	Avg	8,19	22,94	32,57	45,11	56,35	80,18	85,92	91,40
	SD	13,94	10,93	11,26	11,08	8,13	10,97	1,79	3,56
dU+4	1.	5,38	0,98	11,01	21,41	29,54	41,82	50,69	48,70
	2.	0,26	9,60	15,76	28,18	36,20	47,02	53,59	59,85
	3.	0,00	8,81	15,39	25,97	30,83	44,93	58,96	39,75
	Avg	1,88	9,20	14,05	25,18	32,19	44,59	54,42	49,43
	SD	3,03	0,56	2,64	3,45	3,53	2,62	4,20	10,07

**Table S8.** BJ - ScdA. Raw numerical data of densitometry obtained from Quantity One software. \* rejected values, \*\* not applicable.

BJ / ScdA		Time [min]							
		0	1	5	15	30	60	90	120
Strand	Data set	Endonuclease activity [%]							
dU0	1.	1,31	87,04	83,06	77,28	71,67	68,00	70,11	71,58
	2.	1,94	77,98	73,56	64,58	61,45	59,77	59,80	60,53
	3.	0,85	67,21	59,78	59,82	55,63	54,76	55,56	61,65
	Avg	1,37	77,41	72,13	67,23	62,92	60,84	61,82	64,59
	SD	0,55	9,93	11,70	9,02	8,12	6,69	7,49	6,08
dU-1	1.	0,10	81,64	69,42	47,13	31,39	21,53	20,16	13,89
	2.	1,12	58,11	58,24	44,08	35,54	29,85	22,77	22,73
	3.	**	**	**	**	**	**	**	**
	Avg	0,61	69,87	63,83	45,60	33,46	25,69	21,47	18,31
	SD	0,72	16,64	7,91	2,16	2,94	5,89	1,85	6,25
dU-4	1.	0,23	85,91	82,53	62,25	44,40	11,41	11,83	5,87
	2.	1,47	75,18	71,83	60,67	42,19	10,80	4,02	7,45
	3.	**	**	**	**	**	**	**	**
	Avg	0,85	80,54	77,18	61,46	43,29	11,11	7,92	6,66
	SD	0,88	7,59	7,57	1,12	1,56	0,43	5,52	1,12
dU+1	1.	0,14	81,04	83,48	70,53	53,36	28,74	13,73	7,18
	2.	0,86	76,30	76,87	65,84	49,70	29,18	14,58	5,76
	3.	**	**	**	**	**	**	**	**
	Avg	0,50	78,67	80,17	68,18	51,53	28,96	14,16	6,47
	SD	0,51	3,35	4,67	3,32	2,59	0,31	0,60	1,00
dU+4	1.	0,49	56,07	76,66	71,32	8,68*	27,68	15,03	11,98
	2.	0,31	50,01	81,50	67,04	53,48	34,27	22,42	16,23
	3.	**	**	**	**	**	**	**	**
	Avg	0,40	53,04	79,08	69,18	53,48	30,97	18,72	14,11
	SD	0,12	4,28	3,42	3,02	0,00	4,66	5,22	3,01

BJ / ScdA		Time [min]							
		0	1	5	15	30	60	90	120
Strand	Data set	Polymerase activity [%]							
dU0	1.	0,00	1,77	2,45	3,39	4,12	4,15	3,28	4,48
	2.	5,17	2,89	3,94	6,89	6,14	5,57	7,13	6,49
	3.	1,16	8,36	8,39	7,80	8,64	6,78	8,28	2,86
	Avg	2,11	4,34	4,93	6,03	6,30	5,50	6,23	4,61
	SD	2,71	3,52	3,09	2,33	2,26	1,31	2,62	1,82
dU-1	1.	0,25	3,52	19,07	44,70	59,15	72,71	73,58	83,36
	2.	0,84	7,58	25,30	39,43	43,52	54,72	67,92	66,63
	3.	**	**	**	**	**	**	**	**
	Avg	0,55	5,55	22,18	42,06	51,33	63,71	70,75	74,99
	SD	0,42	2,87	4,41	3,72	11,05	12,72	4,00	11,82
dU-4	1.	0,00	8,30	14,22	35,03	53,79	71,08	86,67	91,82
	2.	2,27	10,28	17,16	35,74	55,27	87,19	94,24	90,82
	3.	**	**	**	**	**	**	**	**
	Avg	1,13	9,29	15,69	35,39	54,53	79,14	90,46	91,32
	SD	1,60	1,40	2,08	0,50	1,05	11,40	5,35	0,71
dU+1	1.	0,90	2,80	1,99	2,26	1,42	0,95	0,60	0,32

	2.	0,97	1,83	2,14	2,03	0,85	0,35	0,23	0,96
	3.	**	**	**	**	**	**	**	**
	Avg	0,93	2,32	2,07	2,15	1,14	0,65	0,41	0,64
	SD	0,05	0,68	0,10	0,17	0,40	0,42	0,26	0,45
	dU+4	1.	2,93	4,03	5,17	13,79	11,17	22,47	21,93
	2.	0,96	2,44	6,44	13,98	15,77	20,84	20,49	22,65
	3.	**	**	**	**	**	**	**	**
	Avg	1,94	3,23	5,81	13,89	13,47	21,65	21,21	23,43
	SD	1,39	1,12	0,90	0,14	3,25	1,15	1,02	1,11

BJ / ScdA		Time [min]							
		0	1	5	15	30	60	90	120
Strand	Data set	Exonuclease activity [%]							
dU0	1.	0,00	8,97	14,06	18,99	24,02	27,68	26,42	23,45
	2.	0,00	18,70	22,37	28,40	32,33	34,56	32,96	32,61
	3.	0,09	22,87	31,34	32,31	35,71	38,43	36,07	35,38
	Avg	0,03	16,84	22,59	26,56	30,69	33,56	31,82	30,48
	SD	0,05	7,13	8,64	6,84	6,01	5,44	4,93	6,24
dU-1	1.	0,00	7,69	9,35	7,58	8,40	5,29	5,72	1,91
	2.	0,00	6,99	12,88	15,38	20,01	14,37	8,44	8,73
	3.	**	**	**	**	**	**	**	**
	Avg	0,00	7,34	11,11	11,48	14,20	9,83	7,08	5,32
	SD	0,00	0,50	2,50	5,52	8,21	6,42	1,92	4,82
dU-4	1.	0,00	1,14	2,03	2,02	0,86	0,00	0,00	0,00
	2.	0,28	7,11	9,33	2,65	1,62	0,76	0,42	0,06
	3.	**	**	**	**	**	**	**	**
	Avg	0,14	4,12	5,68	2,33	1,24	0,38	0,21	0,03
	SD	0,20	4,22	5,17	0,44	0,54	0,54	0,29	0,04
dU+1	1.	0,00	0,91	8,79	24,45	44,09	69,55	84,97	91,45
	2.	0,00	11,59	16,57	30,37	48,61	70,04	84,69	60,40
	3.	**	**	**	**	**	**	**	**
	Avg	0,00	6,25	12,68	27,41	46,35	69,79	84,83	75,92
	SD	0,00	7,55	5,50	4,18	3,19	0,34	0,20	21,95
dU+4	1.	0,00	2,68	4,45	11,87	12,05	46,64	59,78	59,39
	2.	0,00	0,57	5,94	16,33	26,91	40,73	51,95	50,21
	3.	**	**	**	**	**	**	**	**
	Avg	0,00	1,62	5,19	14,10	19,48	43,69	55,87	54,80
	SD	0,00	1,49	1,05	3,16	10,51	4,18	5,54	6,49



**Table S9.** BJ - RcdA. Raw numerical data of densitometry obtained from Quantity One software. \* rejected values.

BJ / RcdA		Time [min]							
		0	1	5	15	30	60	90	120
Strand	Data set	Endonuclease activity [%]							
dU0	1.	0,56	77,63	72,38	67,39	60,48	60,06	63,86	65,59
	2.	0,37	89,00	84,93	77,88	70,97	69,55	67,17	66,51
	3.	0,25	77,19	78,91	70,46	72,99	68,81	68,32	72,29
	Avg	0,39	81,27	78,74	71,91	68,15	66,14	66,45	68,13
	SD	0,16	6,70	6,28	5,39	6,72	5,28	2,32	3,63
dU-1	1.	0,28	69,62	58,90	48,20	33,04	25,69	21,25	18,72
	2.	0,41	66,00	59,77	54,08	43,00	34,20	30,28	35,03
	3.	0,54	68,22	59,01	48,05	38,02	29,97	27,70	25,33
	Avg	0,41	67,95	59,22	50,11	38,02	29,95	26,41	26,36
	SD	0,13	1,82	0,47	3,44	4,98	4,25	4,65	8,21
dU-4	1.	0,00	82,27	62,31	56,94	53,09	38,21	17,81	8,58
	2.	2,49	89,11	83,24	56,19	24,74	14,08	3,55	5,90
	3.	5,80	85,44	82,95	64,18	37,46	11,27	9,38	10,72
	Avg	2,76	85,61	76,17	59,10	38,43	21,19	10,25	8,40
	SD	2,91	3,42	12,00	4,41	14,20	14,81	7,17	2,41
dU+1	1.	0,68	79,72	77,63	65,63	59,92	36,50	20,98	11,27
	2.	0,56	73,12	72,09	57,08	54,90	32,81	22,69	12,84
	3.	0,59	78,38	72,64	59,56	46,54	34,55	22,57	12,05
	Avg	0,61	77,07	74,12	60,75	53,79	34,62	22,08	12,05
	SD	0,06	3,49	3,05	4,40	6,76	1,84	0,95	0,79
dU+4	1.	3,02	4,62*	4,58*	6,60*	37,10	39,81	36,13	34,29
	2.	0,85	66,97	72,19	60,99	45,74	25,52	15,34	10,91
	3.	1,09	68,17	69,61	56,24	39,81	25,64	13,88	9,53
	Avg	1,65	67,570	70,90	58,61	40,88	30,33	21,79	18,24
	SD	1,19	0,85	1,83	3,36	4,42	8,21	12,45	13,92

BJ / RcdA		Time [min]							
		0	1	5	15	30	60	90	120
Strand	Data set	Polymerase activity [%]							
dU0	1.	2,04	1,74	3,92	3,83	5,25	7,09	4,84	3,31
	2.	2,41	1,85	1,61	3,89	6,07	5,27	5,44	3,56
	3.	0,59	2,87	5,89	8,20	4,93	7,51	6,35	6,85
	Avg	1,68	2,15	3,81	5,31	5,41	6,62	5,55	4,57
	SD	0,96	0,62	2,14	2,51	0,59	1,19	0,76	1,97
dU-1	1.	0,77	14,06	23,89	35,60	54,72	63,36	70,53	75,03
	2.	1,28	15,93	20,63	30,10	44,65	56,80	62,50	60,42
	3.	0,94	14,93	25,32	37,81	50,90	60,69	64,67	67,26
	Avg	1,00	14,97	23,28	34,50	50,09	60,28	65,90	67,57
	SD	0,26	0,93	2,40	3,97	5,09	3,30	4,15	7,31
dU-4	1.	3,09	12,40	32,26	37,35	43,62	59,91	80,59	89,53
	2.	3,01	5,57	5,01*	39,97	72,15	83,05	93,62	91,48
	3.	6,11	7,91	10,00	32,09	59,64	86,95	89,17	87,69
	Avg	4,07	8,63	21,13	36,47	58,471	76,64	87,80	89,56
	SD	1,77	3,47	15,74	4,01	14,30	14,62	6,62	1,89
dU+1	1.	2,32	4,67	4,60	2,32	2,49	0,45	0,24	0,07

	2.	1,51	5,74	7,53	3,98	2,34	0,65	0,92	0,41
	3.	2,75	5,22	4,01	2,83	1,15	0,89	0,67	0,57
	Avg	2,19	5,21	5,38	3,04	1,99	0,66	0,61	0,35
	SD	0,63	0,53	1,88	0,85	0,73	0,22	0,34	0,25
dU+4	1.	7,05	8,86	8,45	9,08	14,25	12,38	10,97	13,87
	2.	4,18	11,22	15,84	22,54	31,30	37,56	39,92	44,23
	3.	5,15	9,01	15,77	20,92	26,96	30,83	31,46	34,10
	Avg	5,46	9,70	13,35	17,51	24,17	26,92	27,45	30,73
	SD	1,46	1,32	4,24	7,35	8,87	13,03	14,89	15,46

BJ / RcdA		Time [min]							
		0	1	5	15	30	60	90	120
Strand	Data set	Exonuclease activity [%]							
dU0	1.	0,15	20,04	23,36	28,78	34,22	32,82	31,27	30,94
	2.	0,00	8,24	13,27	18,20	22,82	25,03	27,07	29,08
	3.	0,04	11,38	15,04	21,26	22,02	23,62	25,22	20,73
	Avg	0,06	13,22	17,22	22,74	26,35	27,16	27,86	26,92
	SD	0,07	6,11	5,39	5,45	6,82	4,95	3,10	5,44
dU-1	1.	0,00	13,07	16,74	15,98	12,04	10,77	8,02	5,78
	2.	0,15	15,23	18,28	15,53	12,16	8,73	6,82	3,91
	3.	0,14	12,97	13,72	13,58	10,66	8,88	7,10	6,75
	Avg	0,10	13,76	16,24	15,03	11,62	9,46	7,32	5,48
	SD	0,08	1,27	2,32	1,27	0,83	1,13	0,63	1,44
dU-4	1.	0,00	3,32	4,17	3,89	2,76	0,52	0,00	0,00
	2.	0,83	3,58	11,29	3,20	1,41	0,67	0,16	0,09
	3.	1,44	5,37	6,55	3,43	2,55	1,00	0,48	0,27
	Avg	0,76	4,09	7,34	3,51	2,24	0,73	0,21	0,12
	SD	0,72	1,12	3,63	0,35	0,72	0,24	0,25	0,14
dU+1	1.	0,00	12,45	16,33	31,25	28,56	62,68	78,53	88,42
	2.	0,15	18,92	19,65	38,45	42,51	66,32	76,12	86,55
	3.	0,21	14,51	22,15	36,82	51,81	64,15	76,44	87,09
	Avg	0,12	15,29	19,38	35,51	40,96	64,38	77,03	87,35
	SD	0,11	3,31	2,92	3,78	11,70	1,83	1,31	0,97
dU+4	1.	0,12	0,50*	0,59*	1,06*	26,07	46,86	52,54	51,24
	2.	0,20	1,97	6,85	14,89	20,91	33,79	40,89	40,86
	3.	0,55	6,30	10,28	20,75	30,68	40,79	51,94	52,76
	Avg	0,29	4,14	8,57	17,82	25,89	40,48	48,46	48,29
	SD	0,23	3,06	2,42	4,14	4,89	6,54	6,56	6,48

**Table S10.** XPC - ScdA. Raw numerical data of densitometry obtained from Quantity One software. \* rejected values.

XPC / ScdA		Time [min]							
		0	1	5	15	30	60	90	120
Strand	Data set	Endonuclease activity [%]							
dU0	1.	0,20	69,78	66,83	61,13	54,39	49,94	53,49	56,75
	2.	0,91	75,22	69,48	60,91	60,50	57,54	59,56	59,62
	3.	1,01	70,81	66,00	61,21	53,36	56,94	57,29	57,72
	Avg	0,71	71,94	67,43	61,09	56,08	54,81	56,78	58,03
	SD	0,44	2,89	1,82	0,16	3,86	4,23	3,07	1,46
dU-1	1.	0,16	41,25	52,10	44,45	38,49	35,87	35,27	28,64
	2.	0,18	61,42	58,36	44,75	35,23	29,25	31,77	28,01
	3.	0,61	71,84	65,65	47,68	30,14	23,81	18,65	20,22
	Avg	0,32	58,17	58,70	45,63	34,62	29,65	28,56	25,62
	SD	0,25	15,55	6,78	1,79	4,21	6,04	8,76	4,69
dU-4	1.	21,85	92,97	96,06	95,36	31,90	15,71	14,10	12,00
	2.	11,43	88,18	88,35	85,04	13,42	6,08	3,73	8,80
	3.	5,02	76,53	75,05	70,08	33,18	12,38	6,65	5,45
	Avg	12,77	85,89	86,49	83,49	26,17	11,39	8,16	8,75
	SD	8,49	8,45	10,63	12,71	11,05	4,89	5,35	3,27
dU+1	1.	0,86	70,50	65,13	56,96	30,78	18,90	8,12	3,94
	2.	2,02	61,05	60,54	50,49	35,03	16,62	11,24	5,11
	3.	3,09	78,17	75,88	63,88	38,38	13,95	6,58	3,41
	Avg	1,99	69,91	67,19	57,11	34,73	16,49	8,64	4,16
	SD	1,12	8,57	7,87	6,70	3,81	2,48	2,38	0,87
dU+4	1.	2,07	63,59	70,35	65,14	44,72	23,07	11,10	5,74
	2.	2,27	53,74	58,25	50,63	39,93	23,88	17,78	12,78
	3.	3,37	82,34	74,55	62,33	39,84	8,28	8,03	5,90
	Avg	2,57	66,561	67,72	59,37	41,50	18,41	12,30	8,14
	SD	0,70	14,53	8,46	7,69	2,79	8,78	4,98	4,02

XPC / ScdA		Time [min]							
		0	1	5	15	30	60	90	120
Strand	Data set	Polymerase activity [%]							
dU0	1.	2,61	8,57	10,36	7,13	5,62	5,60	5,12	4,36
	2.	9,18	6,00	7,37	7,19	4,14	4,31	3,30	3,21
	3.	5,98	9,15	10,87	9,92	6,08	6,44	4,83	4,62
	Avg	5,92	7,91	9,53	8,08	5,28	5,45	4,42	4,06
	SD	3,28	1,68	1,89	1,59	1,01	1,07	0,98	0,75
dU-1	1.	1,51	9,16	23,42	34,32	47,97	51,59	52,75	62,42
	2.	1,98	11,45	23,38	33,47	47,58	58,17	54,16	58,28
	3.	1,74	8,76	18,16	36,15	59,96	69,37	72,70	68,06
	Avg	1,74	9,79	21,65	34,64	51,84	59,71	59,87	62,92
	SD	0,23	1,45	3,02	1,37	7,04	8,99	11,13	4,91
dU-4	1.	2,33	0,10	0,17	1,72	66,19	81,01	83,98	86,05
	2.	10,00*	2,94	3,35	4,66	83,50	91,59	93,80	89,02
	3.	7,62	8,40	12,94	23,53	65,26	85,73	90,92	92,18
	Avg	4,98	3,81	5,48	9,97	71,65	86,11	89,57	89,08
	SD	3,74	4,22	6,65	11,83	10,27	5,30	5,05	3,06
dU+1	1.	2,52	6,45	4,73	3,10	0,80	0,62	0,60	0,77

	2.	3,38	9,83	8,37	5,55	2,44	0,43	0,34	0,20
	3.	9,84	8,00	7,04	4,15	2,16	0,97	0,68	0,58
	Avg	5,25	8,09	6,71	4,27	1,80	0,67	0,54	0,52
	SD	4,00	1,69	1,84	1,23	0,88	0,27	0,18	0,29
dU+4	1.	3,71	7,46	10,47	12,75	14,49	13,26	12,02	10,97
	2.	0,00*	0,02*	9,95	20,50	18,03	13,38	12,58	10,65
	3.	19,32	6,04	12,41	16,09	15,00	7,10	18,16	18,45
	Avg	11,52	6,75	10,94	16,44	15,84	11,25	14,25	13,36
	SD	11,04	1,00	1,30	3,88	1,91	3,59	3,40	4,41

XPC / ScdA		Time [min]							
		0	1	5	15	30	60	90	120
Strand	Data set	Exonuclease activity [%]							
dU0	1.	0,02	19,01	21,95	31,68	39,98	44,46	41,38	38,89
	2.	0,07	15,33	22,46	31,51	35,04	37,81	36,89	36,98
	3.	0,47	10,59	19,05	27,63	39,38	35,98	37,29	36,90
	Avg	0,19	14,98	21,15	30,27	38,13	39,42	38,52	37,59
	SD	0,25	4,22	1,84	2,29	2,70	4,47	2,49	1,13
dU-1	1.	0,04	6,38	20,73	20,44	12,92	11,99	11,37	8,30
	2.	0,01	14,21	14,97	20,61	15,92	11,05	12,54	11,74
	3.	0,14	13,75	13,70	14,16	7,57	5,19	5,13	8,09
	Avg	0,06	11,45	16,47	18,41	12,14	9,41	9,68	9,38
	SD	0,07	4,40	3,75	3,68	4,23	3,69	3,99	2,05
dU-4	1.	1,01	3,35	3,21	2,66	1,13	0,18	0,06	0,07
	2.	0,99	6,30	7,30	9,67	1,95	0,37	0,00	0,00
	3.	2,61	12,80	11,18	6,02	0,56	0,04	0,09	0,00
	Avg	1,54	7,48	7,23	6,12	1,21	0,20	0,05	0,02
	SD	0,93	4,83	3,98	3,50	0,70	0,17	0,05	0,04
dU+1	1.	0,30	13,27	26,25	38,93	67,95	80,14	90,95	94,81
	2.	0,10	11,26	24,42	42,37	62,02	82,72	88,34	94,36
	3.	1,72	7,67	14,90	30,81	58,86	84,72	92,39	95,67
	Avg	0,71	10,73	21,86	37,37	62,94	82,53	90,56	94,95
	SD	0,88	2,84	6,10	5,94	4,61	2,30	2,05	0,67
dU+4	1.	0,67	3,73	11,17	20,46	38,70	61,39	74,27	79,50
	2.	0,09	6,68	13,28	24,79	37,36	58,64	65,98	72,39
	3.	1,13	9,51	7,35	19,39	40,22	76,77	68,50	71,34
	Avg	0,63	6,64	10,60	21,55	38,76	65,60	69,58	74,41
	SD	0,52	2,89	3,01	2,86	1,43	9,77	4,25	4,44

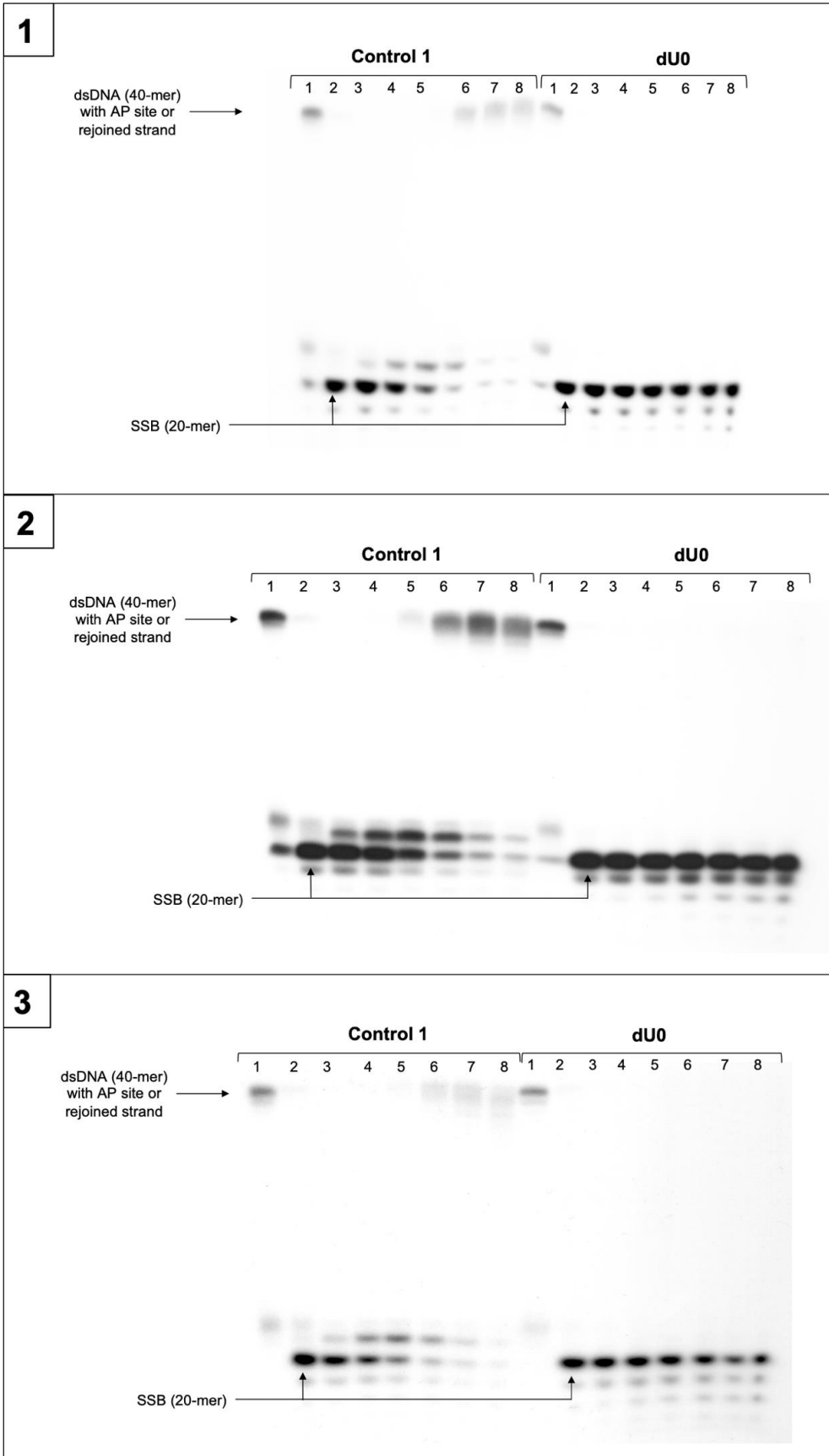
**Table S11.** XPC - RcdA. Raw numerical data of densitometry obtained from Quantity One software. \* rejected values.

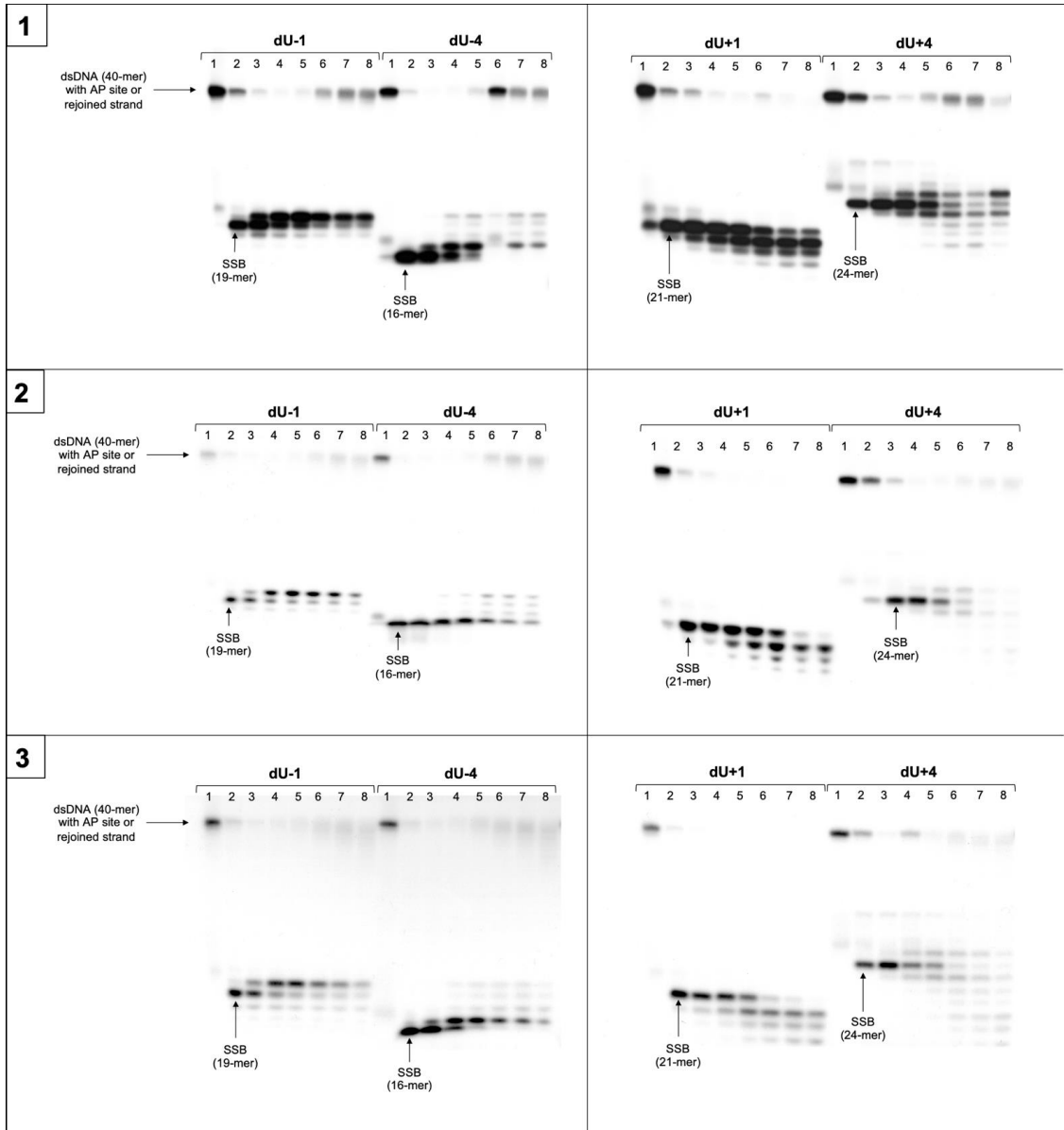
XPC / RcdA		Time [min]							
		0	1	5	15	30	60	90	120
Strand	Data set	Endonuclease activity [%]							
dU0	1.	1,63	55,15	49,25	52,23	49,63	43,79	41,24	40,28
	2.	1,61	65,24	57,65	53,54	47,02	45,36	44,47	40,82
	3.	2,34	62,15	53,37	54,19	54,30	46,96	47,12	46,84
	Avg	1,86	60,85	53,42	53,32	50,32	45,37	44,28	42,65
	SD	0,42	5,17	4,20	1,00	3,69	1,58	2,95	3,64
dU-1	1.	0,58	46,02	67,87	38,43	34,81	28,19	27,98	29,69
	2.	1,04	64,54	72,60	47,67	40,33	28,86	27,32	27,08
	3.	0,99	71,36	76,40	52,53	37,07	27,15	25,96	23,52
	Avg	0,87	60,64	72,29	46,21	37,41	28,07	27,09	26,76
	SD	0,25	13,11	4,27	7,16	2,78	0,86	1,03	3,10
dU-4	1.	8,40	64,60	70,27	45,45	40,11	12,27	16,71	13,59
	2.	3,44	79,59	87,39	83,62*	84,41*	86,52*	87,05*	84,49*
	3.	3,31	78,74	83,15	65,10	33,76	23,59	23,00	8,58
	Avg	5,05	74,31	80,27	55,28	36,93	17,93	19,86	11,09
	SD	2,91	8,42	8,91	13,90	4,49	8,01	4,45	3,55
dU+1	1.	3,51	60,57	79,40	51,45	43,33	27,95	18,15	6,76
	2.	1,46	70,59	80,35	60,36	46,06	22,87	17,03	6,42
	3.	0,00	80,40	92,06	65,05	51,09	1,41*	12,41	3,07
	Avg	1,65	70,52	83,93	58,95	46,83	25,41	15,86	5,42
	SD	1,76	9,91	7,05	6,91	3,94	3,59	3,04	2,04
dU+4	1.	3,94	36,99	83,13	50,32	23,65	19,04	9,66	5,66
	2.	2,23	32,15	84,51	62,04	47,74	41,44	14,20	7,65
	3.	3,81	46,48	92,10	64,33	51,34	4,87*	14,55	5,79
	Avg	3,33	38,54	86,58	58,90	40,91	30,24	12,81	6,37
	SD	0,95	7,29	4,83	7,52	15,06	15,84	2,73	1,12

XPC / RcdA		Time [min]							
		0	1	5	15	30	60	90	120
Strand	Data set	Polymerase activity [%]							
dU0	1.	8,90	8,18	7,71	9,24	6,83	6,00	3,94	2,67
	2.	10,52	7,29	5,58	6,79	5,44	4,60	4,22	2,24
	3.	12,83	11,99	8,37	11,44	9,50	7,53	6,43	4,28
	Avg	10,75	9,15	7,22	9,16	7,26	6,04	4,87	3,06
	SD	1,97	2,50	1,46	2,33	2,07	1,46	1,36	1,08
dU-1	1.	2,68	9,65	17,69	36,21	43,08	50,84	50,33	46,06
	2.	2,40	6,72	16,65	33,59	38,80	51,36	44,87	51,58
	3.	3,45	9,86	15,30	36,21	50,12	62,75	62,96	66,04
	Avg	2,85	8,74	16,55	35,34	44,00	54,98	52,72	54,56
	SD	0,55	1,76	1,20	1,51	5,72	6,73	9,28	10,32
dU-4	1.	15,77	15,89	25,31	50,71	56,93	69,38	81,13	83,24
	2.	3,12	6,50	3,44	4,76	6,24	8,67	11,42	13,08
	3.	5,98	9,81	8,14	29,42	62,21	74,69	75,15	89,91
	Avg	8,29	10,73	12,30	28,30	41,80	50,91	55,90	62,08
	SD	6,64	4,76	11,51	22,99	30,90	36,68	38,64	42,56
dU+1	1.	4,95	8,49	3,22	5,51	2,94	1,00	0,50	0,31

	2.	5,85	6,38	1,75	4,20	1,62	0,69	0,65	0,33
	3.	6,11	8,17	1,19	4,96	1,72	10,53	0,00	3,23
	Avg	5,64	7,68	2,05	4,89	2,09	4,08	0,38	1,29
	SD	0,61	1,14	1,05	0,66	0,73	5,59	0,34	1,68
dU+4	1.	16,21	11,27	6,73	25,19	40,15	27,75	31,64	26,02
	2.	11,18	13,86	8,61	18,04	21,41	21,63	29,84	30,79
	3.	25,56	19,13	6,43	17,73	21,20	26,94	31,77	34,83
	Avg	17,65	14,75	7,26	20,32	27,59	25,44	31,09	30,54
	SD	7,30	4,01	1,18	4,22	10,88	3,33	1,08	4,41

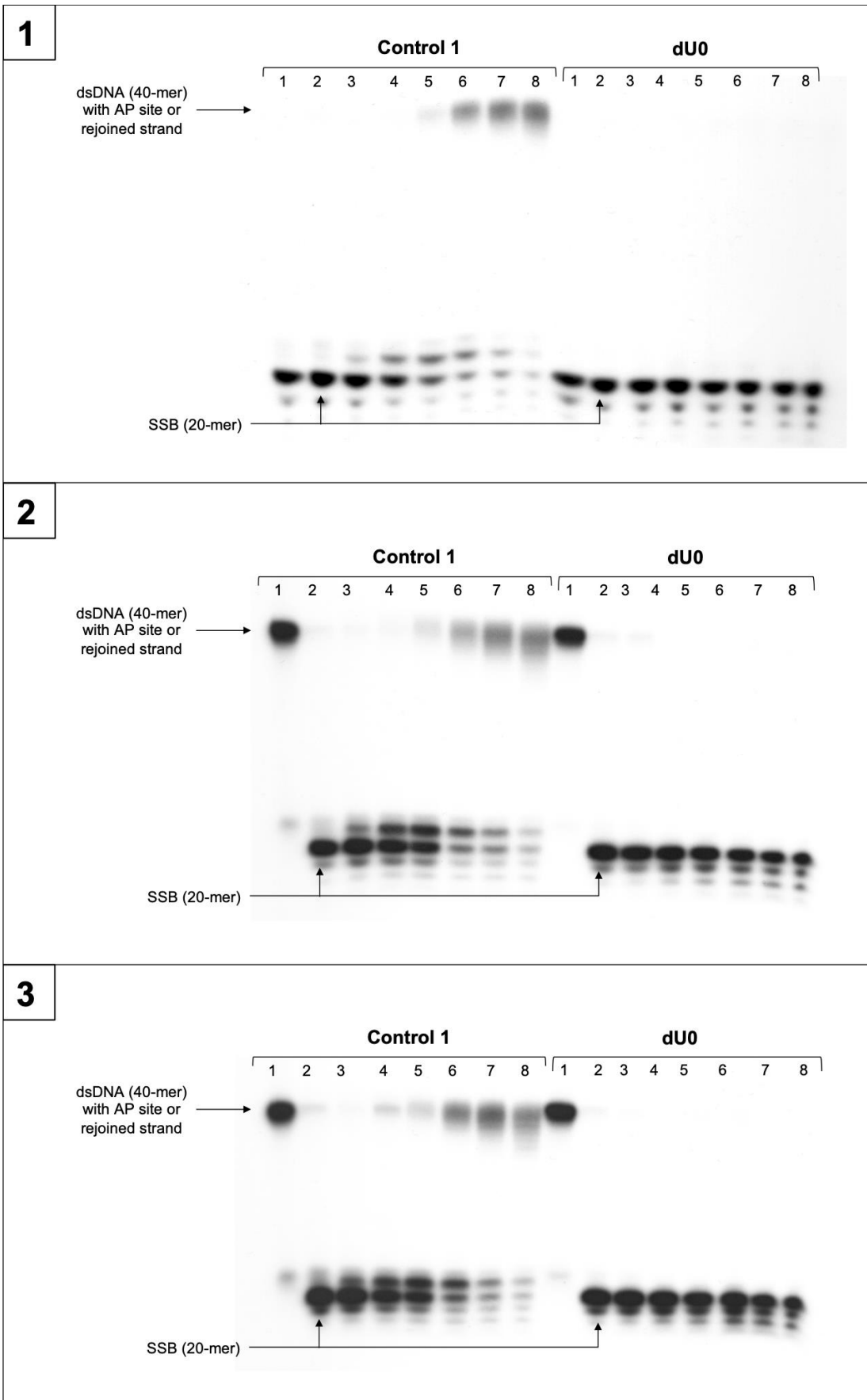
XPC / RcdA		Time [min]							
		0	1	5	15	30	60	90	120
Strand	Data set	Exonuclease activity [%]							
dU0	1.	0,00	26,32	41,98	38,19	43,33	50,07	54,46	56,54
	2.	0,10	16,14	35,56	38,30	45,93	48,60	50,12	55,07
	3.	0,17	19,42	37,96	34,00	36,05	45,40	46,31	48,77
	Avg	0,09	20,63	38,50	36,83	41,77	48,02	50,30	53,46
	SD	0,08	5,20	3,24	2,45	5,12	2,39	4,08	4,13
dU-1	1.	0,23	10,69	13,52	24,63	21,72	20,37	21,15	23,30
	2.	0,08	12,62	10,45	17,07	20,26	19,55	27,62	21,08
	3.	0,00	11,21	7,86	10,96	12,54	9,78	10,65	9,77
	Avg	0,10	11,51	10,61	17,55	18,17	16,57	19,81	18,05
	SD	0,12	1,00	2,83	6,85	4,93	5,89	8,56	7,26
dU-4	1.	6,12	9,76	2,89	2,92	2,15	0,48	0,30	0,22
	2.	2,33	9,13	4,92	11,12	9,06	3,27	1,17	1,48
	3.	2,81	7,63	7,46	5,12	2,16	0,92	1,18	0,00
	Avg	3,75	8,84	5,09	6,39	4,46	1,56	0,89	0,57
	SD	2,06	1,09	2,29	4,25	3,98	1,50	0,50	0,80
dU+1	1.	0,74	13,99	16,37	41,81	52,93	70,68	81,12	92,66
	2.	0,42	8,78	17,17	34,09	52,07	76,25	82,21	93,13
	3.	0,00	4,59	5,77	28,39	46,40	0,00*	87,07	80,48
	Avg	0,39	9,12	13,10	34,76	50,46	73,46	83,47	88,76
	SD	0,37	4,71	6,37	6,73	3,55	3,94	3,16	7,17
dU+4	1.	0,84	1,71	7,54	22,16	25,71	51,65	57,52	67,06
	2.	0,00	1,06	5,38	17,20	29,53	32,84	55,04	60,42
	3.	0,00	0,00	0,00	15,55	24,47	0,00	51,42	55,67
	Avg	0,28	0,92	4,31	18,30	26,57	28,16	54,66	61,05
	SD	0,49	0,86	3,88	3,44	2,64	26,14	3,07	5,73

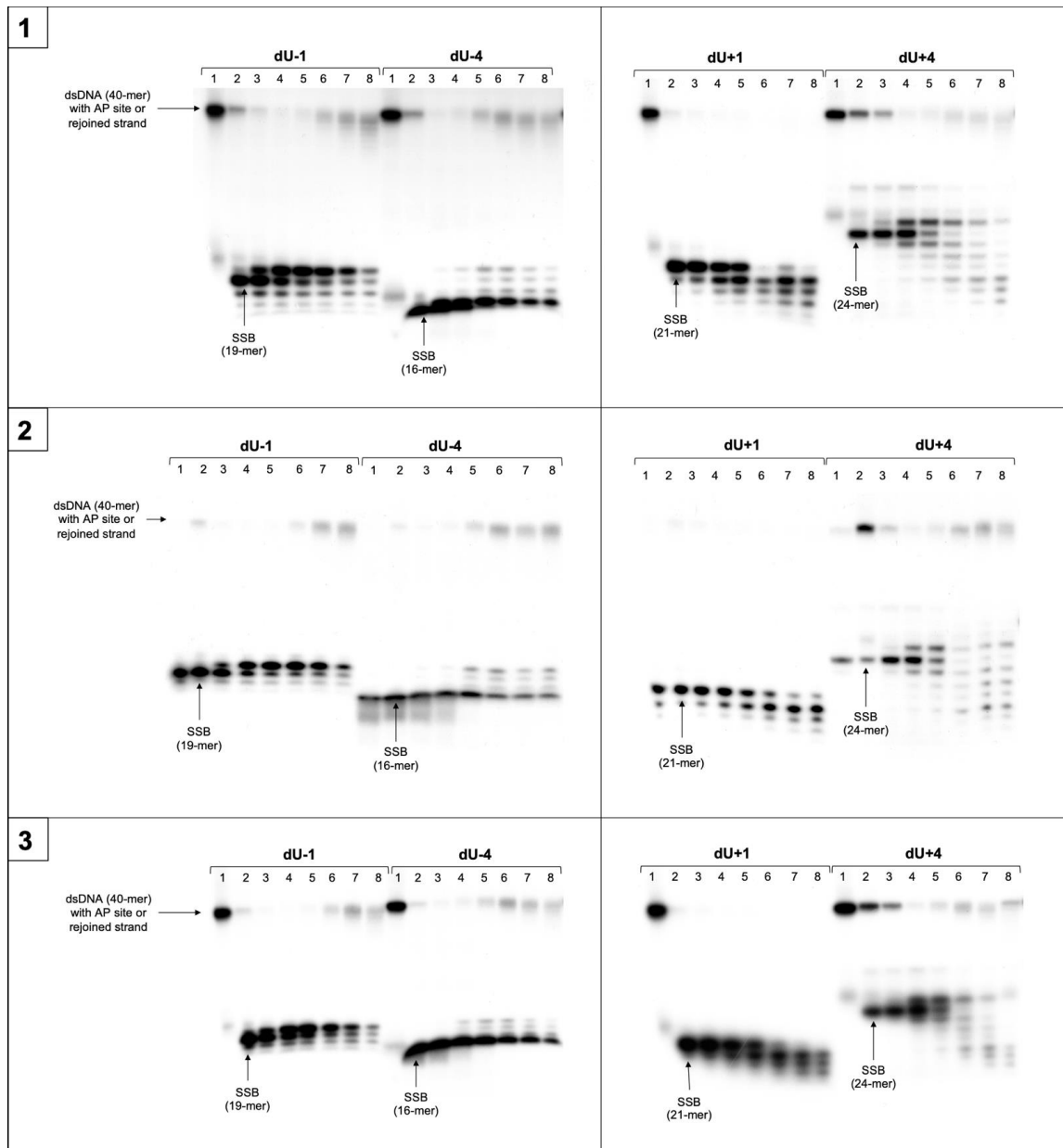




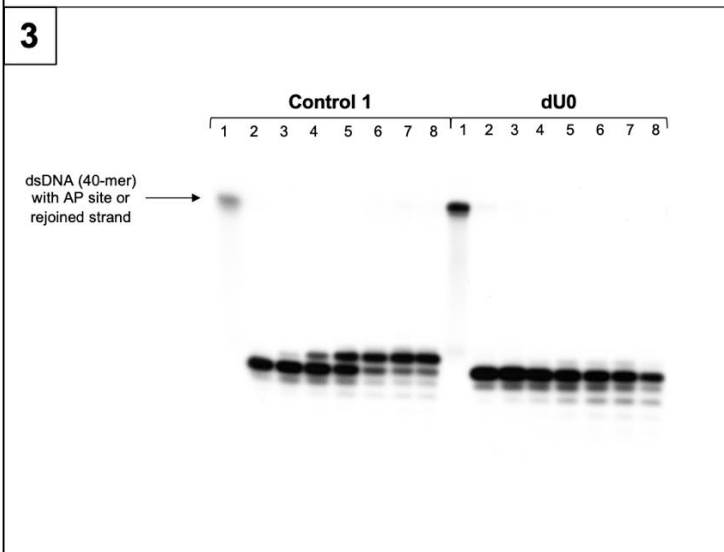
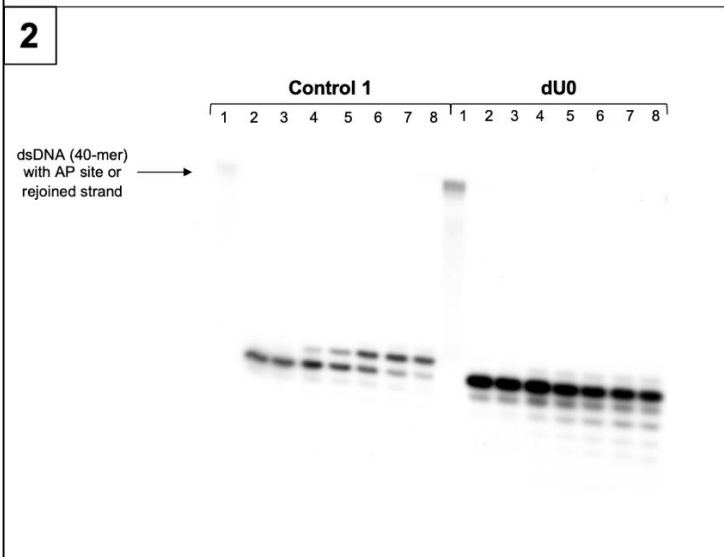
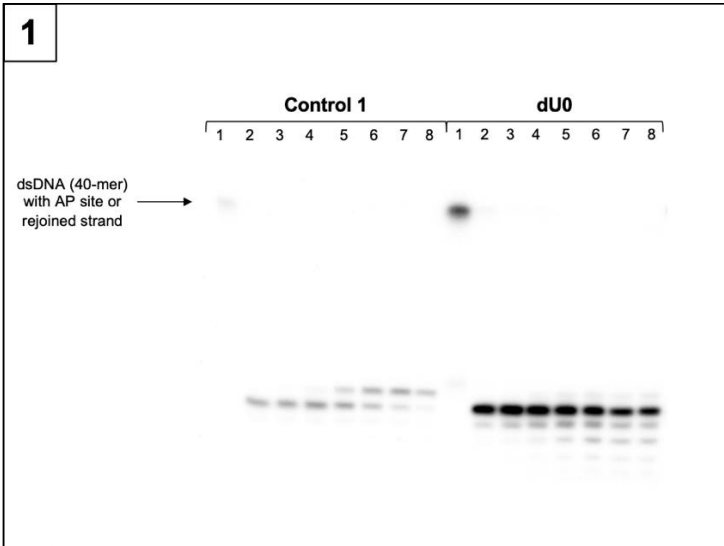
**Figure S4.** The autoradiograms presenting results of Control 1 and ds-CDL containing *ScdA* by *xrs5* Cytoplasmic Extract. Lanes correspond with different assay time: lane 1 - 0 min; lane 2 - 1 min; lane 3 - 5 min; lane 4 - 15 min; lane 5 - 30 min; lane 6 - 60 min; lane 7 - 90 min; lane 8 - 120 min. Three replications of the experiment are shown.

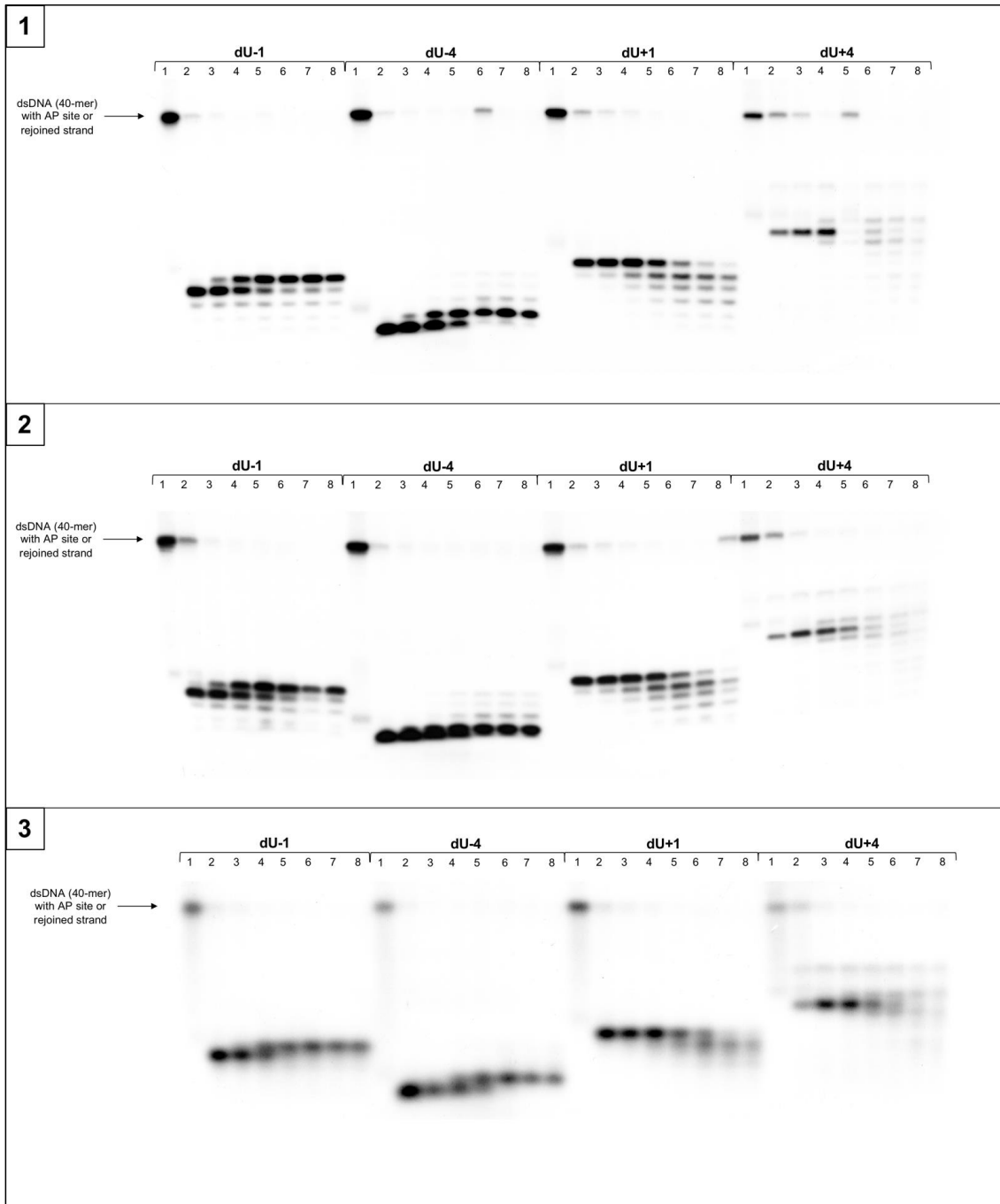






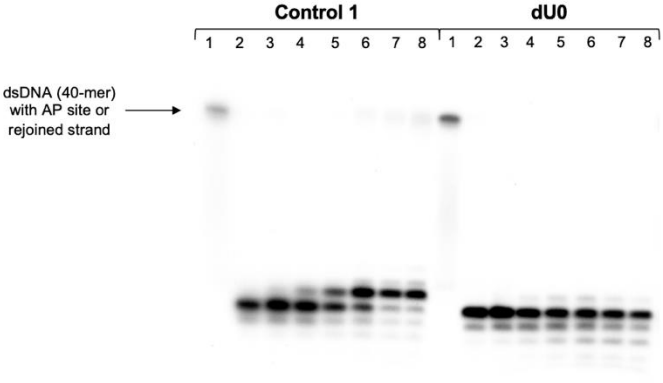
**Figure S5.** The autoradiograms presenting results of Control 1 and ds-CDL containing **RcdA** by *xrs5* Cytoplasmic Extract. Lanes correspond with different assay time: lane 1 - 0 min; lane 2 - 1 min; lane 3 - 5 min; lane 4 - 15 min; lane 5 - 30 min; lane 6 - 60 min; lane 7 - 90 min; lane 8 - 120 min. Three replications of the experiment are shown.



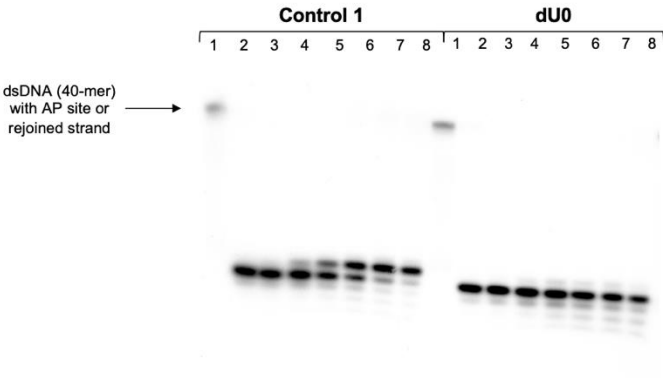


**Figure S6.** The autoradiograms presenting results of Control 1 and ds-CDL containing *ScdA* by BJ Cytoplasmic Extract. Lanes correspond with different assay time: lane 1 - 0 min; lane 2 - 1 min; lane 3 - 5 min; lane 4 - 15 min; lane 5 - 30 min; lane 6 - 60 min; lane 7 - 90 min; lane 8 - 120 min. Three replications of the experiment are shown.

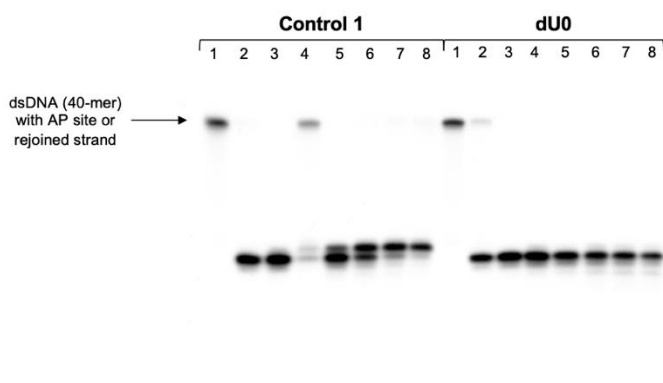
1

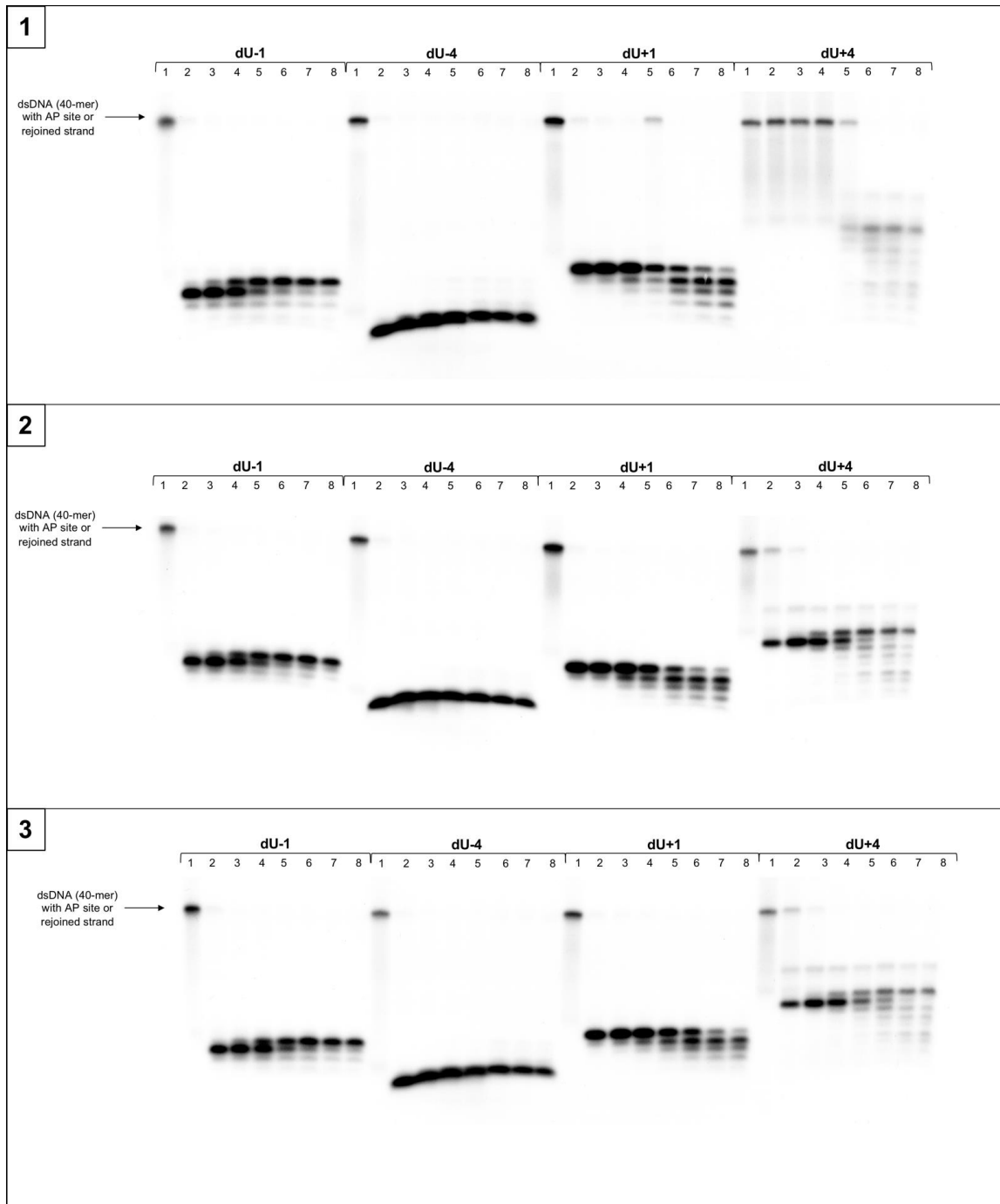


2



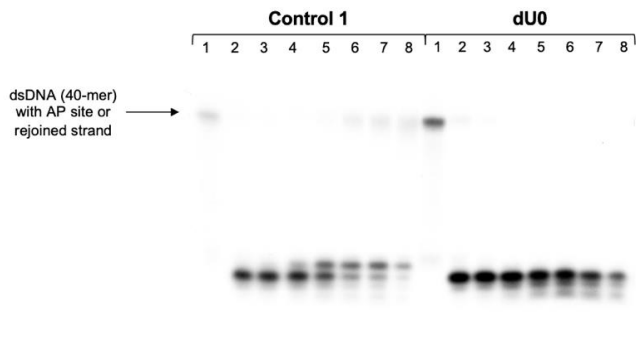
3



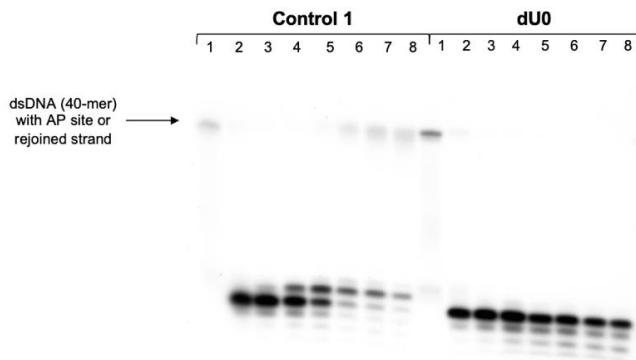


**Figure S7.** The autoradiograms presenting results of Control 1 and ds-CDL containing **RcdA** by BJ Cytoplasmic Extract. Lanes correspond with different assay time: lane 1 - 0 min; lane 2 - 1 min; lane 3 - 5 min; lane 4 - 15 min; lane 5 - 30 min; lane 6 - 60 min; lane 7 - 90 min; lane 8 - 120 min. Three replications of the experiment are shown.

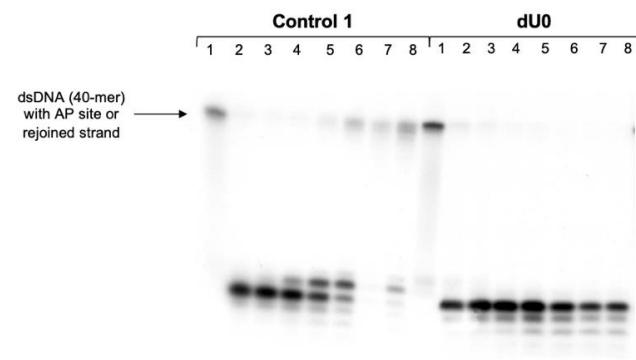
1

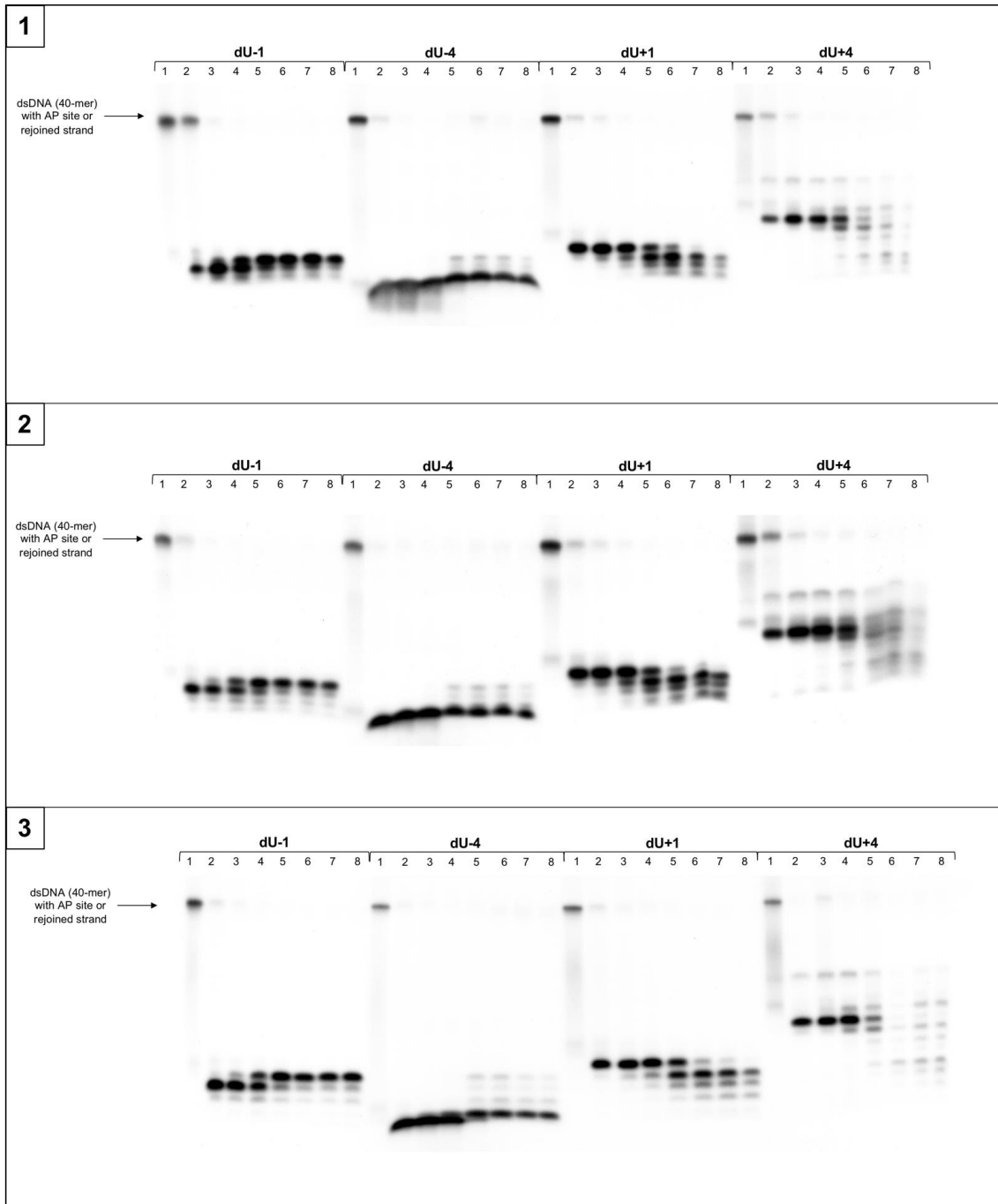


2



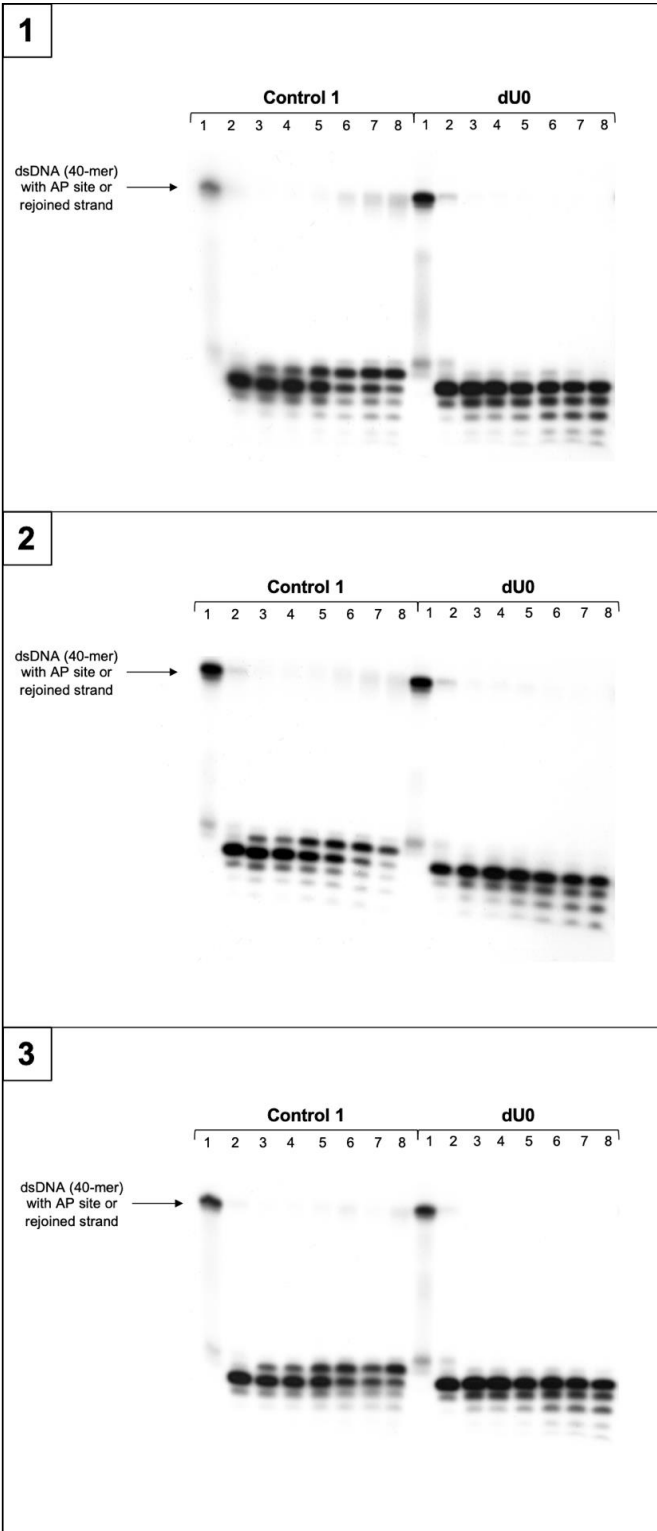
3

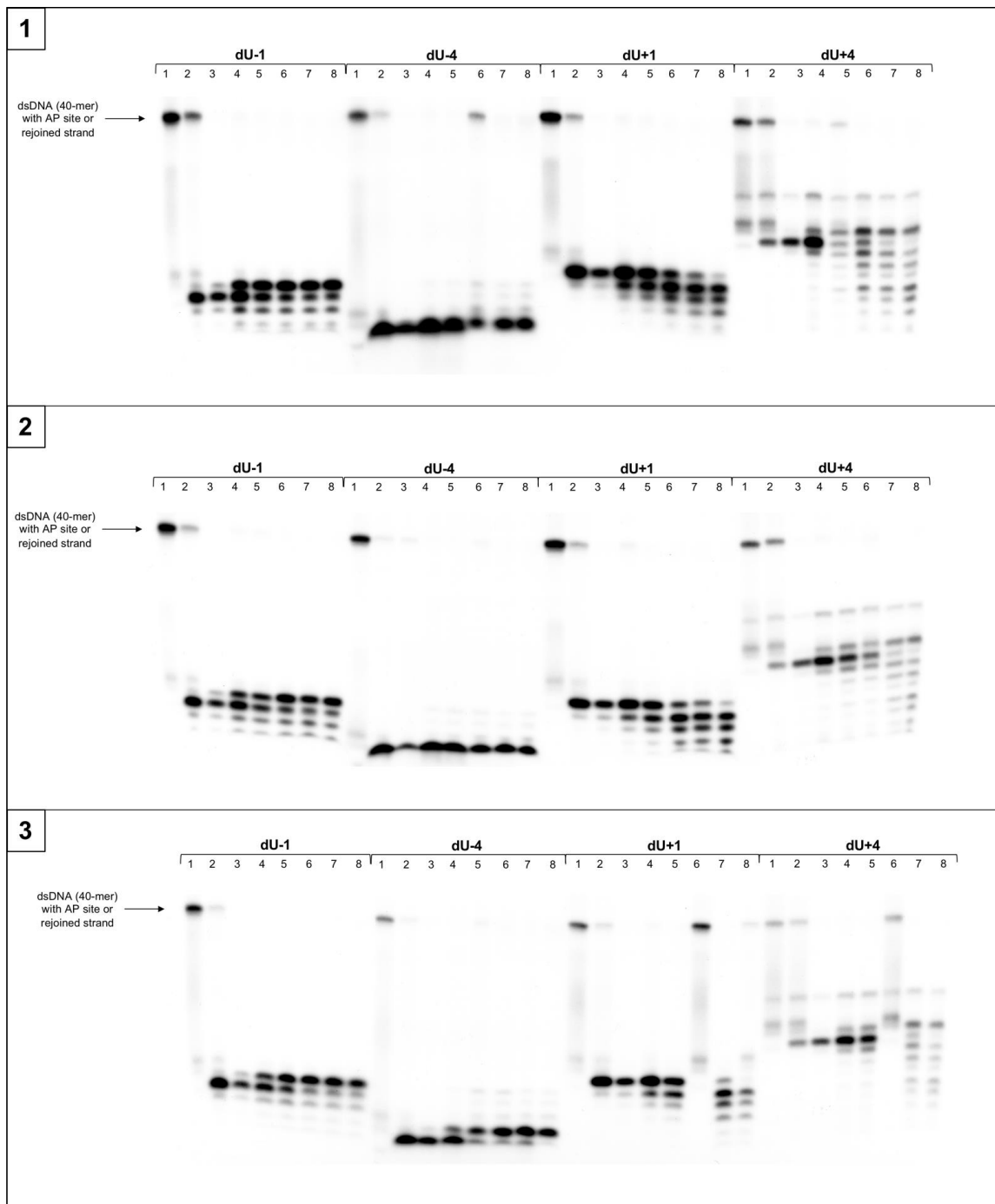




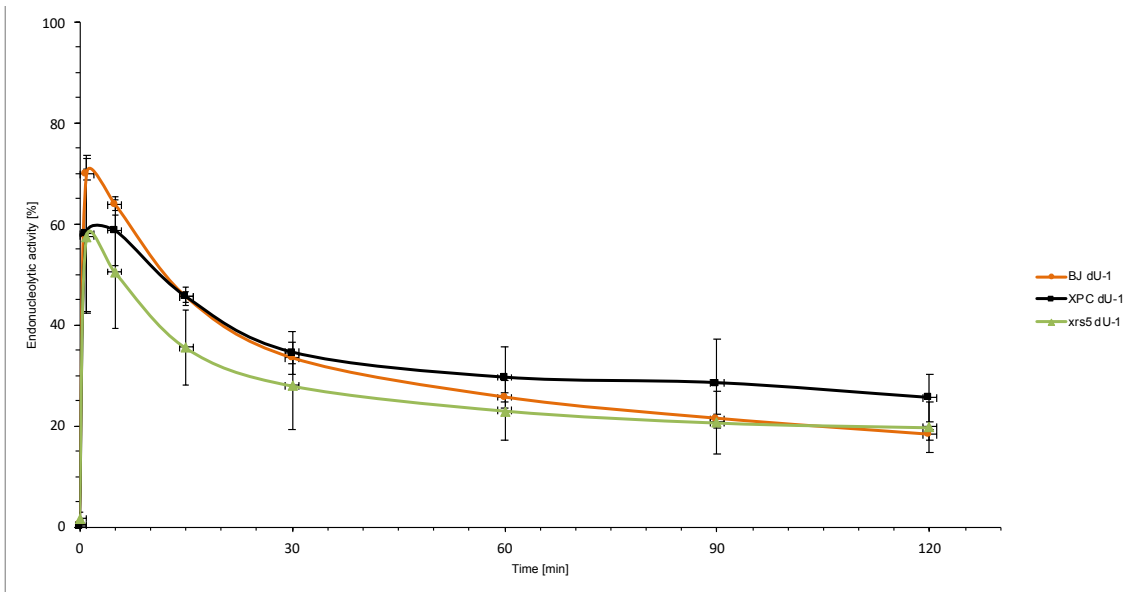
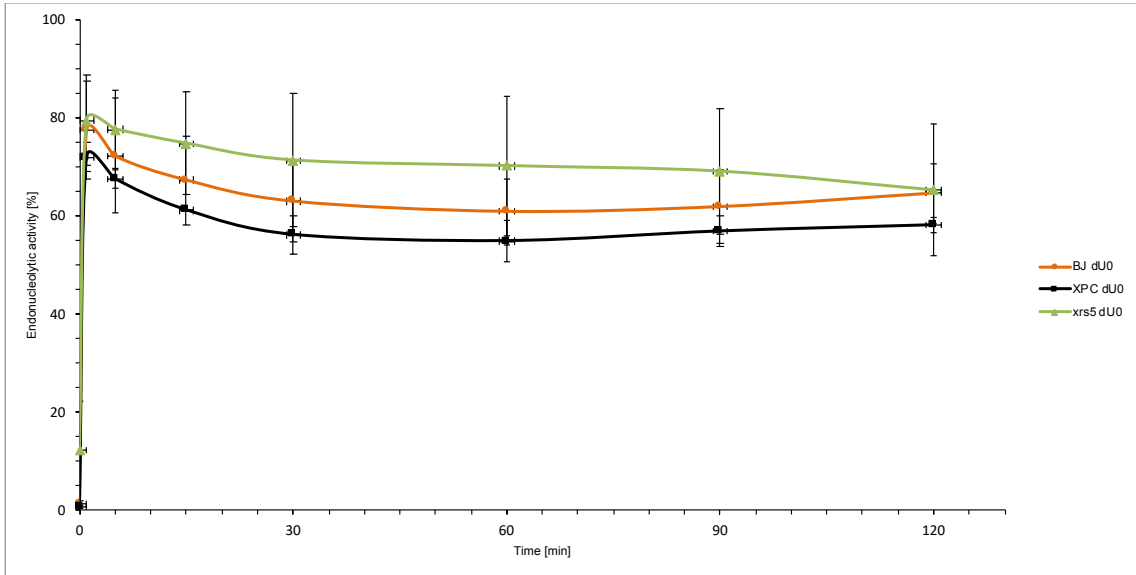
**Figure S8.** The autoradiograms presenting results of Control 1 and ds-CDL containing *ScdA* by XPC Cytoplasmic Extract. Lanes correspond with different assay time: lane 1 - 0 min; lane 2 - 1 min; lane 3 - 5 min; lane 4 - 15 min; lane 5 - 30 min; lane 6 - 60 min; lane 7 - 90 min; lane 8 - 120 min. Three replications of the experiment are shown.

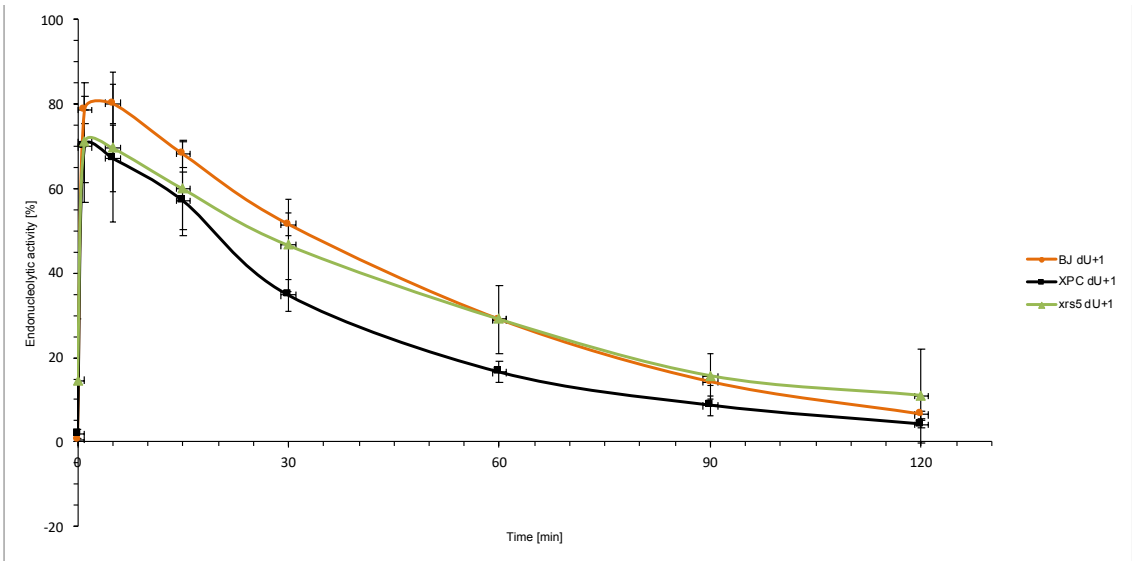
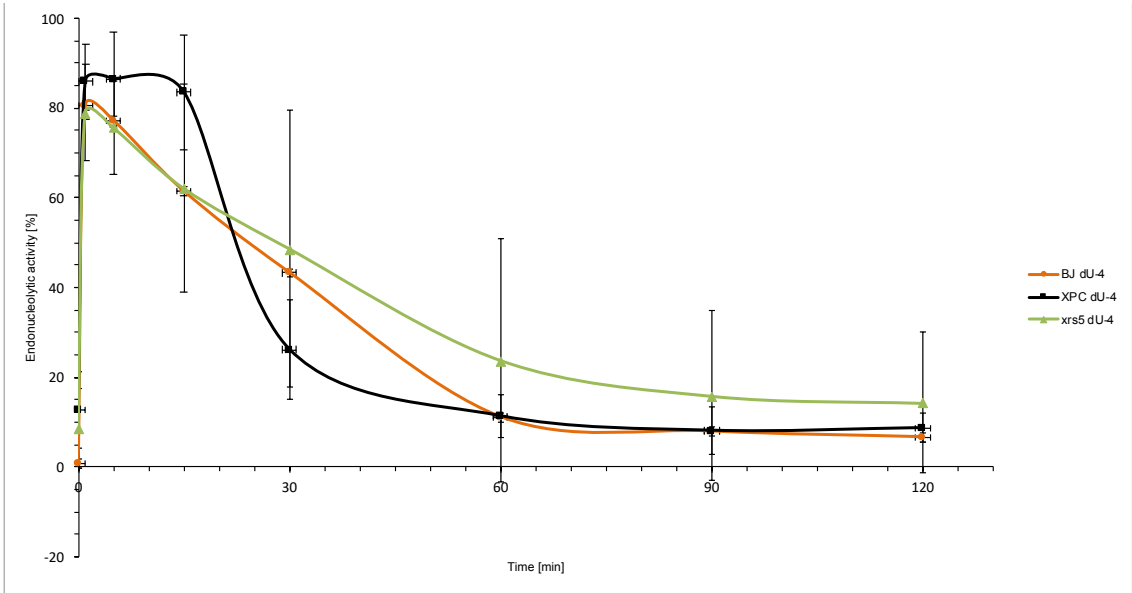


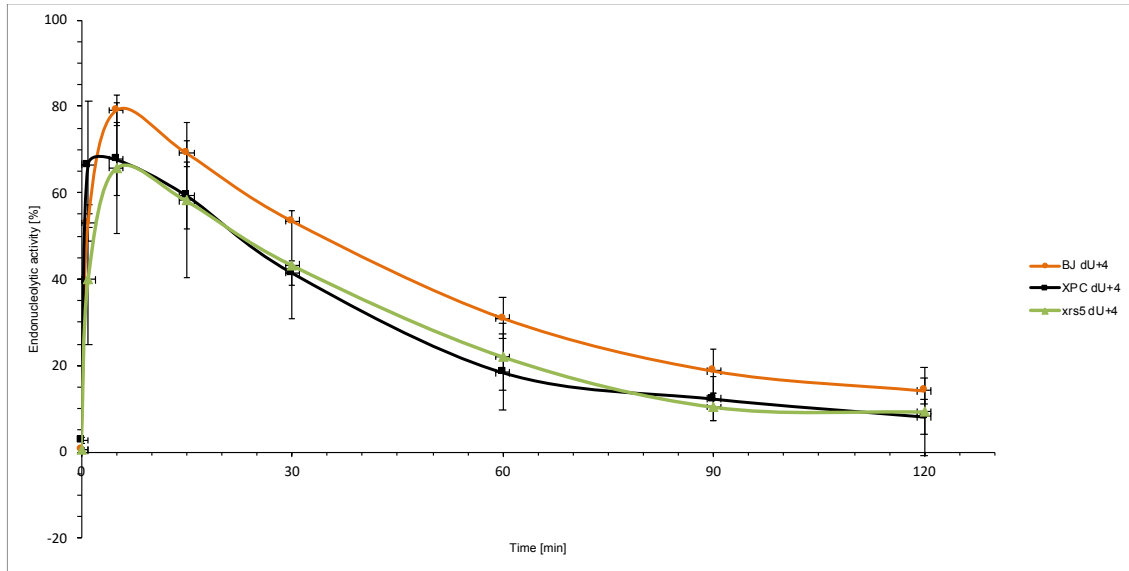




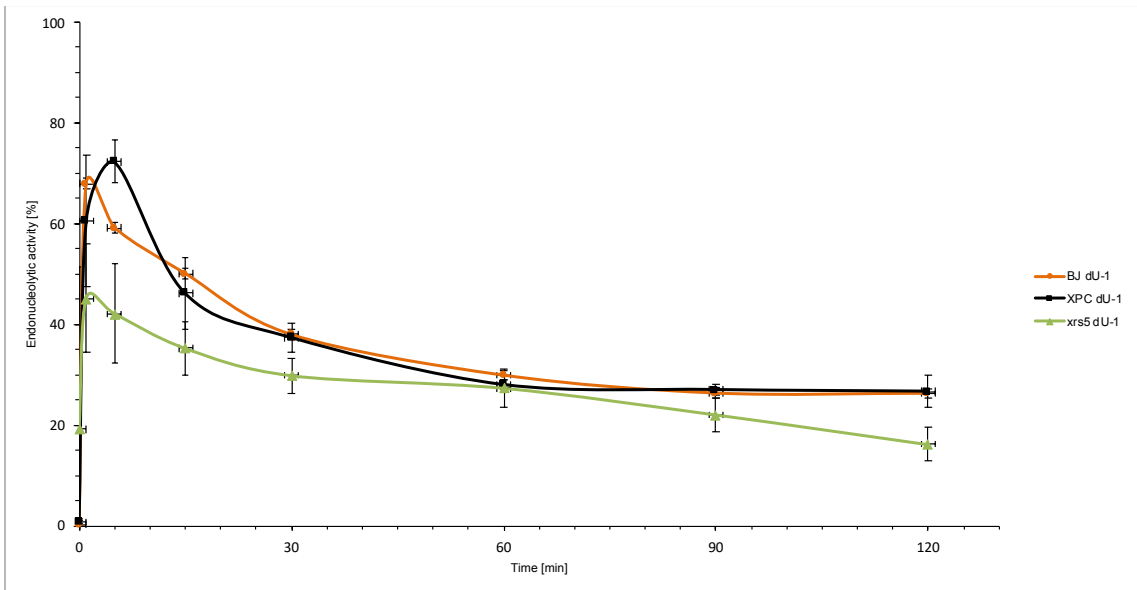
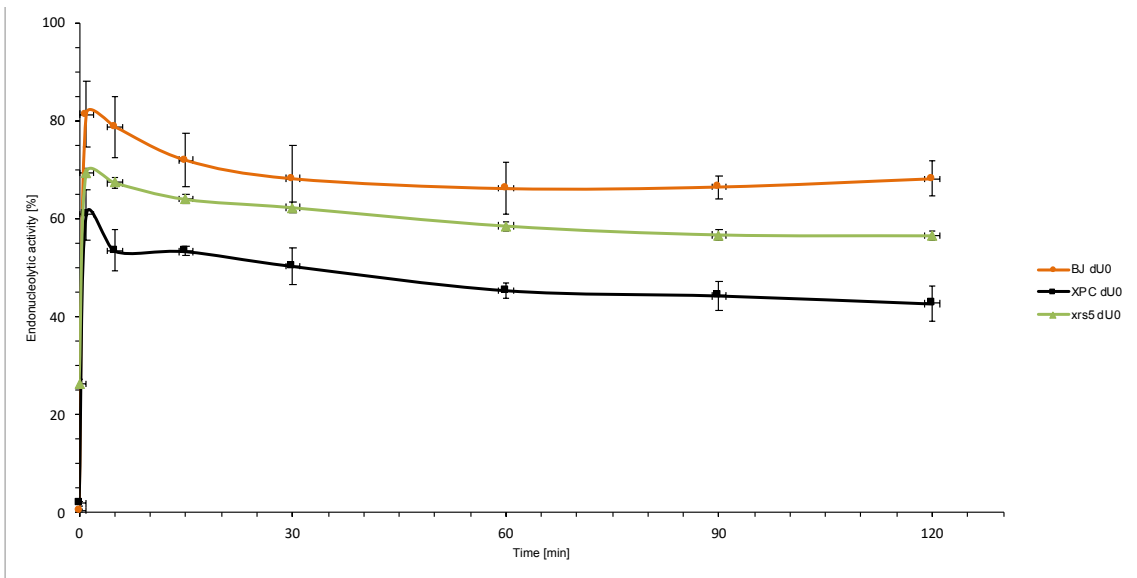
**Figure S9.** The autoradiograms presenting results of Control 1 and ds-CDL containing **RcdA** by XPC Cytoplasmic Extract. Lanes correspond with different assay time: lane 1 - 0 min; lane 2 - 1 min; lane 3 - 5 min; lane 4 - 15 min; lane 5 - 30 min; lane 6 - 60 min; lane 7 - 90 min; lane 8 - 120 min. Three replications of the experiment are shown.

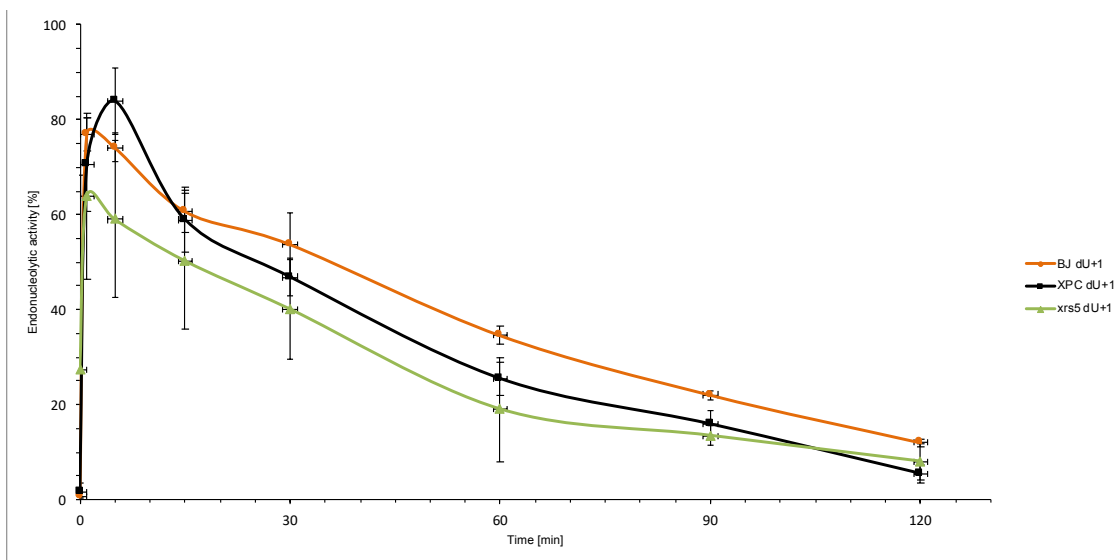
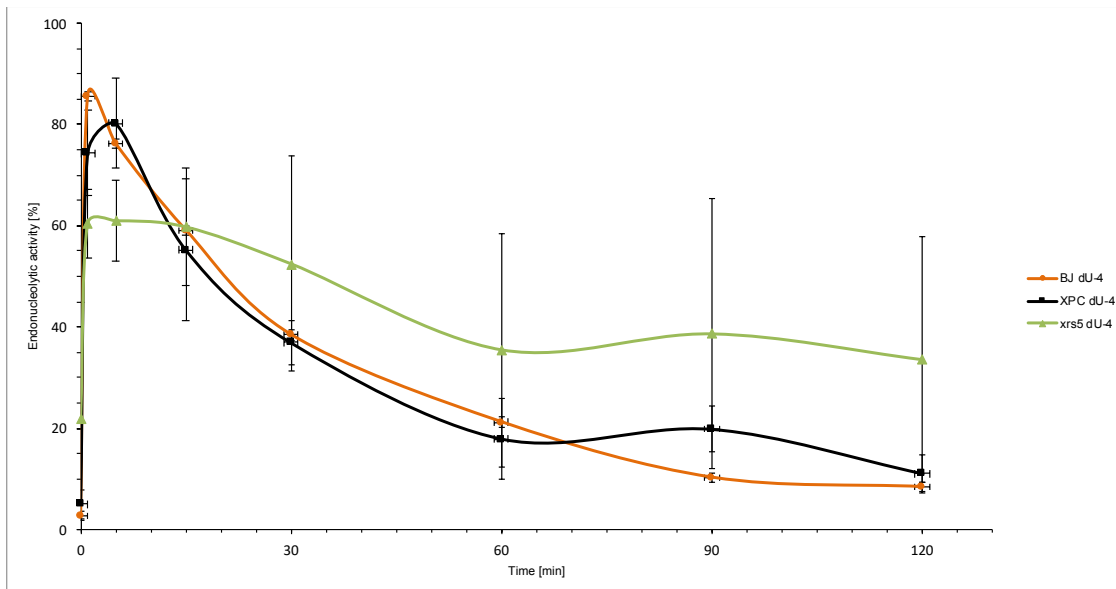


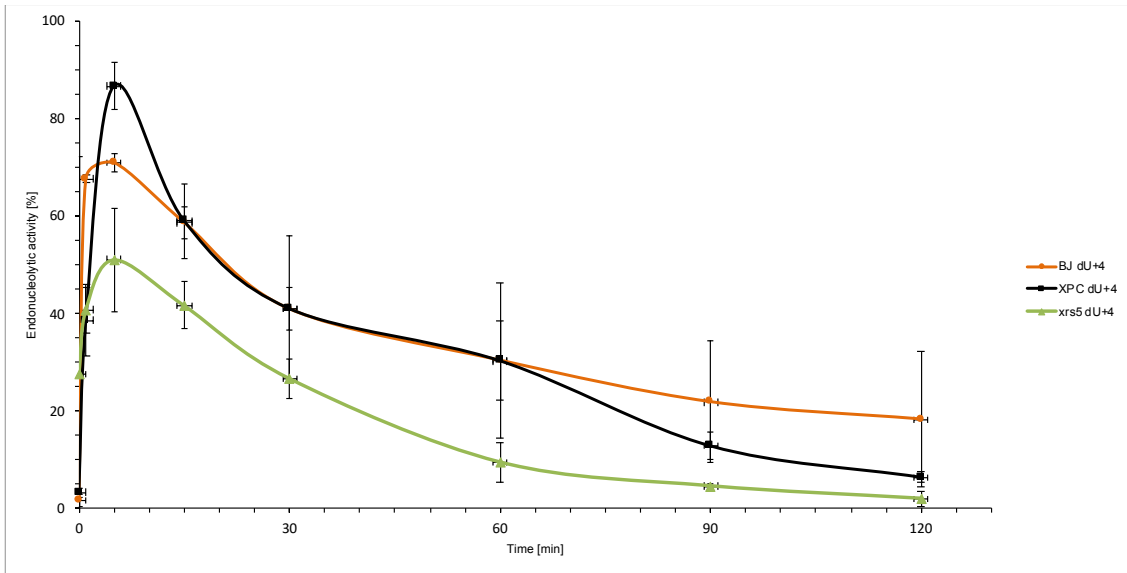




**Figure S10.** Endonucleolytic activity (strand incision) [%] of xrs5 vs. BJ vs. XPC – comparison of individual strands – ScdA Cytoplasmic Extract.

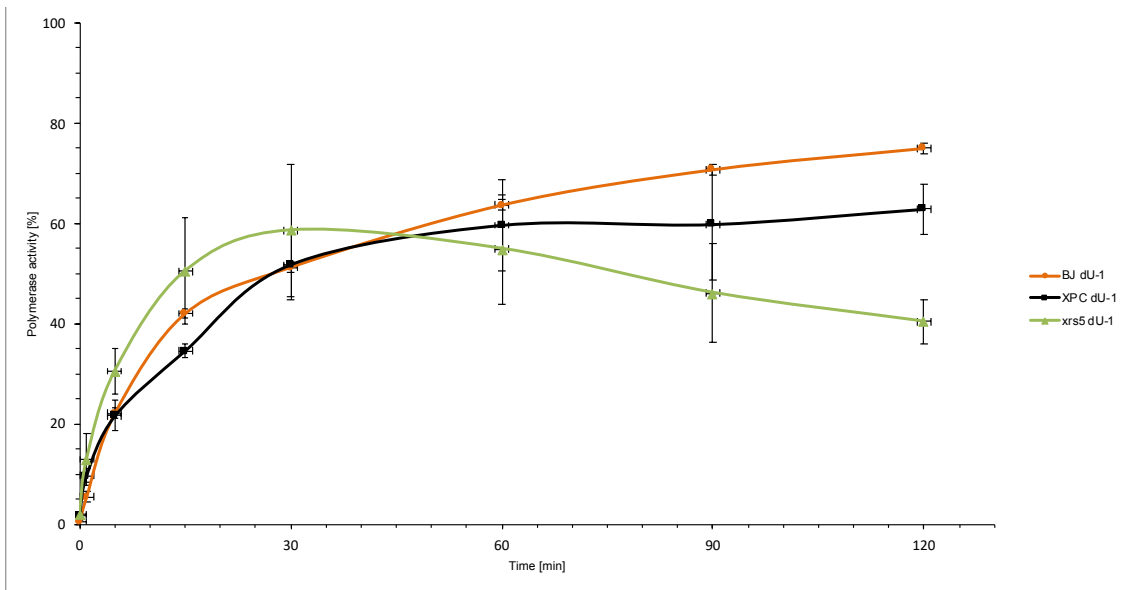
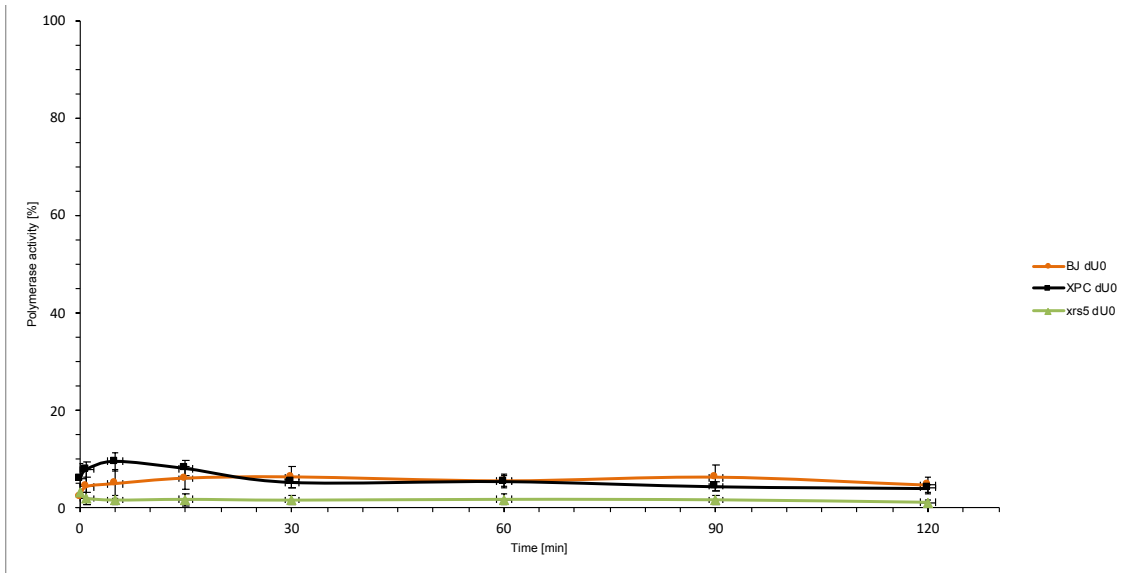


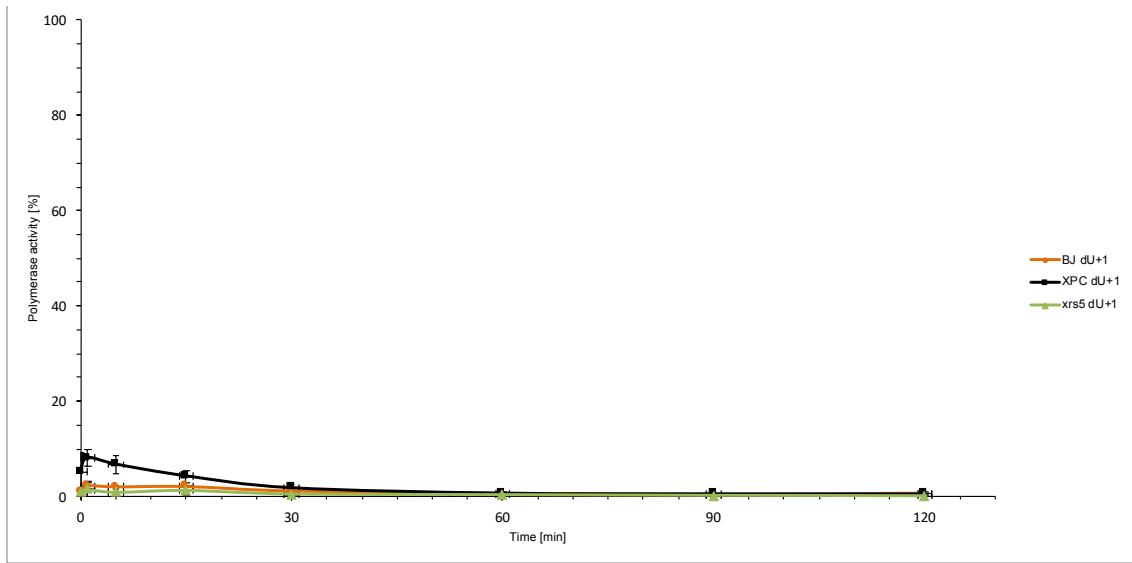
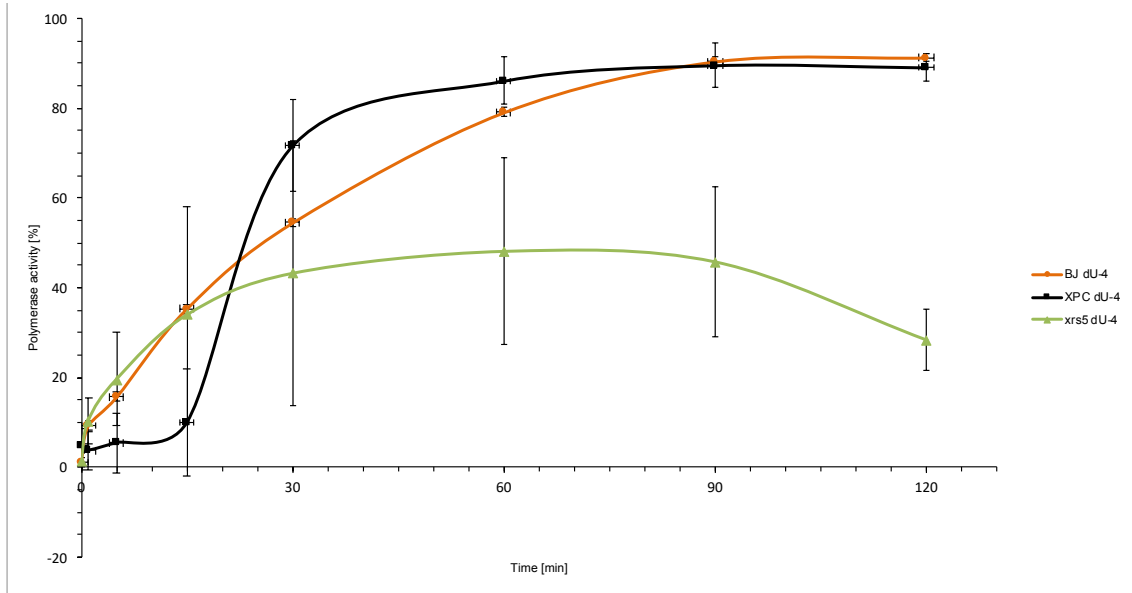


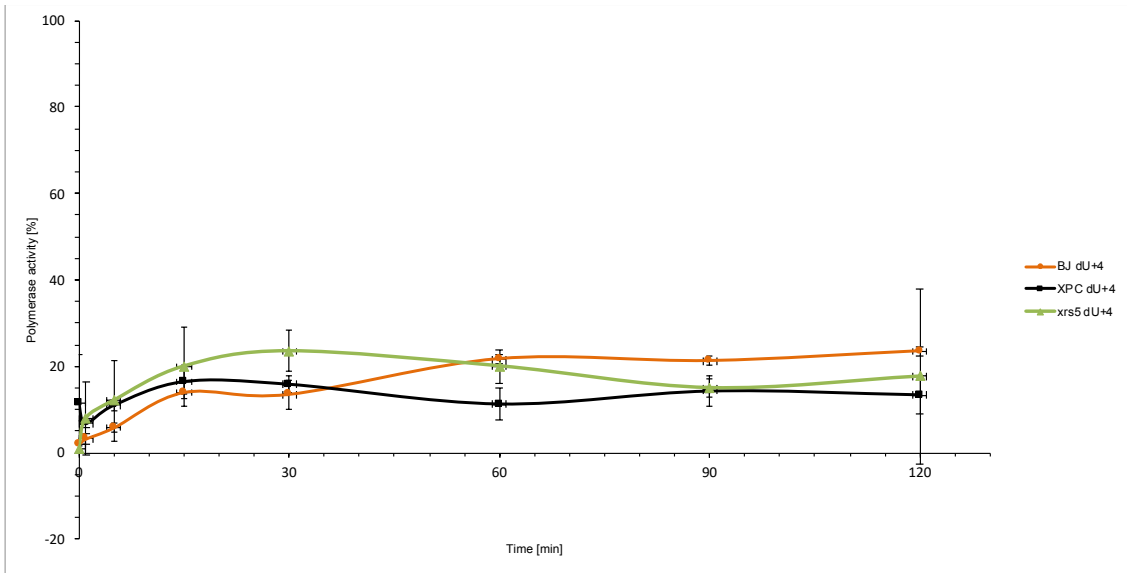


**Figure S11.** Endonucleolytic activity (strand incision) [%] of xrs5 vs. BJ vs. XPC – comparison of individual strands – RcdA Cytoplasmic Extract.

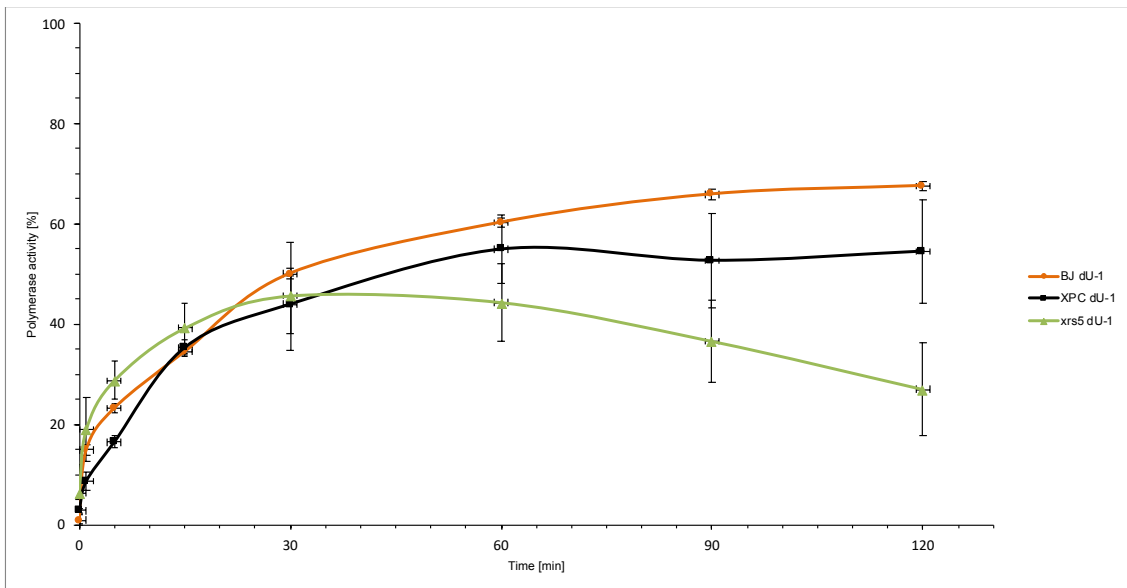
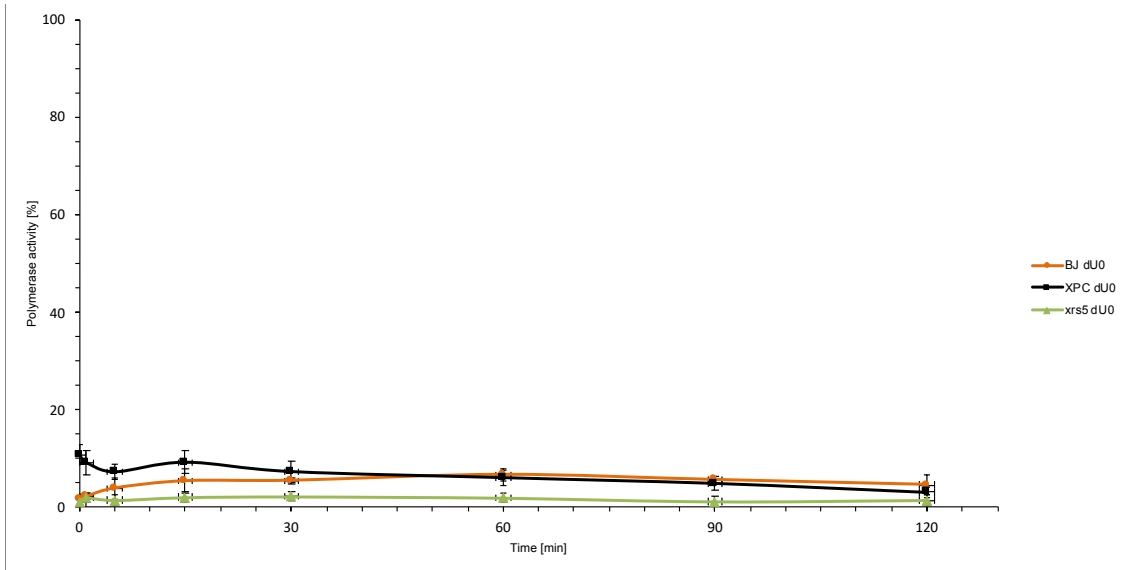


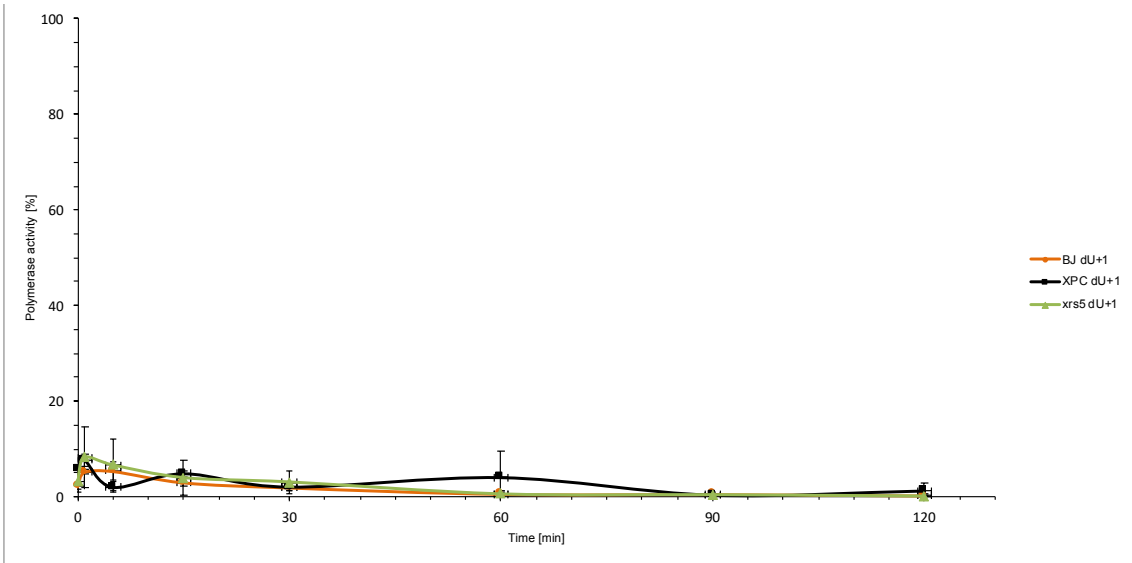
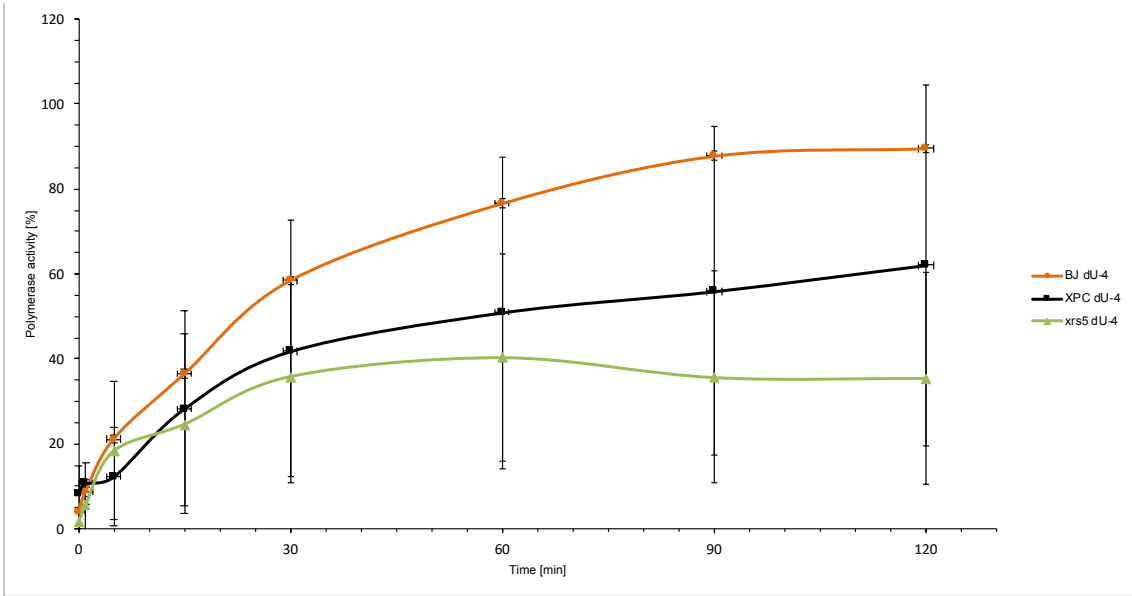


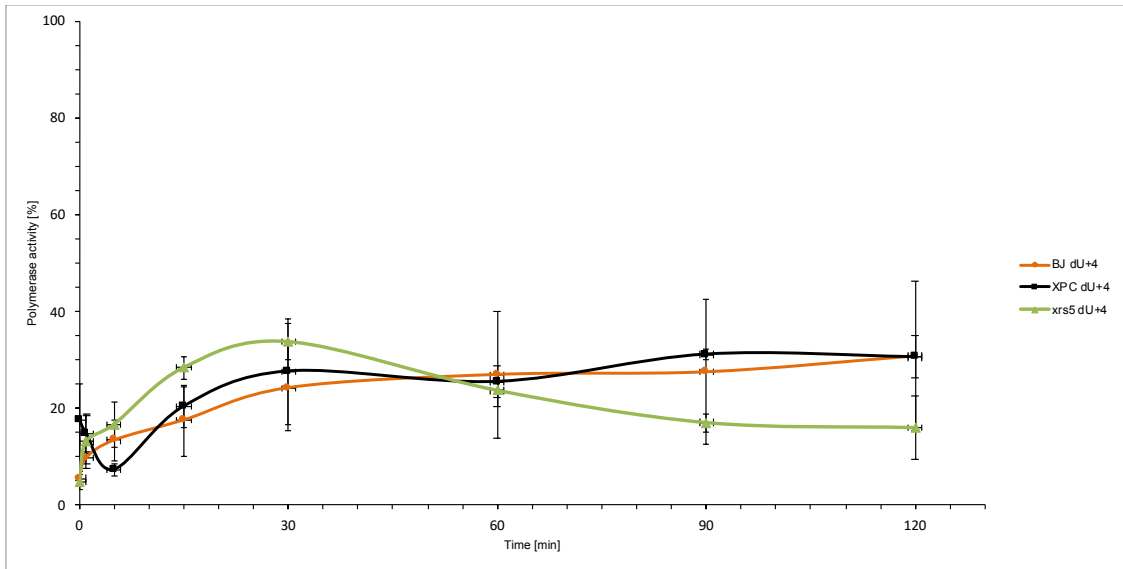




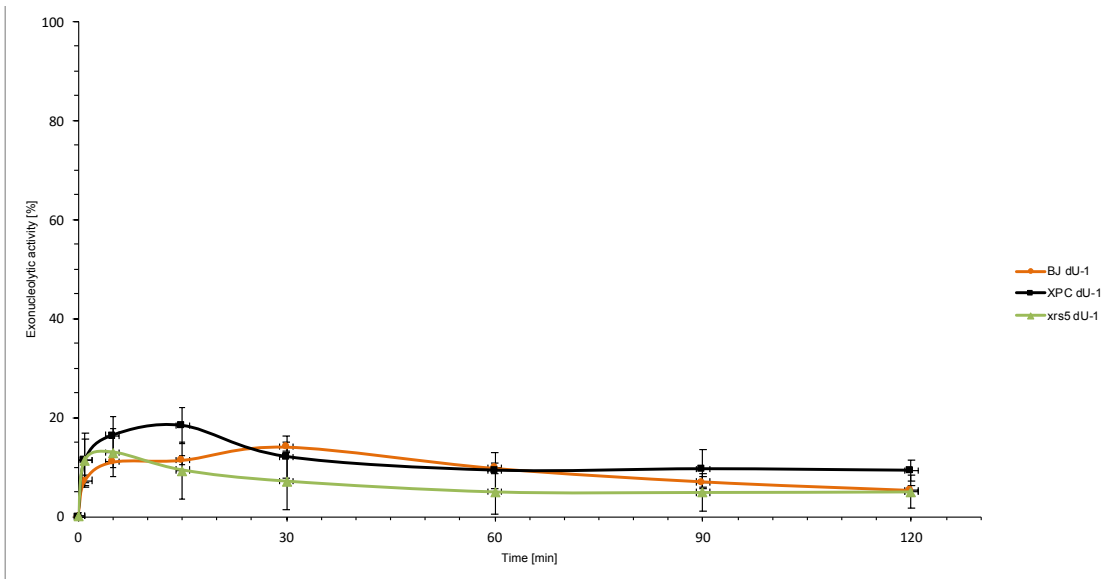
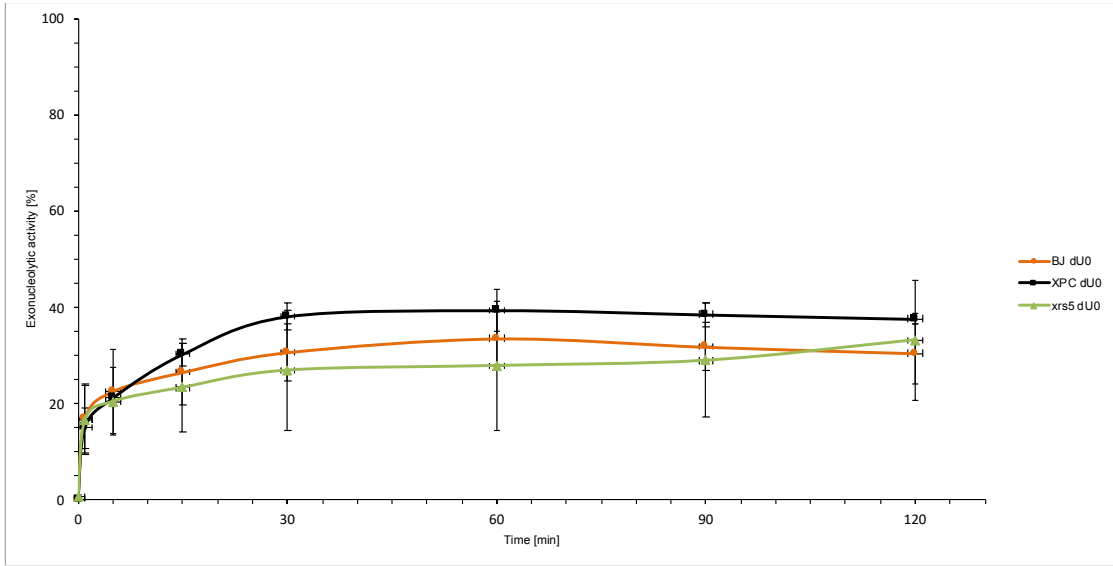
**Figure S12.** Polymerase activity (strand elongation) [%] of xrs5 vs. BJ vs. XPC – comparison of individual strands – ScdA Cytoplasmic Extract.

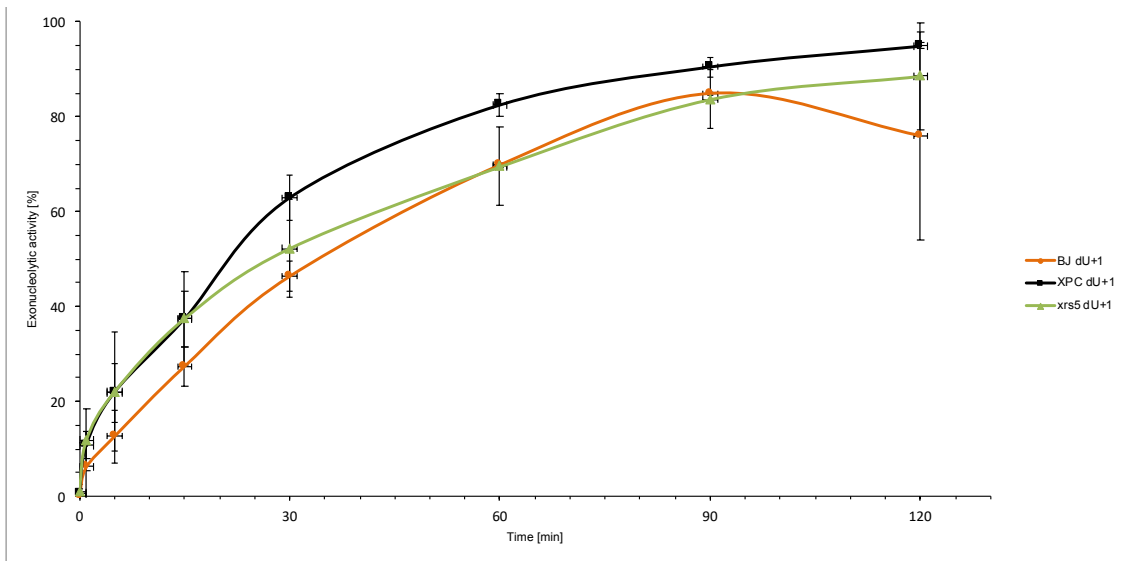
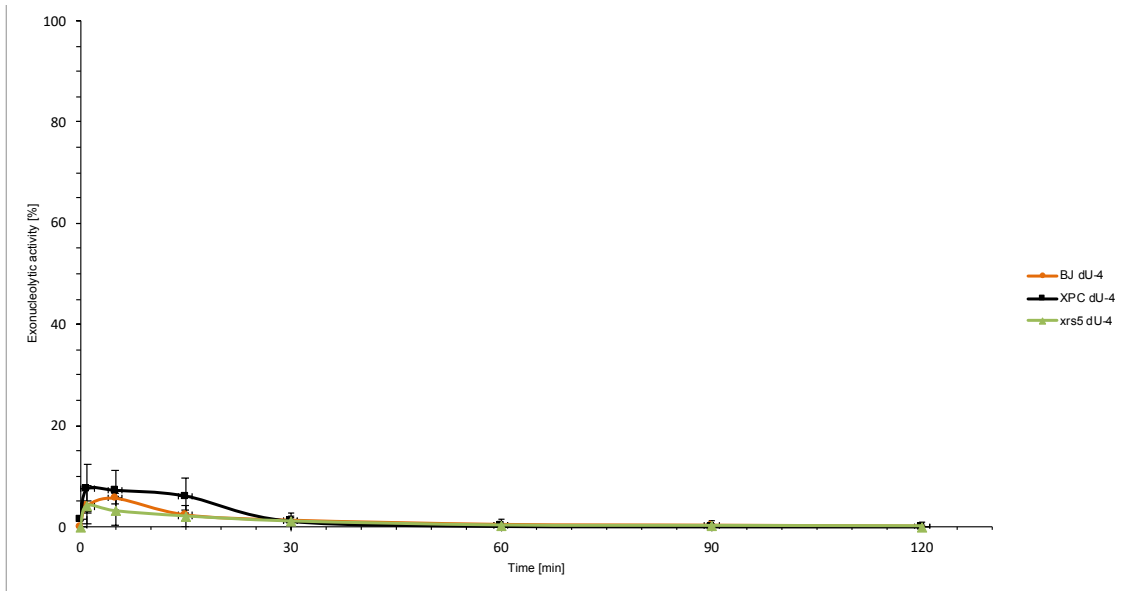




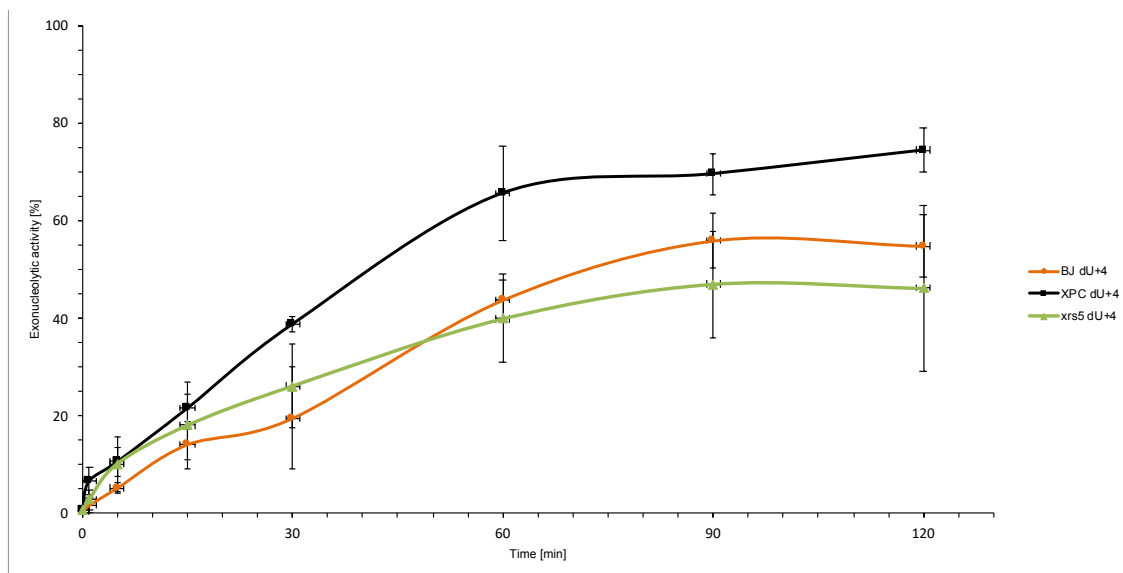


**Figure S13.** Polymerase activity (strand elongation) [%] of xrs5 vs. BJ vs. XPC – comparison of individual strands – RcdA Cytoplasmic Extract.

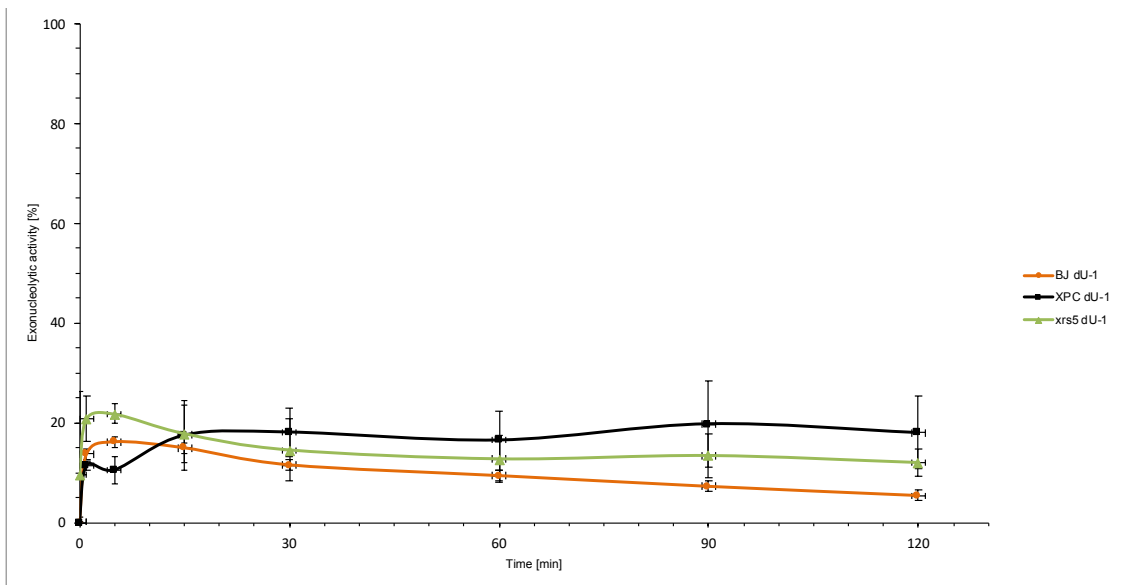
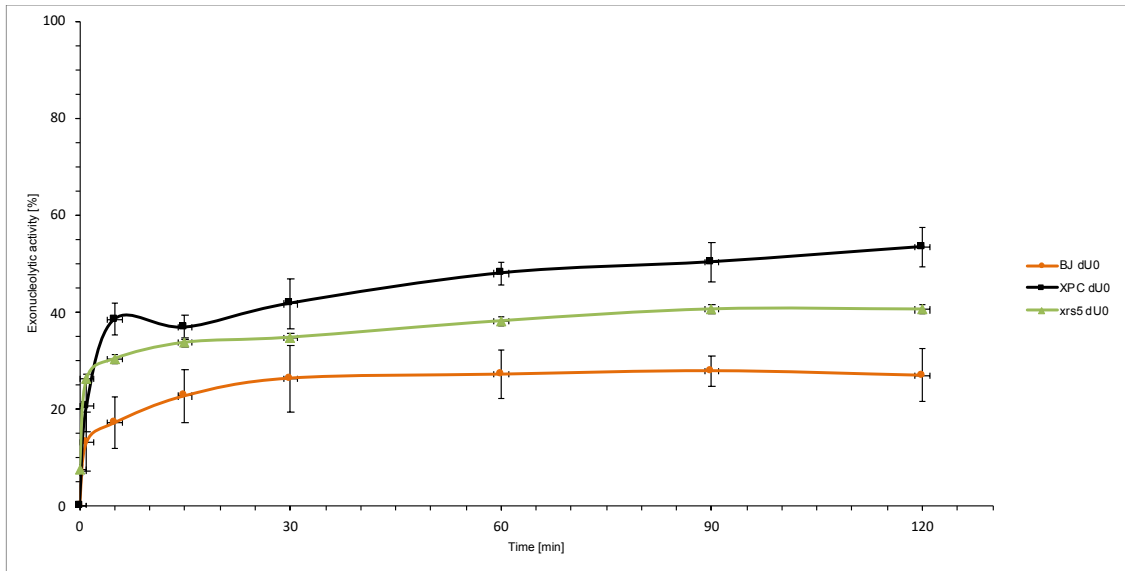


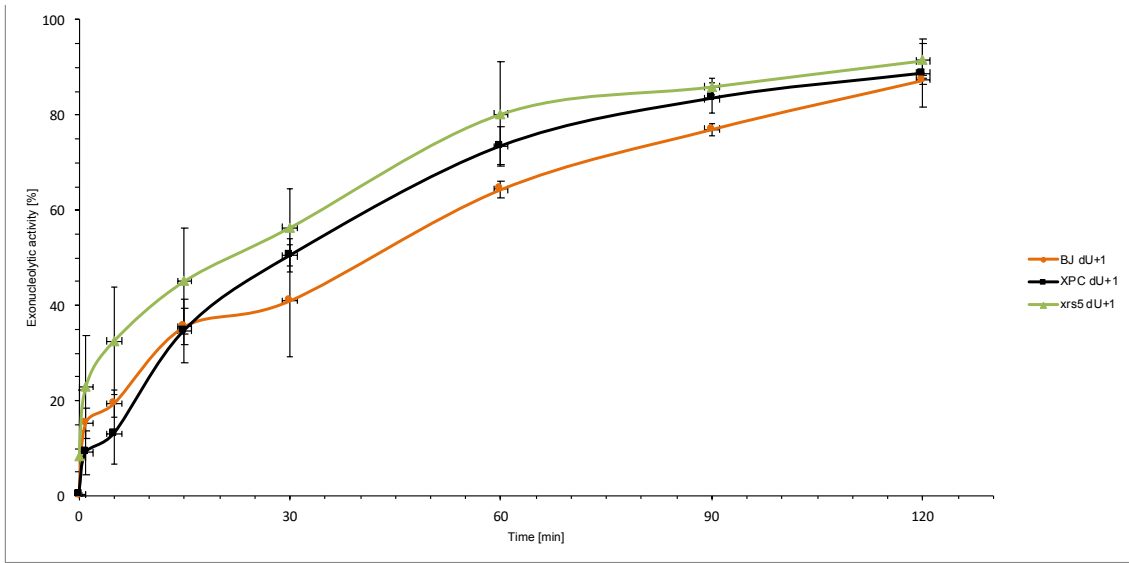
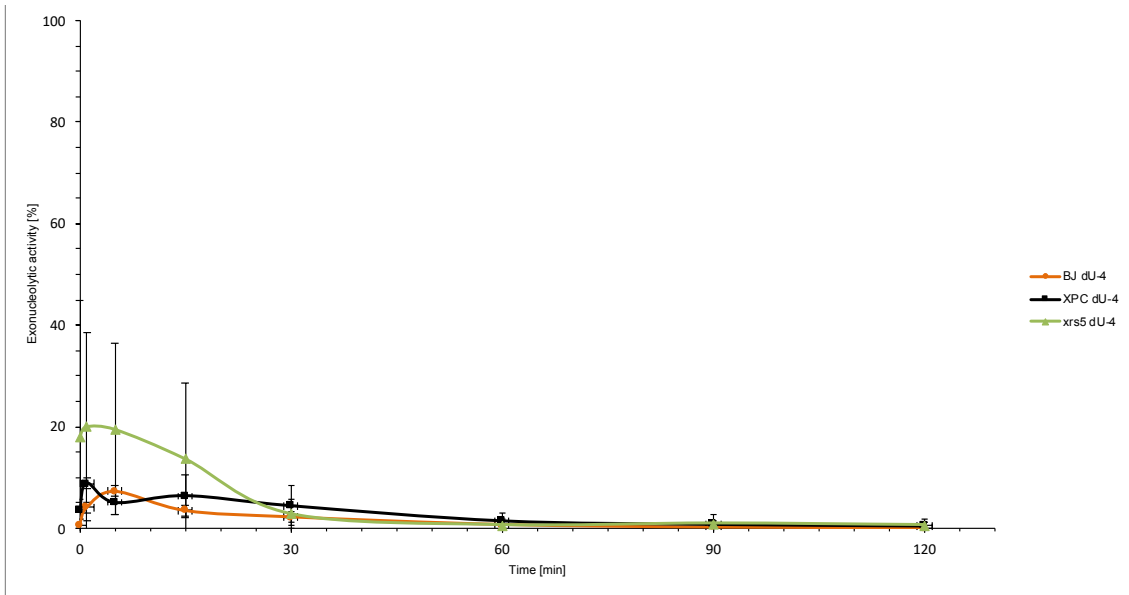


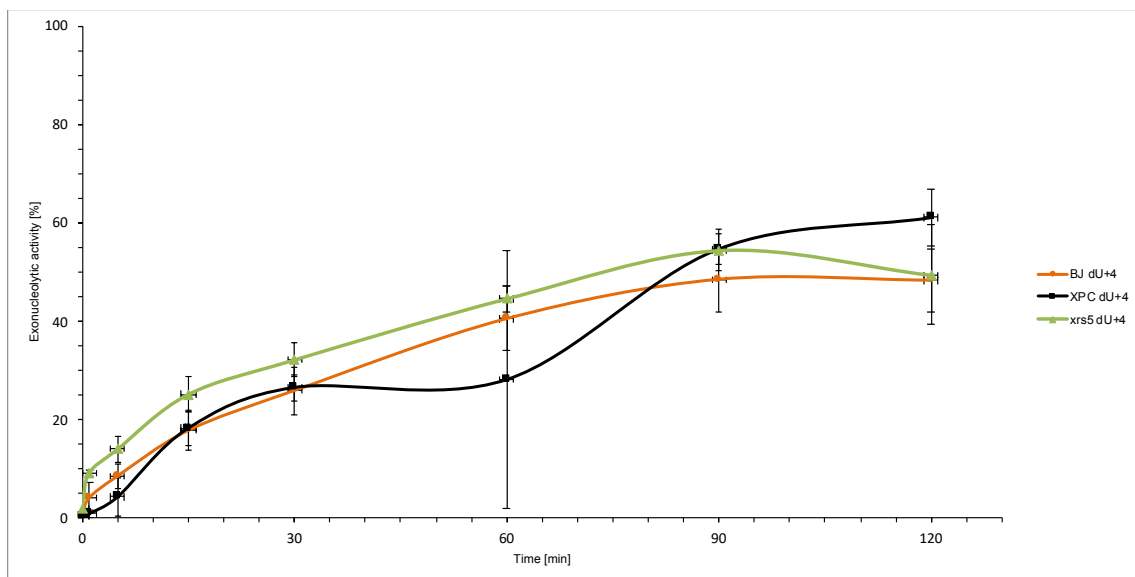




**Figure S14.** Exonucleolytic activity (strand degradation) [%] of xrs5 vs. BJ vs. XPC – comparison of individual strands – **ScdA** Cytoplasmic Extract.







**Figure S15.** Exonucleolytic activity (strand degradation) [%] of xrs5 vs. BJ vs. XPC – comparison of individual strands – **RcdA** Cytoplasmic Extract.

### 13.3. Publikacja III


**Boguszewska K.**, Kaźmierczak-Barańska J., Karwowski B.T.,

*The Influence of 5',8-Cyclo-2'-deoxypurines on the Mitochondrial Repair of Clustered DNA Damage in Xrs5 Cells: The Preliminary Study* [w:] *Molecules*, 2021, 26 (22), 7042, 10.3390/molecules26227042

**IF<sub>2021</sub>=4,411, MEiN<sub>2021</sub>=100 pkt**

Article

# The Influence of 5',8-Cyclo-2'-deoxypurines on the Mitochondrial Repair of Clustered DNA Damage in Xrs5 Cells: The Preliminary Study

Karolina Boguszewska , Julia Kaźmierczak-Barańska  and Bolesław T. Karwowski \* 

DNA Damage Laboratory of Food Science Department, Faculty of Pharmacy, Medical University of Lodz, ul. Muszynskiego 1, 90-151 Lodz, Poland; karolina.boguszewska@umed.lodz.pl (K.B.); julia.kazmierczak-baranska@umed.lodz.pl (J.K.-B.)

\* Correspondence: boleslaw.karwowski@umed.lodz.pl; Tel.: +48-42-677-91-36



**Citation:** Boguszewska, K.; Kaźmierczak-Barańska, J.; Karwowski, B.T. The Influence of 5',8-Cyclo-2'-deoxypurines on the Mitochondrial Repair of Clustered DNA Damage in Xrs5 Cells: The Preliminary Study. *Molecules* **2021**, *26*, 7042. <https://doi.org/10.3390/molecules26227042>

Academic Editor: Jussara Amato

Received: 10 November 2021

Accepted: 16 November 2021

Published: 22 November 2021

**Publisher's Note:** MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



**Copyright:** © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

**Abstract:** The 5',8-cyclo-2'-deoxypurines (cdPus) affect the DNA structure. When these bulky structures are a part of clustered DNA lesions (CDL), they affect the repair of the other lesions within the cluster. Mitochondria are crucial for cell survival and have their own genome, hence, are highly interesting in the context of CDL repair. However, no studies are exploring this topic. Here, the initial stages of mitochondrial base excision repair (mtBER) were considered—the strand incision and elongation. The repair of a single lesion (apurinic site (AP site)) accompanying the cdPu within the double-stranded CDL has been investigated for the first time. The type of cdPu, its diastereomeric form, and the interlesion distance were taken into consideration. For these studies, the established experimental model of short oligonucleotides (containing AP sites located  $\leq 7$  base pairs to the cdPu in both directions) and mitochondrial extracts of the xrs5 cells were used. The obtained results have shown that the presence of cdPus influenced the processing of an AP site within the CDL. Levels of strand incision and elongation were higher for oligos containing RcdA and ScdG than for those with ScdA and RcdG. Investigated stages of mtBER were more efficient for DNA containing AP sites located on 5'-end side of cdPu than on its 3'-end side. In conclusion, the presence of cdPus in mtDNA structure may affect mtBER (processing the second mutagenic lesion within the CDL). As impaired repair processes may lead to serious biological consequences, further studies concerning the mitochondrial repair of CDL are highly demanded.

**Keywords:** 5',8-cyclo-2'-deoxyadenosine (cdA); 5',8-cyclo-2'-deoxyguanosine (cdG); clustered DNA damage; DNA repair; base excision repair; mtDNA

## 1. Introduction

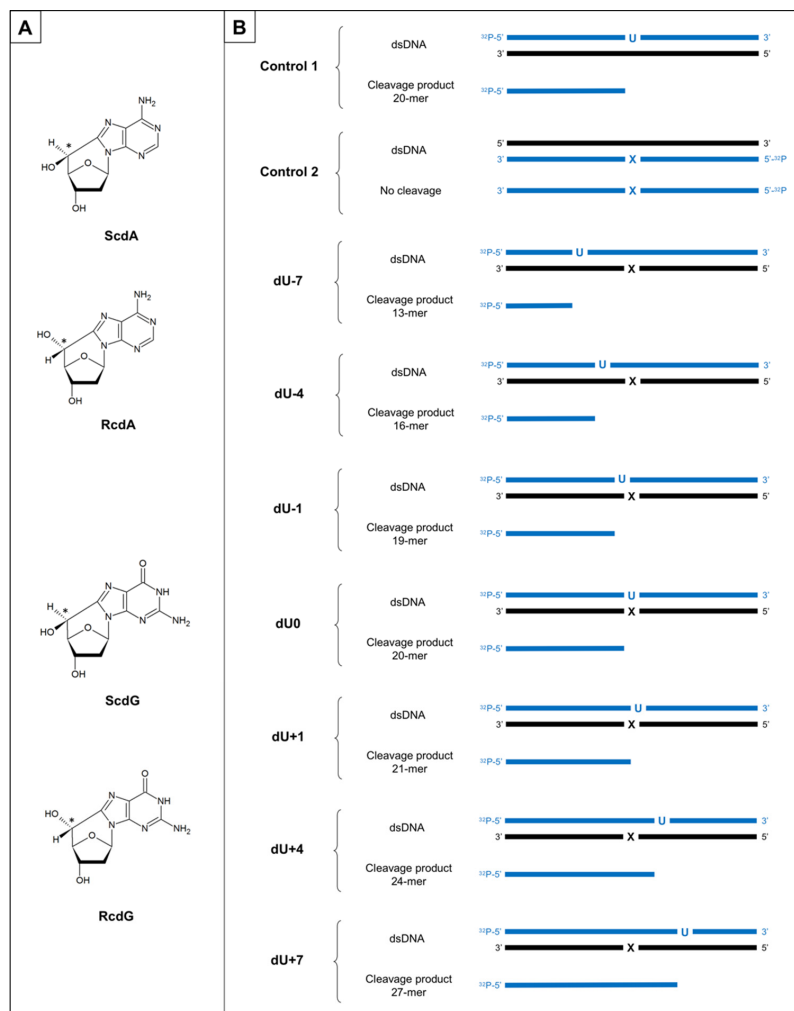
Mitochondria are unique organelles of bacterial origin that produce energy for the cell through oxidative phosphorylation (OXPHOS) [1]. Mitochondria have their own DNA (mtDNA), which encodes proteins crucial for energy production [2]. One human cell contains from a few up to a few thousands of mtDNA molecules. Mitochondrial genes are often damaged to some extent, and mutations within mtDNA genes often need to occur within at least 60% of mtDNA copies for phenotypic manifestation. A major part of the mitochondrial proteome is encoded by nuclear DNA, translated into the cytosol, and transported into mitochondria [3]. Protein translocation is a process highly susceptible to errors. Its dysfunctions may lead to decreased protein number due to their wrong localization or premature degradation outside the mitochondria, which may lead to energy-production impairment and subsequent cell death. Also, the byproducts of OXPHOS (e.g., mitochondrial reactive oxygen species (mtROS)) can cause mtDNA damage [1]. Oxidative stress may inhibit the ribosome functioning in cytosol affecting the overall protein synthesis [4]. Some neurodegenerative, metabolic, and age-related diseases, and cancers are suspected to result at least in part from mutations in mitochondrial and/or

nuclear genes encoding mitochondrial proteins [5]. Diseases of mitochondrial origin affect approximately 1 in every 5000 people and are still a therapeutic challenge [5]. They impair the most energy-dependent tissues such as the heart, muscles, brain, and eyes, which manifests as neuropathies, myopathies, blindness, hearing loss, kidney, or liver diseases [5]. Aging and age-related diseases also correlate with increasing mtDNA damage [6]. What is even more interesting, the overall condition of mitochondria may indicate the active SARS-CoV-2 infection [7]. The recent review stated that aging-like degradation and loss of mitochondrial function have been observed in COVID-19 patients. Furthermore, during COVID-19 infection increased number of damaged mitochondria accumulated in the cell and led to a higher inflammation rate [7]. Approximately 30% of mitochondrial proteins are present in both, mitochondria, and cytoplasm, and/or nucleus. Many questions concerning the functions of mitochondrial proteins remain unanswered due to difficulties with isolating specific proteins from this organelle. However, some novel solutions for mitochondrial protein detection are considered e.g., the split-GFP system which gives fluorescent signal only after proteins of interest enter the mitochondria [8].

MtDNA is particularly vulnerable to  $\bullet\text{OH}$  activity, which may induce the formation of the 5',8-cyclo-2'-deoxypurines (cdPus). The formation of the additional covalent bond between C5' and C8 results from one of the hydrogen atom abstraction by  $\bullet\text{OH}$  from the C5' group. Approximately  $10^2$ – $10^5$  DNA lesions are formed daily in every human cell [9]. Clustered DNA lesions (CDL) are observed as 2 or more individual lesions occurring within 1–2 helical turns of DNA and may contain a different damage type [10]. CdPus show different biological impact depending on the C5'chirality (5'S or 5'R diastereomer) [11]. CdPus represent a tandem DNA lesion type within one nucleotide that increases the rigidity of DNA structure [10,12]. The previous studies have shown the geometry of the DNA helix is changed 5' from the lesion [13,14]. CdPus are removed from DNA via nucleotide excision repair (NER) which does not take place in mitochondria [11]. Moreover, cdPus interfere with replication and/or transcription [10,15,16]. Most cdPus studies focus on the nuclear repair pathways [17–20]. The results show that the cellular repair capacity is altered depending on the type of cdPu (namely, 5',8-cyclo-2'-deoxyadenosine (cdA) or 5',8-cyclo-2'-deoxyguanosine (cdG)), their diastereomeric form (5'S or 5'R), and the distance between lesions within a cluster. Moreover, these characteristics directly influenced the activity of BER enzymes towards the other lesion within the CDL [10,21]. Due to the high levels of cdPus detected in human cells (cdA: 0.01 (5'R) and 0.1 (5'S) lesions per  $10^6$  DNA nucleosides; cdG: 2 (5'R) and 10 (5'S) lesions per  $10^6$  DNA nucleosides) and their different biological consequences (e.g., mutations, replication blocks, and impaired repair pathways), the impact of cdPus on the mitochondrial BER (mtBER) should be explored [11]. To our knowledge, currently, no study showed the levels of cdPus in the mitochondrial genome.

The BER is the most evolutionarily conserved repair system and the main one in mammalian mitochondria. It may correct a single base (short-patch BER, SP-BER) or a fragment of 2–12 nucleotides (long-patch BER, LP-BER) [22]. It is a multistep process consisting of damage recognition, lesion excision (AP site formation), subsequent strand incision (gap formation), undamaged nucleotide incorporation (gap-filling), and strand rejoining [23]. Other repair systems detected in mitochondria include mismatch repair (MMR), single-strand break repair (SSBR), microhomology-mediated end joining (MMEJ), and homologous recombination (HR) [24,25]. The BER process is impaired when repair enzymes cannot form complexes with DNA due to structural changes in the double helix, such as those resulting from cdPus occurrence [10]. Interestingly, a recent study showed that BER can remove ScdA from the genome, but the lesion location was crucial for proper enzymes' action [26]. Even though the mitochondrial BER (mtBER) is the best-characterized repair system in mitochondria, many questions remain to be answered.

This work investigated the two initial steps of the mtBER pathway (strand incision and strand elongation) processing the single AP site lesion which was accompanied by the cdPu within the bi-stranded cluster (Figure 1).



**Figure 1.** (A) The representation of chemical structures of the 5',8-cyclo-2'-deoxypurines (cdPus): (5' S)-5',8-cyclo-2'-deoxyadenosine (ScdA), (5' R)-5',8-cyclo-2'-deoxyadenosine (RcdA), (5' S)-5',8-cyclo-2'-deoxyguanosine (ScdG), (5' R)-5',8-cyclo-2'-deoxyguanosine (RcdG); (B) The schematic presentation of investigated ds-oligonucleotides (40 bp) with labeled ends, lesion positioning and cleavage products. U—represents location of an AP site obtained from 2'-deoxyuridine (dU) after treatment with uracil DNA-glycosylase (UDG); X—represents location of the cdPu;  $^{32}\text{P}$ —represents strand end labeled with  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ ; blue color—represents radiolabeled strands of dsDNA and corresponding cleavage products subsequently observed on radiograms; negative numbers—dsDNA with clustered lesions on two strands where AP site is located 1–7 base pairs in 3' direction; positive numbers—dsDNA with clustered lesions on two strands where AP site is located 1–7 base pairs in 5' direction.

The obtained results have shown that the relative distance between a single lesion (AP site) on one strand and cdPu on the other strand influences the reparability of the first one. In this study, the bi-stranded CDL (Figure 1) were tested in mitochondrial extracts (ME) of *xrs5* cells (X-ray sensitive Chinese hamster ovarian mutant cell line), which is an established model for CDL studies. Moreover, the impact of different cyclopurines and



their isomers was investigated. To our knowledge, this is the first demonstration of the influence of both 5'/S and 5'/R cdPus on the repair of accompanying lesions located within CDL in mitochondria (probably due to difficulties with the chemical synthesis of RcdG). As the cdPus have a diagnostic potential [27–29], knowing their implications in mitochondria may lead to new applications in medicine and/or new pharmaceuticals development.

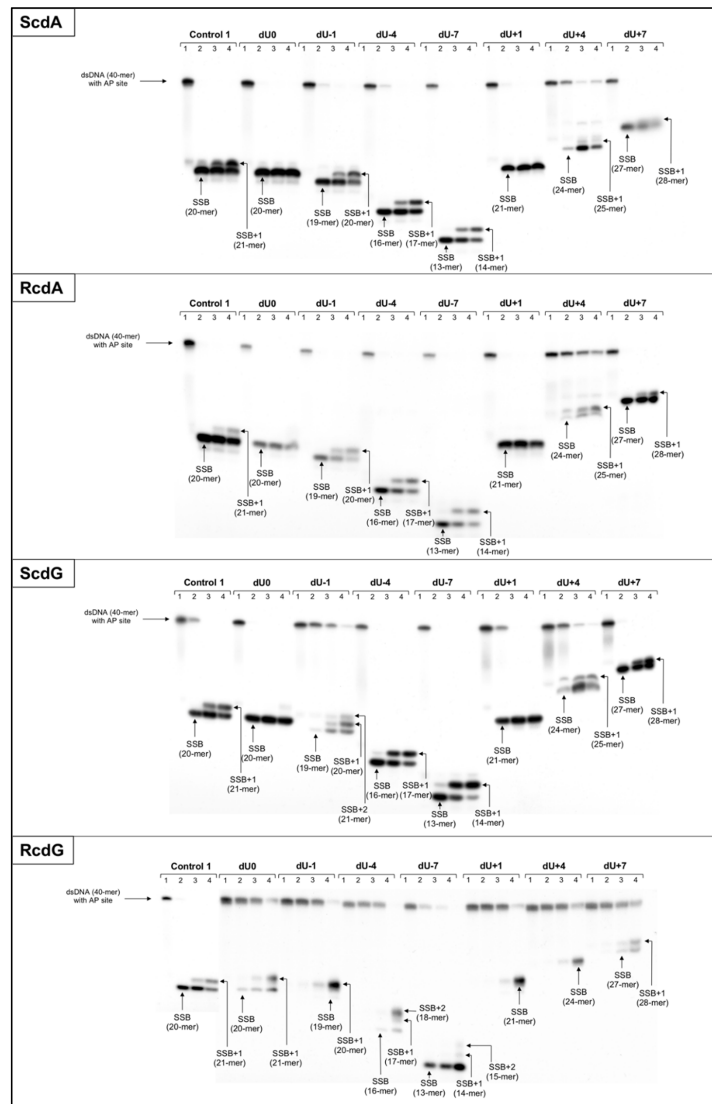
## 2. Results and Discussion

The formation of cdPus results from the hydroxyl radical action upon human genetic material; hence, it is important to determine their impact on molecular processes. The presented work examined whether the type, diastereomeric form of cdPu, and the distance between cdPu and AP site (1–7 base pairs in 3'-end and 5'-end direction) within CDL impact the first two stages of mitochondrial BER pathway—the strand incision (gap formation) resulting from total mitochondrial endonucleolytic activity and strand elongation (incorporation of new nucleotides into the gap) catalyzed by polymerases. The established model [10,20] for the experiments employed 40-mer synthetic double-stranded oligonucleotides containing dU (as the AP site precursor) on one strand and cdPu on the complementary strand (Figure 1, full sequences are listed in Table S1). The model cell line of X-ray-sensitive Chinese hamster ovarian mutant cell line (xrs5, Ku80 deficient) was used to obtain mitochondrial extracts (ME). The functional activity test has been performed to evaluate the quality of ME in the context of mitochondrial proteins involved in BER repair and to exclude the possibility of contamination with the nuclear BER proteins (Figure S14).

Here, the total activity of ME proteins involved in the first two stages of the mtBER pathway was studied in the context of AP site repair located within CDL that also contain cdPu. The activity of ME proteins was tested for a control oligonucleotide with a single lesion, as the reference point for future studies (Control 1, Figure 1, Table S1). For Control 1, the percentage of strand cleavage reached 71.92% after 30 min (Table S2). This endonucleolytic activity was approximately 20% lower in comparison with nuclear extracts (NE) studied previously [20]. It can be assumed it is a result of faster nDNA repair when compared to mtDNA. The lesion recognition and removal must be rapid in the nucleus due to the highest importance of maintaining correct genetic information for the whole cell. Moreover, proteins involved in mitochondrial repair may act slower as they are translocated into the organelle upon need, and only some molecules are present on-site before DNA damage [30].

Polymerase activity assay was also performed for the control oligonucleotide (Control 1, Figure 1, Table S1). Incorporation of new nucleotide units (NU) was observed as an elongated strand (e.g., SSB+1 indicated incorporation of 1NU to the DNA previously cleaved) (Figure 2).

The polymerase efficiency for Control 1 reached 35.16% after 6 h with strand elongation exclusively by 1NU (Figures 2, S2, S3 and S8, Table S3). For the NE presented in the related study, a similar level of polymerases activity was reached after 30 min [20].



**Figure 2.** The representative autoradiograms of denaturing PAGE presenting the strand incision and elongation of dsDNA containing clustered damage with AP site on one strand (observed on the gel) and ScdA on the opposing strand (not observed on the gel). Control 1: dsDNA with a single AP site lesion on one strand; dU0: dsDNA with clustered lesions on two strands opposite to each other; negative numbers: dsDNA with clustered lesions on two strands where AP site is located 1–7 base pairs in 3′-end direction; positive numbers: dsDNA with clustered lesions on two strands where AP site is located 1–7 base pairs in 5′-end direction; SSB: dsDNA with single-strand break obtained after AP site incision (gap formation); SSB+1/SSB+2: dsDNA with single-strand break obtained after AP site incision (gap formation) and incorporation of 1 or 2 undamaged nucleotide units. Each lane corresponds to a different assay time: lane 1–0 h; lane 2–0.5 h; lane 3–3 h; lane 4–6 h. Each experiment was performed three times for consistency (individual replications and graphical representation of results with SD are available in Supplementary Materials).

### 2.1. The Influence of 5',8-Cyclo-2'-deoxypurines on the Endonucleolytic Activity in Mitochondria

The total mitochondrial endonucleolytic activity has been taken under consideration and observed as the strand incision at the location of the AP site creating SSB. Double-stranded oligonucleotides with cdA or cdG (5'S and 5'R isomers) on one strand and with an AP site on the complementary strand were examined. The strand incision was observed on the radiogram as bands corresponding to shorter oligonucleotide fragments: from 13-mer for  $-7$  position up to 27-mer for  $+7$  position (Figures 1, 2, S2, S3, S8 and S9). Almost all examined strands with AP sites accompanied by cdA on the complementary strand were incised after 30 min of incubation with ME with  $\sim 80$ – $92\%$  efficiency (Table S4). The exceptions were observed for ScdA/dU+4 and RcdA/dU+4 where it took 6 h to reach 61.4% and 64.41%, respectively (Figures S4 and S5, Table S4). Interestingly, Control 1 (with a single AP site) showed a lower level of strand cleavage (71.92% after 30 min) than duplexes with bi-stranded CDL. It may indicate that the presence of cdA within CDL enhanced the first step of the mtBER process (AP site incision). The fact that the AP site in the  $+4$  position strongly inhibits the endonucleolytic activity of the ME aligns with previous observations [10,20]. Surprisingly, the strand incision level was up to 10% higher for ds-oligos with RcdA than ScdA (Figure S6). This is contrary to previously studied NE where the presence of ScdA within the duplex increased AP site cleavage level more than RcdA [20]. It allows us to conclude that the presence of ScdA in mtDNA is less beneficial than RcdA for enzymatic AP site scission by apurinic/aprimidinic endonuclease (APE1) or other enzymes (DNA glycosylases/AP lyases) possessing endonucleolytic activity (e.g., endonuclease VIII-like 1 (NEIL1), 8-oxoguanine glycosylase (OGG1), endonuclease III (NTH)). Substrate ds-oligos were incised with the total efficiency increasing in the following order for RcdA and ScdA, respectively (data compared for 30 min reaction time):  $+4 < +7 < -1 < -4 \sim +1 \sim -7 < 0$  and  $+4 < -1 < +7 \sim 0 < +1 < -4 < -7$ .

For ds-oligonucleotides containing AP site and cdG, the trends of strand incision varied depending on the distance between these lesions. For ScdG, the lowest efficiency has been noted for ScdG/dU $-1$  (16.91% after 30 min) and the highest for ScdG/dU0 (97.51% after 30 min) (Table S6). AP sites located in positions 0,  $-4$ ,  $-7$ , and  $+7$  reached incision levels up to 25% higher than Control 1, while for AP sites in positions  $-1$ ,  $+1$ , and  $+4$  SSB formation was inhibited below Control 1 level (compared for 30 min reaction time, Figure S10, Table S6). These results were in agreement with the past NE studies where AP sites located  $-1$ ,  $+1$ , and  $+4$  from ScdA have also shown lower endonucleolytic activity [20]. Oligonucleotides containing RcdG were incised less efficiently than those containing ScdG (except for dU $-7$  where 5'R showed 3.5% higher efficiency than 5'S) (Figure S12). Interestingly, ds-oligonucleotides containing cdA presented inverse trend (5'R diastereomers reached higher rates of strand incision than 5'S, Figure S6). These observations are in good agreement with previous results for the NE study [20]. The strand incision efficiency increased as follows (data compared for 30 min reaction time):  $-4 < +1 \sim +4 < +7 < -1 < 0 < -7$  (RcdG);  $-1 < +4 < +1 < -7 \sim +7 < -4 < 0$  (ScdG). Noteworthy, in the case of AP site located  $+4$  nucleobases from 5'S and 5'R cdG, the level of total mitochondrial endonucleolytic efficiency reached only  $\sim 55$ – $58\%$  after 6 h (Table S6). These levels of strand cleavage were lower than for corresponding oligos with cdA (61.40% for ScdA/dU+4 and 64.41% for RcdA/dU+4 after 6 h, Table S4) and can be considered as inhibitory for this mtBER stage. Surprisingly, an even stronger inhibitory effect was observed for ScdG/dU $-1$  (31.66% after 6 h) and RcdG/dU $-1$  (55.27% after 6 h), which was not observed for cdA for ME nor NE [20]. What is more, AP site hydrolysis took more time in the case of ME (30 min) than NE (1 min) [20]. The majority of mitochondrial proteins involved in DNA repair are translocated into mitochondria when needed (after DNA damage is detected). This study concerned cells in their native state (without external damaging factors applied to the cell culture), which might have resulted in the low quantity of proteins with endonucleolytic activity in the ME. One of the known examples is APE1 that is “stored” and translocated from intermembrane space into mitochondrial matrix when needed; therefore, it may take more time before the enzyme processes the damaged mtDNA, and possibly a lower enzyme

quantity is present in mitochondria with undamaged DNA [31]. In mitochondria, the AP sites located in both directions from cdPus (in the 5'-end direction (positive numbers) and the 3'-end direction (negative numbers)) were hydrolyzed with similar efficiency. It was contrary to results concerning NE of the same cell line, where AP sites in the 5'-end direction from cdPus were incised slower [20].

## 2.2. The Influence of 5',8-Cyclo-2'-deoxypurines on DNA Synthesis in Mitochondria

The influence of cdPu located within the CDL on the gap-filling step of mtBER was also taken under consideration. Polymerases play a crucial role in the replication and repair of genetic material in both, nucleus and mitochondria. Previous reports showed that both cdPus diastereomers have a different impact on the DNA synthesis during genome repair. For example, replication in *Escherichia coli* may be blocked by the 5'S isomer of cdG and cdA, but not the 5'R isomer [15,16,32,33]. The mitochondrial pool of polymerases differs from those present in the nucleus. Apart from the best characterized mitochondrial replicative polymerase  $\gamma$  (PolG), other types of this enzyme have also been detected in mitochondria (e.g., polymerase  $\beta$  (PolB), PrimPol, Rev3 subunit of polymerase  $\zeta$  (PolZ), polymerase  $\theta$  (PolQ)) [34]. Interestingly, a recent Bohr et al. study demonstrated that PolB was more efficient in single nucleotide gap-filling during mtBER repair than PolG [35]. In our study, the overall enzymatic activity of mitochondrial polymerases has been examined.

The total polymerases activity was observed on the radiogram as bands corresponding to oligonucleotides fragments denoted as SSB+1 (1NU inserted) or SSB+2 (2NU inserted) (Figure 2). Gap-filling was detected for the majority of investigated substrate oligonucleotides (both isomers of cdA and cdG) (Figure 2, Figure S2, S3, S8 and S9). For the dU0 and dU+1 position, no DNA synthesis occurred, which was in agreement with the previous study concerning NE [20]. However, RcdG/dU0 showed 1NU insertion in all experimental repeats (Figure S9) and incidental SSB+1 band was observed for ScdG/dU0 (Figure S8) and RcdA/dU0 (Figure S3). It may indicate the action of polymerases such as PrimPol (capable of bypassing bulky lesions e.g., oxidative and UV-induced lesions or cyclobutane pyrimidine dimers), Rev3 (capable of bypassing UV-induced DNA damage), or PolQ (capable of inserting new nucleobases opposite AP site or thymine glycol on the template strand) [34]. The majority of examined oligonucleotides revealed incorporation of only 1NU, which can indicate that SP-BER is the main repair pathway in mitochondria for the presented model of bi-stranded CDL. Surprisingly, insertion of 2NU was observed for ScdG/dU-1 and RcdG/dU-7. Such difference in distance and between isomers may come from the fact, that 5'R and 5'S can force different structural changes of the double helix. Interestingly, for the nuclear extract experiments, bands representing SSB+2 were also noted in individual experiments, but for different substrates than those detected in mitochondria (i.e., RcdA/dU-7, RcdA/dU+10, RcdG/dU+10, ScdG/dU+10, and RcdG/dU-4) [20].

The total strand elongation (gap-filling) efficiency increased in the following order (data compared for 6 h reaction time)—cdA: +4 < +7 < -4 < -1 < -7; ScdG: +4 < +7 < -1 < -4 < -7; RcdG: +4 < -7 < -1 < -4 < 0 < +7 (Figures S4, S5, S10 and S11, Tables S5 and S6). From the ME activity point of view, the most interesting is position dU-7, which revealed the highest level of polymerases activity for ScdA, RcdA, and ScdG. These results are contrary to NE activity, where dU-7 had shown second to lowest efficiency of strand elongation [20]. At the same time, RcdG/dU-7 showed second to lowest polymerase activity in ME (the lowest in NE [20]).

Based on the current and previous study of bi-stranded CDL, the general trend seems to be maintained for nucleus and mitochondria—gaps located on the 5'-end side (positive numbers) of cdPu are worse substrates for mitochondrial polymerases than those located on its 3'-end side (negative numbers). Also, oligonucleotides with gaps in position dU+4 revealed the worst efficiency of strand elongation, which has been previously noted for experiments considering xrs5 cell nuclear extracts [10,20]. When comparing different diastereomers, the overall rate of DNA synthesis was up to 8% higher for RcdA than ScdA (except for ScdA/dU+4) and 21–66% higher for ScdG than RcdG (except for ScdG/dU+7)

(Figures S7 and S13, Tables S5 and S7). These observations may point to the ability of mitochondrial polymerases to bypass RcdA, but not ScdA. Interestingly, the polymerases seem to act inversely for cdG diastereomers, which was also observed in earlier studies with NE [20]. In relation to Control 1 (35.16% efficiency after 6 h), the strand elongation was more efficient for oligonucleotides containing gaps in positions  $-1$ ,  $-4$ , and  $-7$  (both isomers) (Table S5). For the ds-oligos containing RcdG within the investigated dsCDL, only RcdG/dU+7 surpassed the control level, while in the case of ScdG, gaps located in positions denoted as dU $-1$ , dU $-4$ , dU $-7$ , and dU+7 have shown higher polymerases' gap-filling activity than Control 1 (Table S7). As one nucleotide shift may impact the DNA repair differently, it is of high importance to investigate these mitochondrial mechanisms in more detail.

### 3. Materials and Methods

#### 3.1. The Substrate Oligonucleotides

The 40-mer oligonucleotides used in the study containing AP sites located on the opposite strand and distanced from 1 to 7 bases in both directions from cdPu were prepared as described previously [20]. Briefly, synthetic oligos were synthesized and HPLC-purified in the Bioorganic Chemistry Department of the Polish Academy of Science (Lodz, Poland) which was followed by mass spectrometry analysis. Their stability in the experimental conditions was also examined. Here, chosen duplexes were tested for their stability in the mitochondrial extracts (ME) to ensure no additional interactions with mitochondrial proteins fraction (Figure S1). Single-stranded oligonucleotides were 5'-end-labeled with 2  $\mu$ Ci of [ $\gamma$ - $^{32}$ P]ATP, hybridized with the suitable complementary strand (Table S1), and treated with uracil-DNA glycosylase (UDG) to convert 2'-deoxyuridine residues (dU) to the AP sites. It was followed by the human apurinic/aprimidinic endonuclease (hAPE1) treatment to confirm AP site formation (APE1 catalyzed the hydrolysis of DNA at AP sites creating single-strand breaks (SSB), which were observed as shorter oligo fragments on the gel). Each step of substrate preparation was verified on the 15% native or denaturing polyacrylamide gel, as reported previously [20]. The full sequences of oligonucleotides are presented in Supplementary Materials (Table S1).

#### 3.2. Preparation of the Mitochondrial Extracts

The ME was derived from the Ku80-deficient xrs5 cell line (X-ray sensitive Chinese hamster ovarian mutant cell line), which allows avoiding Ku80 binding to SSB or linear DNA termini. The cells were purchased from ATCC (CRL-2348, Manassas, VA, USA) and cultured in MEM medium (Gibco) with 10% FBS (Biowest, Riverside, MO, USA) supplementation. The cells were harvested in exponential phase and after pelleting, they were treated with Mitochondria Isolation Kit for Cultured Cells (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA) according to the manufacturer's protocol. The whole mitochondria fraction (WM) was stored at  $-80$  °C for no longer than 6 months. The extract was prepared immediately before use by addition of 100  $\mu$ L of the lysis buffer (300 mM KCl, 1% NP-40) and protease inhibitors (to final volume  $1\times$ , ThermoFisher, Rockville, IL, USA) to the pellet of WM, incubation in 4 °C for 60 min with occasional mixing and followed by centrifugation ( $13,000\times g$ , 4 °C, 5 min). The protein concentration in the obtained supernatants (ME) was tested using colorimetric Pierce<sup>TM</sup> 660 nm Protein Assay (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA) and was found at 18.0–19.0 mg/mL. To evaluate the quality of ME in the context of proteins involved in mtBER and to exclude the possibility of contamination with the nuclear BER proteins, the functional activity test of mitochondrial extract has been performed (Figure S14). The total repair activity of ME was assessed by comparison with total repair activity of the WM, nuclear extract (NE), and cytoplasmic extract (CE) of xrs5 cell line using Control 1 (ds-oligonucleotide with single AP site lesion). The NE and CE demonstrated enzymatic activities for strand incision, elongation, and reconstitution (CE showed also strand degradation resulting from exonucleolytic activity). The ME exhibited endonucleolytic and polymerase activity responsible for strand incision and

elongation, respectively (Figure S14). The WM showed no enzymatic activity, which led to the conclusion that no nuclear contamination was present in the sample prior to lysis of WM. Hence, enzymatic activities observed in ME repair assays were a consequence of mitochondrial protein release and described solely mitochondrial repair activity.

### 3.3. Repair Assays

The 5'-<sup>32</sup>P-end-labeled double-stranded oligonucleotides (200 cps) were incubated with 20 µg of ME. Titration studies were performed to determine the optimal amount of ME for the repair assays (data not shown). Reactions were carried out in repair buffer (70 mM Tris-HCl (pH 7.5), 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM DTT, 4 mM ATP, 40 mM phosphocreatine, 1.6 µg/mL phosphocreatine kinase, 0.1 mM dATP, 0.1 mM dCTP, 0.1 mM dGTP, and 0.1 mM dTTP) at 37 °C for 0, 0.5, 3, and 6 h. After the set time, reactions were stopped and examined via PAGE electrophoresis, as described previously [20]. All experiments were repeated three times for consistency and quantified as reported previously using Quantity One software [20]. Briefly, the activity of proteins was expressed as the percentage of the overall intensity of all bands observed within one lane; results were compared with Control 1 (containing only a single AP site, Table S1) to compensate for the slight differences in enzymatic activities between repeats.

## 4. Conclusions

Mitochondrial repair of clustered DNA lesions containing 5',8-cyclo-2'-deoxypurines is barely understood. Due to difficulties with investigating solely mitochondrial protein fractions many questions about their function remain unanswered. On the other hand, the repair of mtDNA is crucial for energy metabolism and cell survival. CdPus, as a potential biomarker of oxidative DNA damage, may be considered in the future as a diagnostic tool. As cdPus affect DNA structure, their presence in mtDNA can lead to impaired genome maintenance [10].

The model oligonucleotides containing CDL with AP site on one strand and cdPu on the complementary strand separated by 1–7 bp were investigated in this study. Here, it has been shown that the presence of cdPu influences the two initial stages of mtBER repair (strand incision and elongation) of the accompanying lesion (AP site) within the bi-stranded CDL. The results presented in this article are a valuable complement of observations noted for *xrs5* cells nuclear extracts [20].

1. In this study, it has been shown for the first time the efficiency of the initial mtBER steps depends on the distance between AP site and cdPus within bi-stranded CDL, and the type and diastereomeric form of the cdPu.
2. In all cases, mitochondrial strand incision and gap-filling were detected for AP sites accompanied by cdPus within bi-stranded CDL.
3. The strand incision step of mtBER was enhanced in the presence of cdPu within the cluster compared to Control 1 (single AP site).
4. AP site incision was more efficient when AP site was accompanied by RcdA or ScdG than by ScdA or RcdG.
5. The gap-filling step of mtBER was inhibited for AP sites located on the 5'-end side of cdPus while for AP sites located on the 3'-end side of cdPus was enhanced compared to Control 1 (single AP site).
6. AP sites located in positions denoted as dU0 and dU+1 inhibit endonuclease and polymerases activity in ME, which aligns with previous observations for NE [20].
7. Both investigated mtBER stages (strand incision and elongation) showed lower efficiency for AP sites located on the 5'-end side of cdPus, compared to those on the 3'-end side of cdPus. It may be assumed that mtBER is slowed down for AP sites located on the 5'-end side of cdPus.

The mtBER initiation is slower than in the nucleus probably due to the protein translocation from cytosol or intermembrane space before the starting point of the repair process.

Due to a low number of studies on mitochondrial proteins involved in mtBER, further studies are necessary. Despite the results we have managed to obtain and present, it remains unexplained why the presence of a specific isomer of individual cdPus at certain distances from another lesion in CDL facilitates/enables the performance of repair enzymes' functions and other positions have an inhibitory effect. Nevertheless, indicating which variants of CDL (cdPu type, isomer type, and interlesion distance within the cluster) and how they affect repair is a good starting point for further research, e.g., computational and structural analysis of DNA-protein complexes. It may especially contribute to the field of mitochondrial diseases that are connected to the formation of large amounts of hydroxyl radical that causes cdPu formation.

**Supplementary Materials:** The following are available online, Table S1: The sequences of double-stranded substrate oligonucleotides, Table S2: Endonuclease activity—Control 1. Raw numerical data, Table S3: Polymerase activity—Control 1. Raw numerical data, Table S4: Endonuclease activity—ScdA and RcdA. Raw numerical data, Table S5: Polymerase activity—ScdA and RcdA. Raw numerical data, Table S6: Endonuclease activity—ScdG and RcdG. Raw numerical data, Table S7: Polymerase activity—ScdG and RcdG. Raw numerical data, Figure S1: The stability of “matrix” oligonucleotides, Figures S2 and S3: The autoradiograms—ScdA and RcdA, Figures S4 and S5: Graphical representation of the results for ScdA and RcdA, Figure S6: Endonuclease activity [%] of ScdA vs. RcdA—comparison of individual strands, Figure S7: Polymerase activity [%] of ScdA vs. RcdA—comparison of individual strands, Figures S8 and S9: The autoradiograms—ScdG and RcdG, Figures S10 and S11: Graphical representation of the results for ScdG and RcdG, Figure S12: Endonuclease activity [%] of ScdG vs. RcdG—comparison of individual strands, Figure S13: Polymerase activity [%] of ScdG vs. RcdG—comparison of individual strands; Figure S14: Functional activity test of mitochondrial extracts.

**Author Contributions:** Conceptualization, B.T.K.; methodology, B.T.K.; validation, K.B., J.K.-B. and B.T.K.; formal analysis, K.B. and B.T.K.; investigation, K.B., J.K.-B. and B.T.K.; resources, J.K.-B. and B.T.K.; data curation, K.B. and B.T.K.; writing—original draft preparation, K.B.; writing—review and editing, K.B., J.K.-B. and B.T.K.; visualization, K.B.; supervision, B.T.K.; project administration, B.T.K.; funding acquisition, B.T.K. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This study was supported by the National Science Center, Poland (grant No. 2016/23/B/NZ7/03367).

**Institutional Review Board Statement:** Not applicable.

**Informed Consent Statement:** Not applicable.

**Data Availability Statement:** Not applicable.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

**Sample Availability:** Samples of the compounds are not available from the authors.

## References

1. 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*, 2857. [[CrossRef](#)]
2. Garcia, I.; Jones, E.; Ramos, M.; Innis-Whitehouse, W.; Gilkerson, R. The little big genome: The organization of mitochondrial DNA. *Front. Biosci. (Landmark)* **2017**, *22*, 710–721.
3. Wasilewski, M.; Chojnacka, K.; Chacinska, A. Protein trafficking at the crossroads to mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta—Mol. Cell Res.* **2017**, *1864*, 125–137. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Topf, U.; Uszczynska-Ratajczak, B.; Chacinska, A. Mitochondrial stress-dependent regulation of cellular protein synthesis. *J. Cell Sci.* **2019**, *132*, jcs226258. [[CrossRef](#)]
5. Sharma, P.; Sampath, H. Mitochondrial DNA integrity: Role in health and disease. *Cells* **2019**, *8*, 100. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. López-Lluch, G.; Santos-Ocaña, C.; Sánchez-Alcázar, J.A.; Fernández-Ayala, D.J.M.; Asencio-Salcedo, C.; Rodríguez-Aguilera, J.C.; Navas, P. Mitochondrial responsibility in ageing process: Innocent, suspect or guilty. *Biogerontology* **2015**, *16*, 599–620. [[CrossRef](#)]
7. Martín Giménez, V.M.; de las Heras, N.; Ferder, L.; Lahera, V.; Reiter, R.J.; Manucha, W. Potential effects of melatonin and micronutrients on mitochondrial dysfunction during a cytokine storm typical of oxidative/inflammatory diseases. *Diseases* **2021**, *9*, 30. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

8. Bader, G.; Enkler, L.; Araiso, Y.; Hemmerle, M.; Binko, K.; Baranowska, E.; de Craene, J.O.; Ruer-Laventie, J.; Pieters, J.; Tribouillard-Tanvier, D.; et al. Assigning mitochondrial localization of dual localized proteins using a yeast bi-genomic mitochondrial-split-Gfp. *eLife* **2020**, *9*, e56649. [[CrossRef](#)]
9. Lindahl, T. Instability and decay of the primary structure of DNA. *Nature* **1993**, *362*, 709–715. [[CrossRef](#)]
10. Karwowski, B.T.; Bellon, S.; O'Neill, P.; Lomax, M.E.; Cadet, J. Effects of (5'S)-5',8-Cyclo-2'-deoxyadenosine on the base excision repair of oxidatively generated clustered DNA damage. A Biochemical and theoretical study. *Org. Biomol. Chem.* **2014**, *12*, 8671–8682. [[CrossRef](#)]
11. Kuraoka, I.; Bender, C.; Romieu, A.; Cadet, J.; Wood, R.D.; Lindahl, T. 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. USA* **2000**, *97*, 3832–3837. [[CrossRef](#)]
12. Jaruga, P.; Dizdaroglu, M. 8,5'-Cyclopurine-2'-deoxynucleosides in DNA: Mechanisms of formation, measurement, repair and biological effects. *DNA Repair* **2008**, *7*, 1413–1425. [[CrossRef](#)]
13. Kusumoto, R.; Masutani, C.; Iwai, S.; Hanaoka, F. Translesion synthesis by human DNA polymerase  $\eta$  across thymine glycol lesions. *Biochemistry* **2002**, *41*, 6090–6099. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Brooks, P.J. The cyclopurine deoxynucleosides: DNA repair, biological effects, mechanistic insights, and unanswered questions. *Free Radic. Biol. Med.* **2017**, *107*, 90–100. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Jasti, V.P.; Das, R.S.; Hilton, B.A.; Weerasooriya, S.; Zou, Y.; Basu, A.K. (5'S)-8,5'-cyclo-2'-deoxyguanosine is a strong block to replication, a potent pol V-dependent mutagenic lesion, and is inefficiently repaired in *Escherichia coli*. *Biochemistry* **2011**, *50*, 3862–3865. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Jiang, Z.; Xu, M.; Lai, Y.; Laverde, E.E.; Terzidis, M.A.; Masi, A.; Chatgililoglu, C.; Liu, Y. Bypass of a 5',8-cyclopurine-2'-deoxynucleoside by DNA polymerase  $\beta$  during DNA replication and base excision repair leads to nucleotide misinsertions and DNA strand breaks. *DNA Repair* **2015**, *33*, 24–34. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Lomax, M.E.; Cunniffe, S.; O'Neill, P. Efficiency of repair of an abasic site within DNA clustered damage sites by mammalian cell nuclear extracts. *Biochemistry* **2004**, *43*, 11017–11026. [[CrossRef](#)]
18. David-Cordonniert, M.-H.; Laval, J.; O'Neil, P. Clustered DNA damage, influence on damage excision by XRS5 nuclear extracts and *Escherichia coli* Nth and Fpg proteins. *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 11865–11873. [[CrossRef](#)]
19. Eccles, L.J.; Menoni, H.; Angelov, D.; Lomax, M.E.; O'Neill, P. Efficient cleavage of single and clustered AP site lesions within mono-nucleosome templates by CHO-K1 nuclear extract contrasts with retardation of incision by purified APE1. *DNA Repair* **2015**, *35*, 27–36. [[CrossRef](#)]
20. Boguszewska, K.; Szewczuk, M.; Kaźmierczak-Barańska, J.; Karwowski, B.T. How (5'S) and (5'R) 5',8-cyclo-2'-deoxyapurines affect base excision repair of clustered DNA damage in nuclear extracts of Xrs5 cells? A biochemical study. *Cells* **2021**, *10*, 725. [[CrossRef](#)]
21. Karwowski, B.T. 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. *Cells* **2019**, *8*, 1303. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Izumi, T.; Mellon, I. *Base Excision Repair and Nucleotide Excision Repair*; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, 2016; ISBN 9780128033456.
23. Singatulina, A.S.; Pestryakov, P.E. Mechanisms of DNA repair in mitochondria. *Biopolym. Cell* **2016**, *32*, 245–261. [[CrossRef](#)]
24. Alexeyev, M.; Shokolenko, I.; Wilson, G.; LeDoux, S. The maintenance of mitochondrial DNA integrity—Critical analysis and update. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **2013**, *5*, a012641. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Omar García-Lepe, U.; Ma Bermúdez-Cruz, R. Mitochondrial genome maintenance: Damage and repair pathways. In *DNA Repair—An Update*; IntechOpen: London, UK, 2019.
26. Karwowski, B.T. (5'S) 5',8-cyclo-2'-deoxyadenosine cannot stop BER. Clustered DNA lesion studies. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 5934. [[CrossRef](#)]
27. Jaruga, P.; Rozalski, R.; Jawien, A.; Migdalski, A.; Olinski, R.; Dizdaroglu, M. DNA damage products (5'R)- and (5'S)-8,5'-cyclo-2'-deoxyadenosines as potential biomarkers in human urine for atherosclerosis. *Biochemistry* **2012**, *51*, 1822–1824. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Kant, M.; Akış, M.; Çalan, M.; Arkan, T.; Bayraktar, F.; Dizdaroglu, M.; İşlekel, H. Elevated urinary levels of 8-oxo-2'-deoxyguanosine, (5'R)- and (5'S)-8,5'-cyclo-2'-deoxyadenosines, and 8-iso-prostaglandin F2 $\alpha$  as potential biomarkers of oxidative stress in patients with prediabetes. *DNA Repair* **2016**, *48*, 1–7. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
29. Jaruga, P.; Dizdaroglu, M. Identification and quantification of (5'R)- and (5'S)-8,5'-cyclo-2'-deoxyadenosines in human urine as putative biomarkers of oxidatively induced damage to DNA. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2010**, *397*, 48–52. [[CrossRef](#)]
30. Chacinska, A.; Koehler, C.M.; Milenkovic, D.; Lithgow, T.; Pfanner, N. Importing mitochondrial proteins: Machineries and mechanisms. *Cell* **2009**, *138*, 628–644. [[CrossRef](#)]
31. Barchiesi, A.; Bazzani, V.; Tolotto, V.; Elancheliyan, P.; Wasilewski, M.; Chacinska, A.; Vascotto, C. Mitochondrial oxidative stress induces rapid intermembrane space/matrix translocation of apurinic/aprimidinic endonuclease 1 protein through TIM23 complex. *J. Mol. Biol.* **2020**, *432*, 166713. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Pednekar, V.; Weerasooriya, S.; Jasti, V.P.; Basu, A.K. Mutagenicity and genotoxicity of (5'S)-8,5'-cyclo-2'-deoxyadenosine in *Escherichia coli* and replication of (5'S)-8,5'-cyclopurine-2'-deoxynucleosides in vitro by DNA polymerase IV, *exo-free* Klenow fragment, and Dpo4. *Chem. Res. Toxicol.* **2014**, *27*, 200–210. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]



33. Xu, M.; Lai, Y.; Jiang, Z.; Terzidis, M.A.; Masi, A.; Chatgialloglu, C.; Liu, Y. A 5', 8-cyclo-2'-deoxypurine lesion induces trinucleotide repeat deletion via a unique lesion bypass by DNA polymerase  $\beta$ . *Nucleic Acids Res.* **2014**, *42*, 13749–13763. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Krasich, R.; Copeland, W.C. DNA Polymerases in the mitochondria: A critical review of the evidence. *Front. Biosci.* **2017**, *22*, 692–709. [[CrossRef](#)]
35. Baptiste, B.A.; Baringer, S.L.; Kulikowicz, T.; Sommers, J.A.; Croteau, D.L.; Brosh, R.M.; Bohr, V.A. DNA polymerase  $\beta$  outperforms DNA polymerase  $\gamma$  in key mitochondrial base excision repair activities. *DNA Repair* **2021**, *99*, 103050. [[CrossRef](#)]

**The influence of 5',8-cyclo-2'-deoxypurines on the mitochondrial repair of clustered DNA damage in xrs5 cells. The preliminary study.**

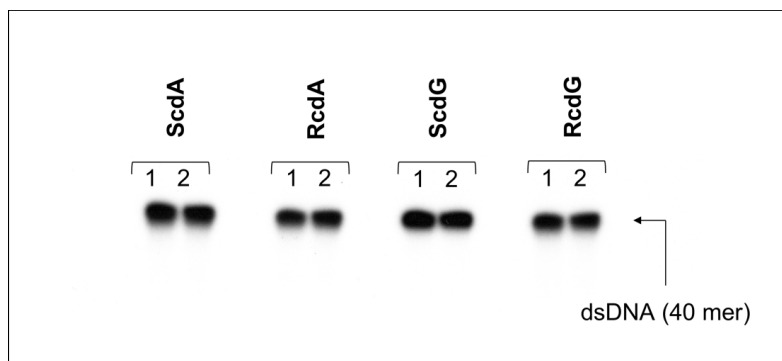
Supplementary Materials

Page	Item	Title
2	<b>Table S1</b>	The sequences of double-stranded substrate oligonucleotides.
3	<b>Figure S1</b>	The stability of „matrix“ oligonucleotides.
4	<b>Table S2</b>	Endonuclease activity – Control 1. Raw numerical data.
4	<b>Table S3</b>	Polymerase activity – Control 1. Raw numerical data.
5	<b>Figure S2</b>	The autoradiograms – ScdA.
6	<b>Figure S3</b>	The autoradiograms – RcdA.
7	<b>Table S4</b>	Endonuclease activity – ScdA and RcdA. Raw numerical data.
8	<b>Table S5</b>	Polymerase activity – ScdA and RcdA. Raw numerical data.
9-10	<b>Figure S4</b>	Graphical representation of the results for ScdA.
10-11	<b>Figure S5</b>	Graphical representation of the results for RcdA.
12-15	<b>Figure S6</b>	Endonuclease activity [%] of ScdA vs. RcdA – comparison of individual strands.
16-19	<b>Figure S7</b>	Polymerase activity [%] of ScdA vs. RcdA – comparison of individual strands.
20	<b>Figure S8</b>	The autoradiograms – ScdG.
21	<b>Figure S9</b>	The autoradiograms – RcdG.
22	<b>Table S6</b>	Endonuclease activity – ScdG and RcdG. Raw numerical data.
23	<b>Table S7</b>	Polymerase activity – ScdG and RcdG. Raw numerical data.
24-25	<b>Figure S10</b>	Graphical representation of the results for ScdG.
25-26	<b>Figure S11</b>	Graphical representation of the results for RcdG.
27-30	<b>Figure S12</b>	Endonuclease activity [%] of ScdG vs. RcdG – comparison of individual strands.
30-34	<b>Figure S13</b>	Polymerase activity [%] of ScdG vs. RcdG – comparison of individual strands.
35	<b>Figure S14</b>	Functional activity test of mitochondrial extract.

**Table S1.** The sequences of double-stranded substrate oligonucleotides containing 2'-deoxyuridine (dU) and 5',8-cyclo-2'-deoxyadenosine (cdA) or 5',8-cyclo-2'-deoxyguanosine (cdG).

Oligonucleotide	Sequence
ScdA / RcdA	Control 1 *5'-CTCTTGTCAGGAATATTGTCUCTATGCTCCCACCAAAGGC-3' 3'-GAGAACAGTCCTTATAACAGAGATACGAGGGTGGTTTCCG-5'
	Control 2 *5'-GCCTTTGGTGGGAGCATAGXGACAATATTCCTGACAAGAG-3' 3'-CGGAAACCACCCCTCGTATCTCTGTTATAAGGACTGTTCTC-5'
	dU -7 *5'-CTCTTGTCAGGAATATTGTCUCTATGCTCCCACCAAAGGC-3' 3'-GAGAACAGTCCTTATAACAGXGATACGAGGGTGGTTTCCG-5'
	dU -4 *5'-CTCTTGTCAGGAATATUGTCTCTATGCTCCCACCAAAGGC-3' 3'-GAGAACAGTCCTTATAACAGXGATACGAGGGTGGTTTCCG-5'
	dU -1 *5'-CTCTTGTCAGGAATATTGTUUCTATGCTCCCACCAAAGGC-3' 3'-GAGAACAGTCCTTATAACAGXGATACGAGGGTGGTTTCCG-5'
	dU 0 *5'-CTCTTGTCAGGAATATTGTCUCTATGCTCCCACCAAAGGC-3' 3'-GAGAACAGTCCTTATAACAGXGATACGAGGGTGGTTTCCG-5'
	dU +1 *5'-CTCTTGTCAGGAATATTGTCUATGCTCCCACCAAAGGC-3' 3'-GAGAACAGTCCTTATAACAGXGATACGAGGGTGGTTTCCG-5'
	dU +4 *5'-CTCTTGTCAGGAATATTGTCCTAUGCTCCCACCAAAGGC-3' 3'-GAGAACAGTCCTTATAACAGXGATACGAGGGTGGTTTCCG-5'
	dU +7 *5'-CTCTTGTCAGGAATATTGTCCTATGCUCCCACCAAAGGC-3' 3'-GAGAACAGTCCTTATAACAGXGATACGAGGGTGGTTTCCG-5'
	ScdG / RcdG
Control 2 *5'-GCCTTTGGTGGGAGCATAGYGACAATATTCCTGACAAGAG-3' 3'-CGGAAACCACCCCTCGTATCTCTGTTATAAGGACTGTTCTC-5'	
dU -7 *5'-CTCTTGTCAGGAATATTGTCCTATGCTCCCACCAAAGGC-3' 3'-GAGAACAGTCCTTATAACAGYGATACGAGGGTGGTTTCCG-5'	
dU -4 *5'-CTCTTGTCAGGAATATUGTCCCTATGCTCCCACCAAAGGC-3' 3'-GAGAACAGTCCTTATAACAGYGATACGAGGGTGGTTTCCG-5'	
dU -1 *5'-CTCTTGTCAGGAATATTGTUCCCTATGCTCCCACCAAAGGC-3' 3'-GAGAACAGTCCTTATAACAGYGATACGAGGGTGGTTTCCG-5'	
dU 0 *5'-CTCTTGTCAGGAATATTGTCUCTATGCTCCCACCAAAGGC-3' 3'-GAGAACAGTCCTTATAACAGYGATACGAGGGTGGTTTCCG-5'	
dU +1 *5'-CTCTTGTCAGGAATATTGTCCUATGCTCCCACCAAAGGC-3' 3'-GAGAACAGTCCTTATAACAGYGATACGAGGGTGGTTTCCG-5'	
dU +4 *5'-CTCTTGTCAGGAATATTGTCCCTAUGCTCCCACCAAAGGC-3' 3'-GAGAACAGTCCTTATAACAGYGATACGAGGGTGGTTTCCG-5'	
dU +7 *5'-CTCTTGTCAGGAATATTGTCCTATGCUCCCACCAAAGGC-3' 3'-GAGAACAGTCCTTATAACAGYGATACGAGGGTGGTTTCCG-5'	

U – represents dU as an AP site (after treatment with UDG); X – represents (5'S)-5',8-cyclo-2'-deoxyadenosine (ScdA) or (5'R)-5',8-cyclo-2'-deoxyadenosine (RcdA); Y – represents (5'S)-5',8-cyclo-2'-deoxyguanosine (ScdG) or (5'R)-5',8-cyclo-2'-deoxyguanosine (RcdG); \* – represents the 5'-end-labeled strand with [ $\gamma$ - $^{32}$ P]ATP



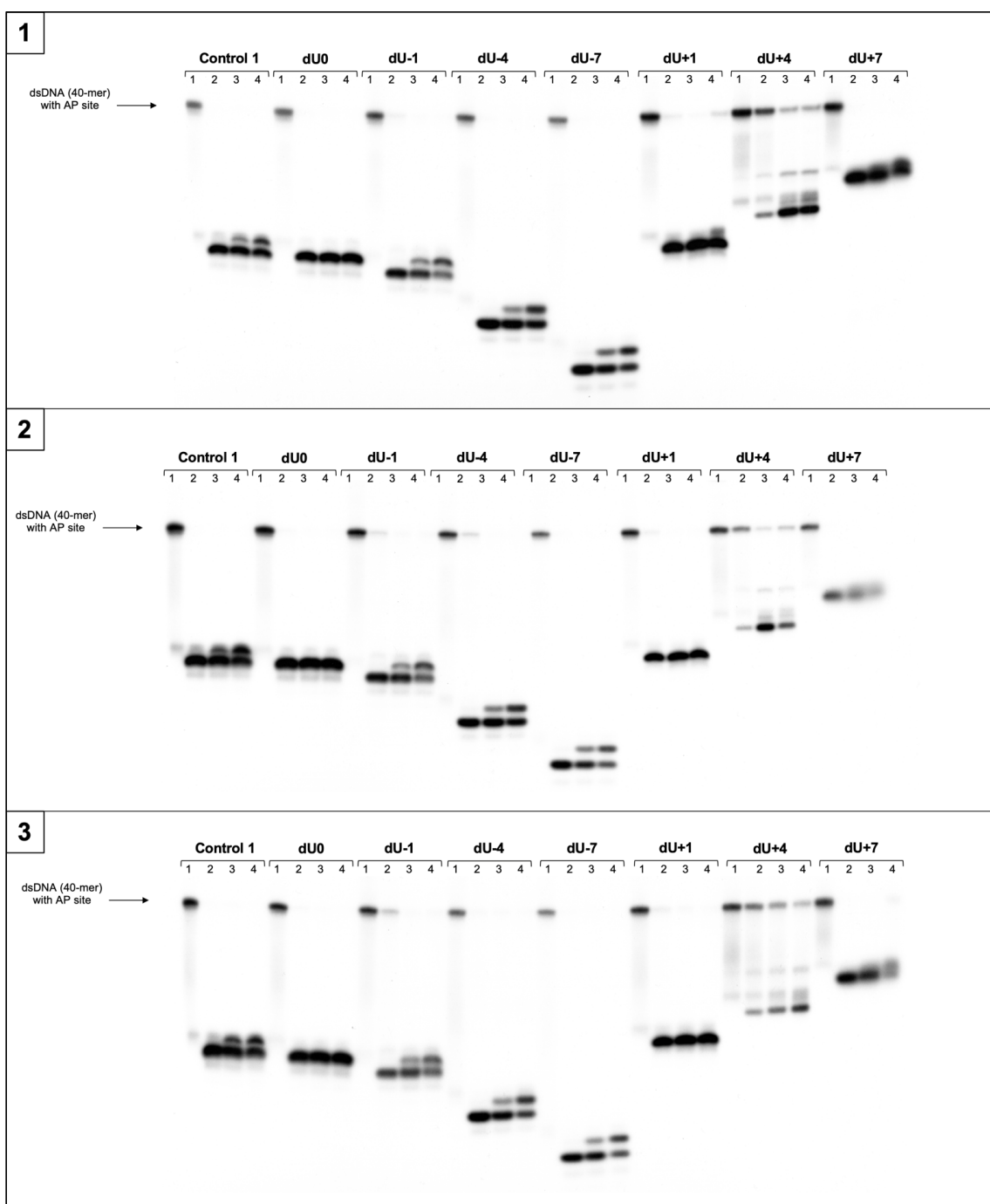
**Figure S1.** The stability of „matrix” oligonucleotides (Control 2) after treatment with 20  $\mu$ g of mitochondrial extracts (ME). Each lane number corresponds with different assay time: lane 1 - 0 min; lane 2 - 6 h.

**Table S2.** Endonuclease activity – Control 1. Raw numerical data of densitometry.

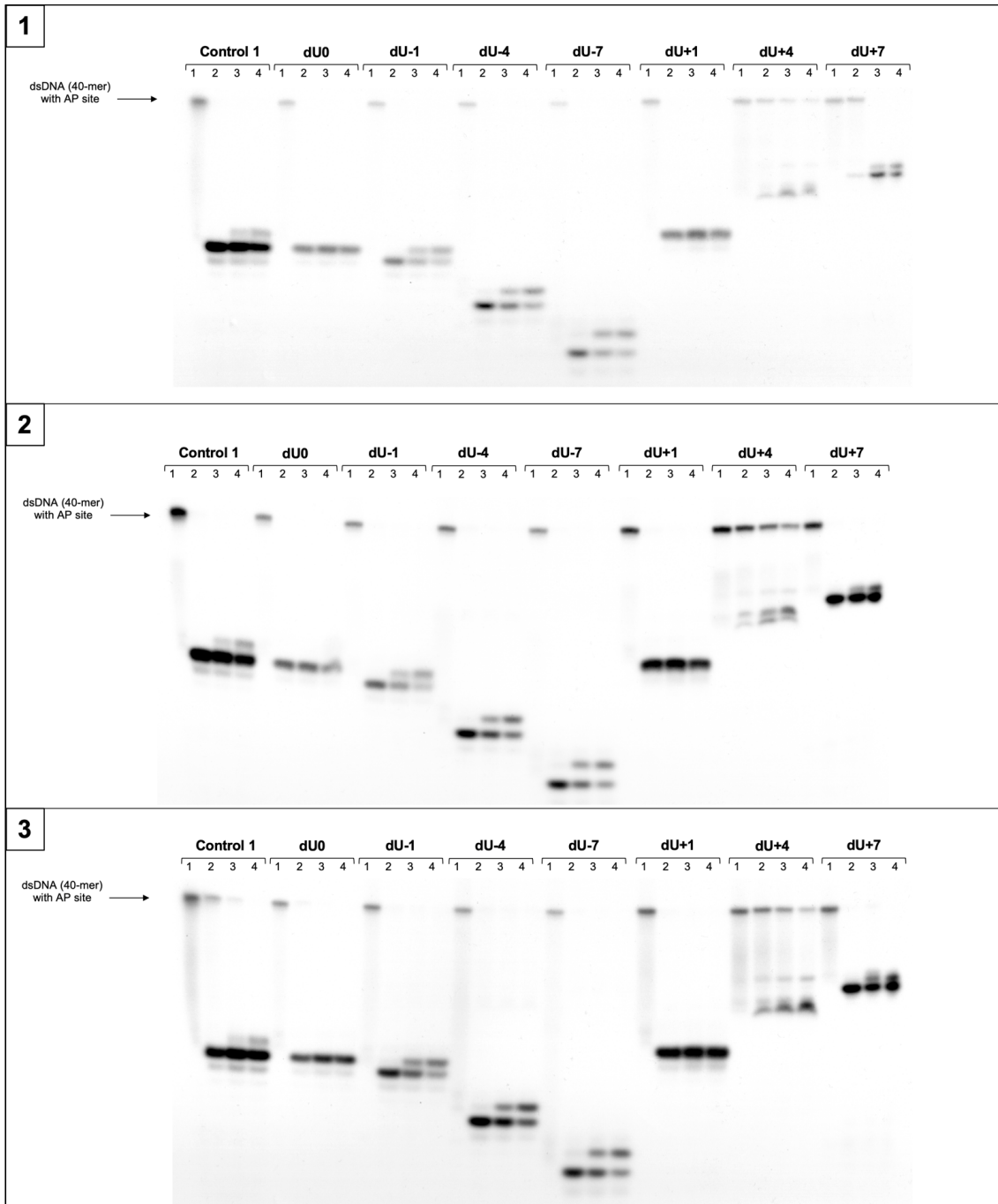
Strand	Data set	Time [h]			
		0	0,5	3	6
Control 1		Endonuclease activity [%]			
	1.	1,39	85,92	75,75	72,41
	2.	0,94	82,68	76,83	71,90
	3.	0,31	77,43	73,06	69,80
	4.	0,76	84,68	69,47	59,11
	5.	2,67	70,72	59,86	55,64
	6.	2,42	72,21	62,02	52,42
	7.	1,41	87,65	61,08	51,19
	8.	0,09	74,09	63,99	54,96
	9.	0,00	99,06	83,54	53,02
	Avg	1,35	71,92	63,98	55,75
SD	1,66	21,93	13,23	11,42	

**Table S3.** Polymerase activity – Control 1. Raw numerical data of densitometry.

Strand	Data set	Time [h]			
		0	0,5	3	6
Control 1		Polymerase activity [%]			
	1.	0,00	0,65	12,74	19,65
	2.	0,00	2,07	10,48	19,27
	3.	0,00	0,93	11,08	18,72
	4.	0,04	11,23	26,32	37,15
	5.	0,00	12,05	29,14	34,96
	6.	0,58	6,65	33,60	44,75
	7.	0,00	6,83	35,72	46,86
	8.	0,00	4,75	33,87	44,15
	9.	0,00	0,00	16,28	46,54
	Avg	0,18	5,88	21,65	35,16
SD	0,47	5,06	10,36	10,53	



**Figure S2.** The autoradiograms of denaturing PAGE presenting dsDNA containing clustered damage with AP site in one strand and **ScdA** in the opposing strand. Each lane number indicates different assay time: lane 1 - 0 min; lane 2 - 30 min; lane 3 - 3h; lane 4 - 6h. Three experimental replications are presented.



**Figure S3.** The autoradiograms of denaturing PAGE presenting dsDNA containing clustered damage with AP site in one strand and **RcdA** in the opposing strand. Each lane number indicates different assay time: lane 1 - 0 min; lane 2 - 30 min; lane 3 - 3h; lane 4 - 6h. Three experimental replications are presented.

**Table S4.** Endonuclease activity – ScdA and RcdA. Raw numerical data of densitometry obtained from Quantity One software.

RcdA		Time [h]				ScdA		Time [h]			
		0	0,5	3	6			0	0,5	3	6
Strand	Data set	Endonuclease activity [%]				Strand	Data set	Endonuclease activity [%]			
dU0	1.	7,61	86,52	89,54	90,68	dU0	1.	2,41	88,36	87,17	86,87
	2.	4,81	98,53	96,19	99,53		2.	1,44	77,19	77,40	75,55
	3.	3,20	91,53	88,33	87,08		3.	2,14	79,23	77,70	77,85
	Avg	5,21	92,19	91,36	92,43		Avg	2,00	81,60	80,76	80,09
	SD	2,23	6,03	4,23	6,41		SD	0,50	5,95	5,56	5,98
dU-1	1.	0,00	87,13	62,86	45,04	dU-1	1.	3,56	88,02	65,01	45,92
	2.	3,74	99,08	63,51	41,13		2.	1,05	80,86	64,94	47,48
	3.	3,22	81,02	56,42	38,95		3.	2,88	71,05	60,36	45,25
	Avg	2,32	89,08	60,93	41,71		Avg	2,49	79,98	63,44	46,22
	SD	2,02	9,19	3,92	3,09		SD	1,30	8,52	2,66	1,14
dU-4	1.	0,73	95,03	57,62	51,65	dU-4	1.	0,67	89,55	70,80	54,20
	2.	0,00	93,20	67,45	42,47		2.	3,06	87,27	70,39	53,73
	3.	0,74	82,65	64,73	45,40		3.	2,71	88,65	67,32	46,49
	Avg	0,49	90,29	63,27	46,51		Avg	2,15	88,49	69,51	51,47
	SD	0,43	6,68	5,07	4,69		SD	1,29	1,15	1,90	4,32
dU-7	1.	0,00	95,96	63,85	36,73	dU-7	1.	0,00	90,35	64,23	49,59
	2.	0,00	91,19	51,46	37,67		2.	0,96	96,02	68,46	47,22
	3.	4,12	84,93	57,76	37,93		3.	0,91	90,48	70,07	45,66
	Avg	1,37	90,69	57,69	37,44		Avg	0,62	92,28	67,59	47,49
	SD	2,38	5,53	6,20	0,63		SD	0,54	3,23	3,01	1,98
dU+1	1.	0,00	92,47	93,24	93,30	dU+1	1.	0,78	81,26	80,73	67,58
	2.	0,31	92,08	89,43	90,11		2.	0,52	90,49	88,68	87,66
	3.	2,83	86,40	80,96	83,67		3.	1,79	83,76	81,79	82,84
	Avg	1,05	90,32	87,88	89,03		Avg	1,03	85,17	83,73	79,36
	SD	1,55	3,40	6,28	4,91		SD	0,67	4,77	4,32	10,48
dU+4	1.	0,00	25,71	61,62	73,62	dU+4	1.	1,27	32,49	65,11	57,37
	2.	7,21	40,17	69,62	56,70		2.	0,10	31,21	82,32	67,64
	3.	2,19	29,95	48,10	62,93		3.	0,91	33,91	48,46	59,19
	Avg	3,13	31,94	59,78	64,41		Avg	0,76	32,53	65,30	61,40
	SD	3,69	7,44	10,88	8,56		SD	0,60	1,35	16,93	5,48
dU+7	1.	0,34	87,41	80,41	72,03	dU+7	1.	0,59	80,00	64,00	59,18
	2.	2,91	26,95*	79,84	60,60		2.	0,44	87,73	74,19	74,76
	3.	1,68	78,77	66,97	63,10		3.	0,64	76,63	72,02	57,54
	Avg	1,64	83,09	75,74	65,24		Avg	0,56	81,45	70,07	63,82
	SD	1,29	6,11	7,60	6,01		SD	0,10	5,69	5,37	9,50

\* Rejected values

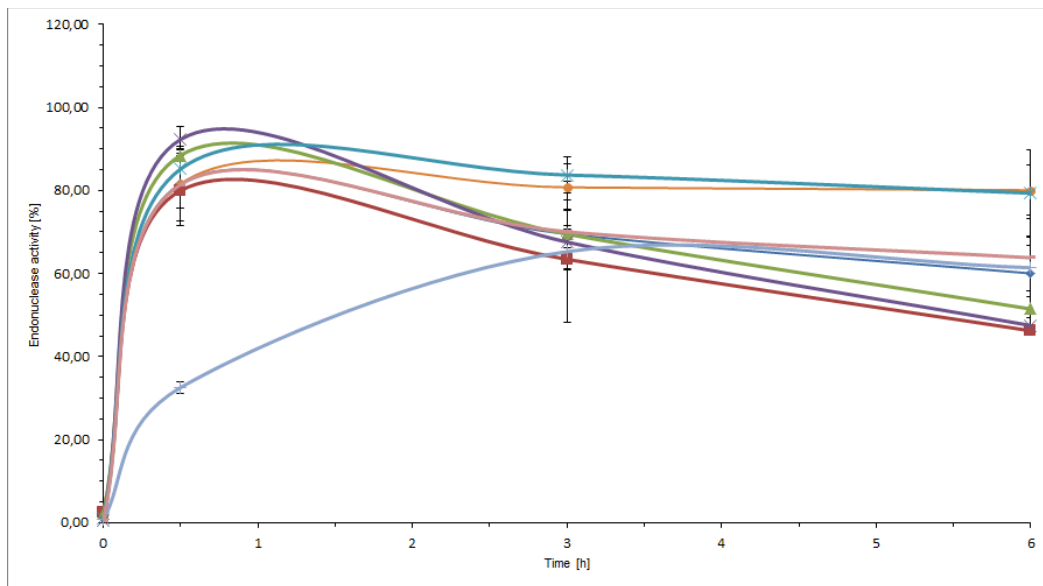
**Table S5.** Polymerase activity – ScdA and RcdA. Raw numerical data of densitometry obtained from Quantity One software.

RcdA		Time [h]				ScdA		Time [h]			
		0	0,5	3	6			0	0,5	3	6
Strand	Data set	Polymerase activity [%]				Strand	Data set	Polymerase activity [%]			
dU0	1.	0,00	0,00	0,35	0,21	dU0	1.	0,32	2,87	2,90	3,66
	2.	0,00	0,00	0,00	0,00		2.	1,54	8,52	7,47	7,15
	3.	3,12*	0,00	1,31	2,91		3.	0,13	6,68	7,33	6,79
	Avg	0,00	0,00	0,55	1,04		Avg	0,66	6,02	5,90	5,87
	SD	0,00	0,00	0,68	1,62		SD	0,77	2,88	2,60	1,92
dU-1	1.	0,00	3,73	30,12	49,29	dU-1	1.	0,42	4,56	30,46	50,70
	2.	0,00	0,00	36,19	57,94		2.	0,86	5,70	25,38	46,47
	3.	0,00	6,30	34,10	52,86		3.	1,11	8,38	31,89	49,70
	Avg	0,00	3,34	33,47	53,36		Avg	0,80	6,21	29,24	48,95
	SD	0,00	3,17	3,08	4,35		SD	0,35	1,96	3,42	2,21
dU-4	1.	0,00	1,55	38,17	45,40	dU-4	1.	0,90	2,70	24,24	42,55
	2.	0,00	0,00	27,19	54,04		2.	0,66	3,00	25,33	43,93
	3.	0,00	7,10	27,82	48,87		3.	2,97	4,98	28,10	49,66
	Avg	0,00	2,88	31,06	49,43		Avg	1,51	3,56	25,89	45,38
	SD	0,00	3,74	6,17	4,35		SD	1,27	1,24	1,99	3,77
dU-7	1.	0,00	0,00	32,73	58,42	dU-7	1.	0,01	3,33	31,98	47,54
	2.	0,00	5,12	45,94	58,37		2.	0,00	1,60	29,74	51,25
	3.	0,00	6,34	33,68	54,37		3.	1,75	3,22	25,10	50,76
	Avg	0,00	3,82	37,45	57,05		Avg	0,59	2,72	28,94	49,85
	SD	0,00	3,36	7,37	2,32		SD	1,01	0,97	3,51	2,02
dU+1	1.	0,00	0,00	0,00	0,00	dU+1	1.	0,33	10,39	11,30	21,02
	2.	0,00	0,00	0,42	0,39		2.	0,00	5,03	2,41	3,04
	3.	0,00	2,67	1,89	1,15		3.	0,00	9,27	12,35	9,56
	Avg	0,00	0,89	0,77	0,51		Avg	0,11	8,23	8,69	11,21
	SD	0,00	1,54	1,00	0,58		SD	0,19	2,83	5,46	9,10
dU+4	1.	8,18*	4,33	4,30	4,54	dU+4	1.	0,02	0,13	22,57	29,00
	2.	0,66	12,15	14,27	28,59		2.	0,02	4,48	12,01	16,42
	3.	0,41	19,59	24,36	19,79		3.	0,10	11,82	17,86	24,27
	Avg	0,54	12,02	14,31	17,64		Avg	0,05	5,48	17,48	23,23
	SD	0,18	7,63	10,03	12,17		SD	0,04	5,91	5,29	6,35
dU+7	1.	2,41	1,25	14,82	22,23	dU+7	1.	0,26	18,49	33,96	39,46
	2.	1,98	5,72	17,34	37,97		2.	0,32	8,08	16,15	13,24
	3.	0,46	14,64	25,45	32,31		3.	2,46	16,21	18,78	34,44
	Avg	1,62	7,20	19,20	30,84		Avg	1,02	14,26	22,97	29,05
	SD	1,03	6,82	5,55	7,97		SD	1,25	5,47	9,61	13,92

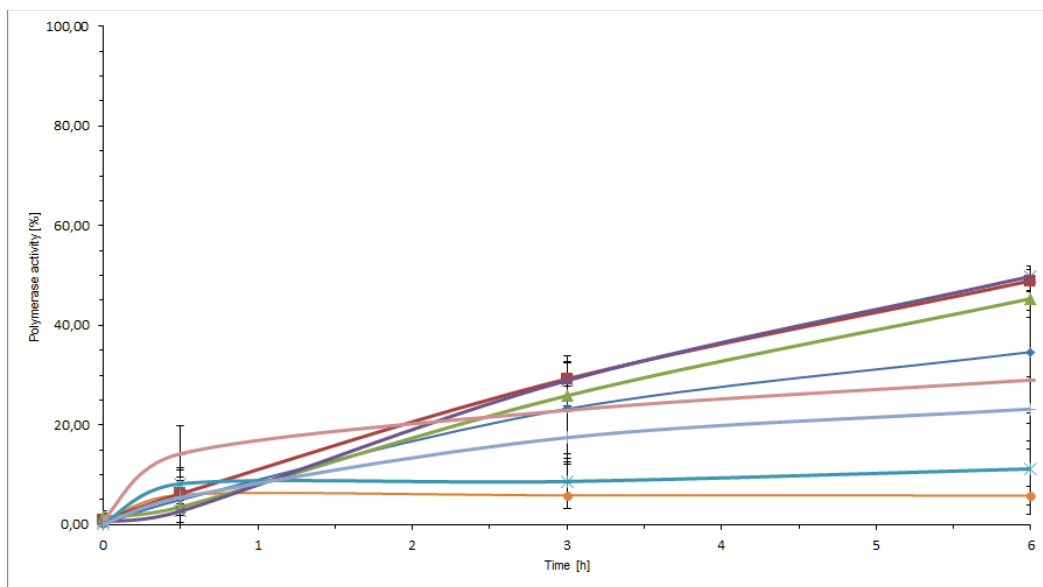
\* Rejected values



A.



B.



C.

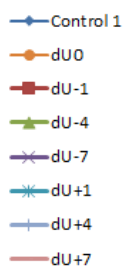
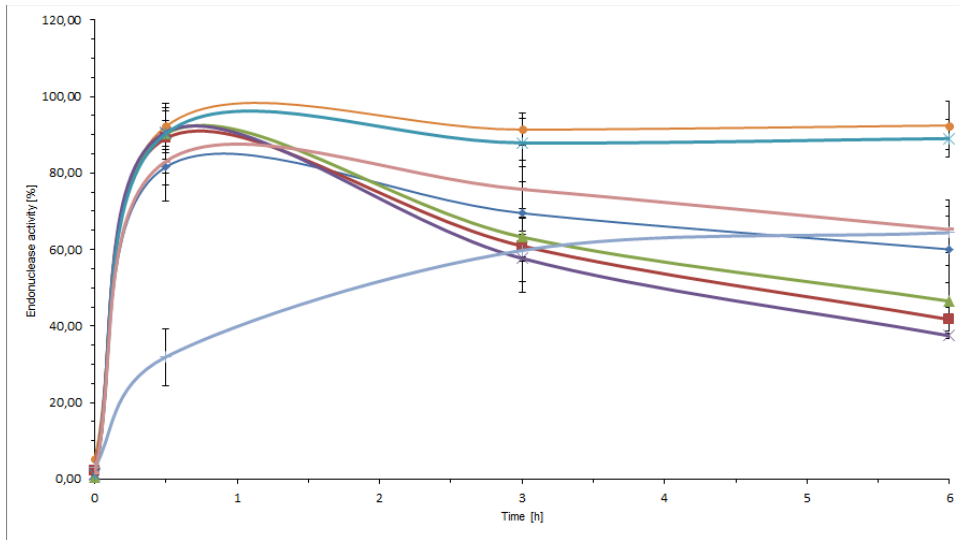
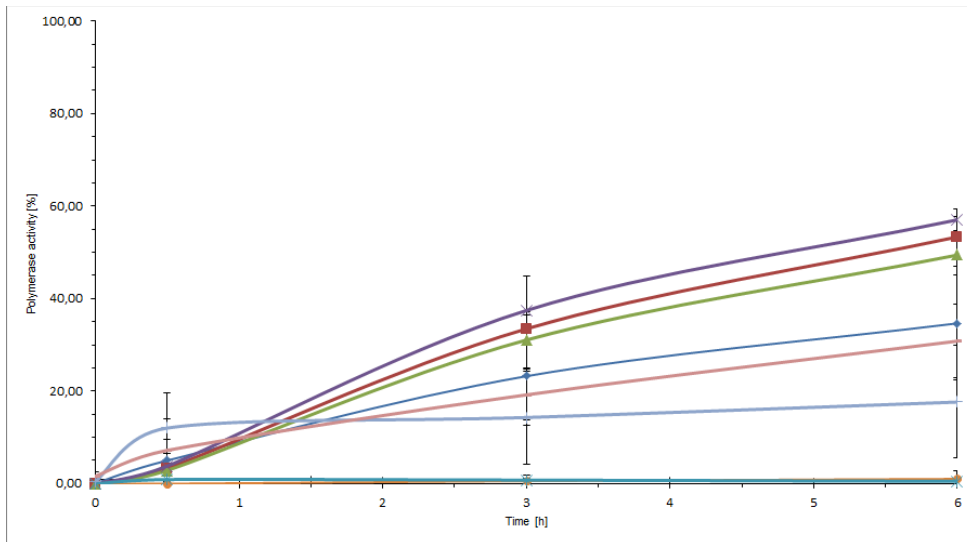


Figure S4. Graphical representation of the results for ScdA. (A) endonuclease activity +SD, (B) polymerase activity +SD; (C) figure legend.

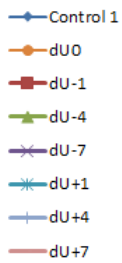
A.



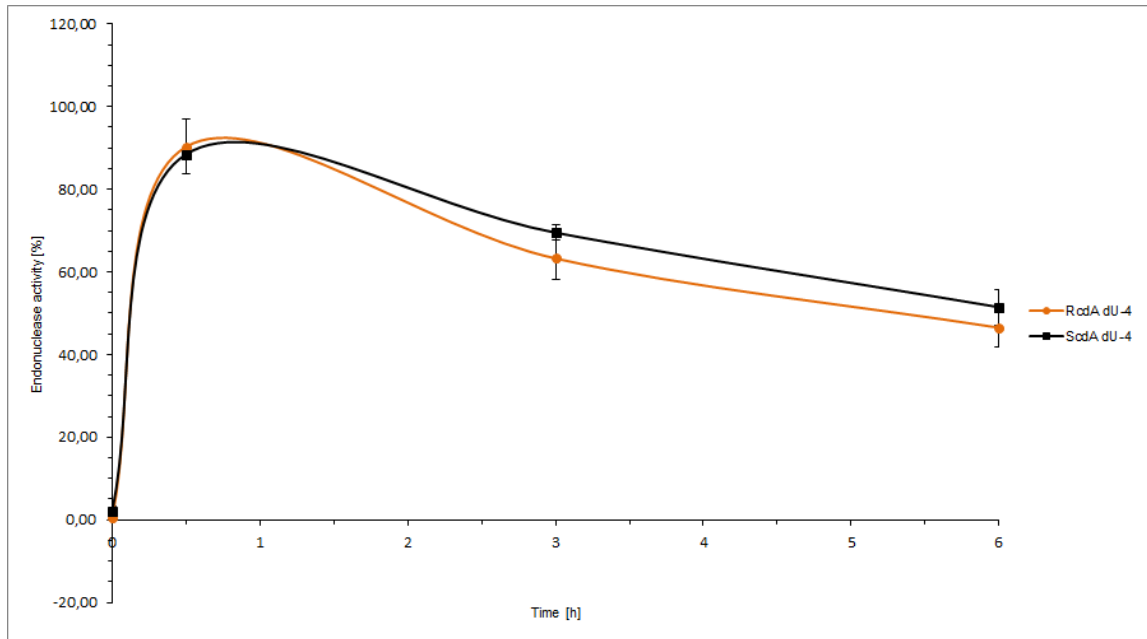
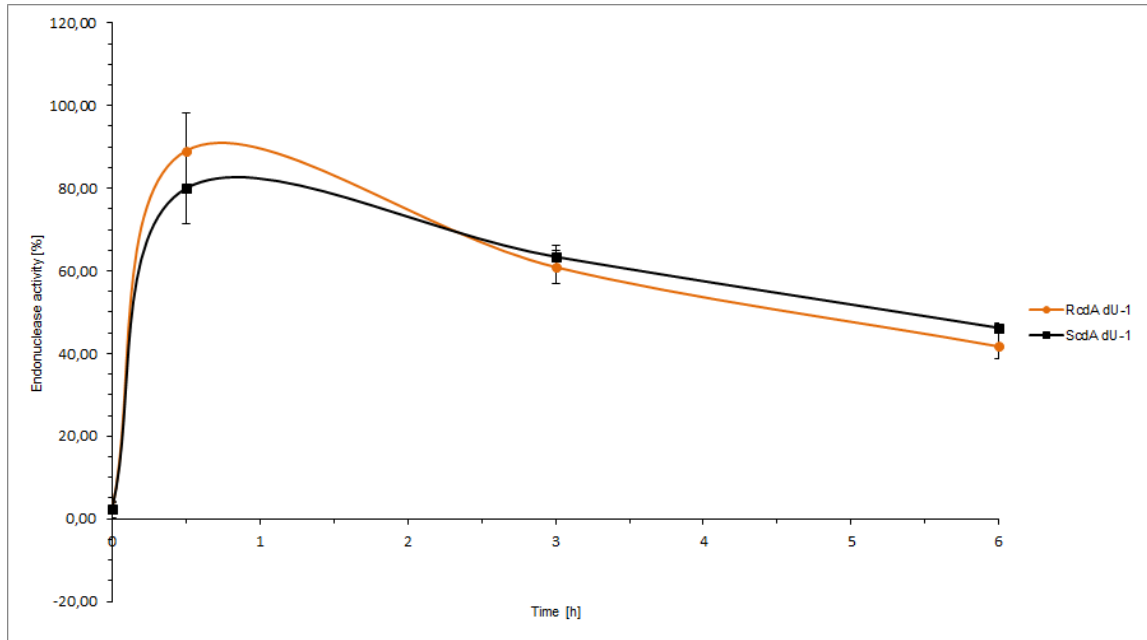
B.

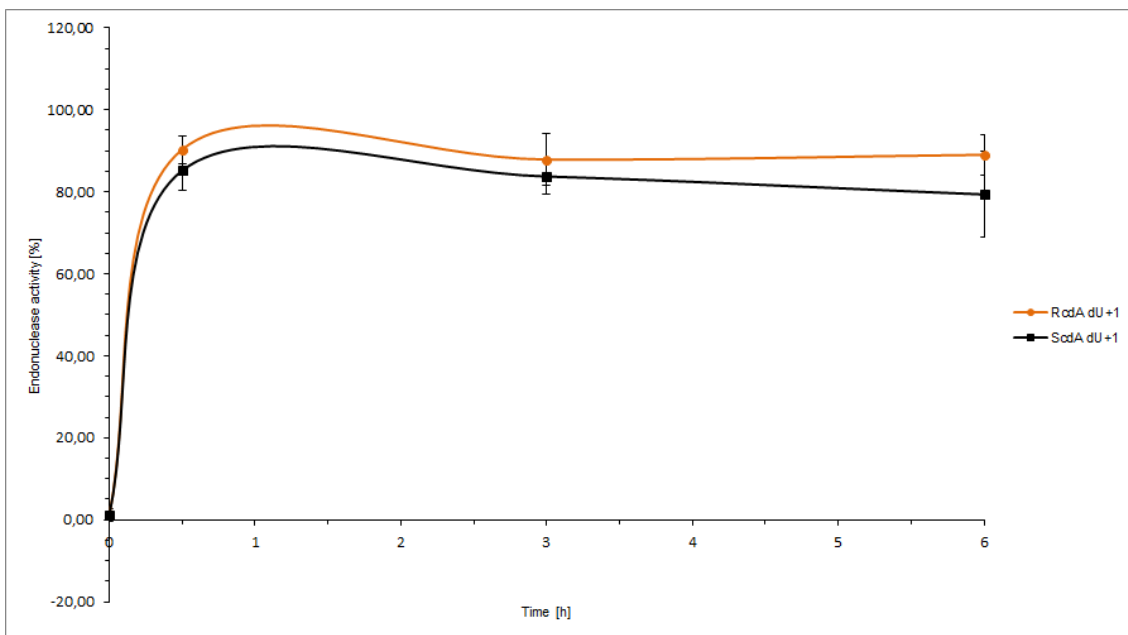
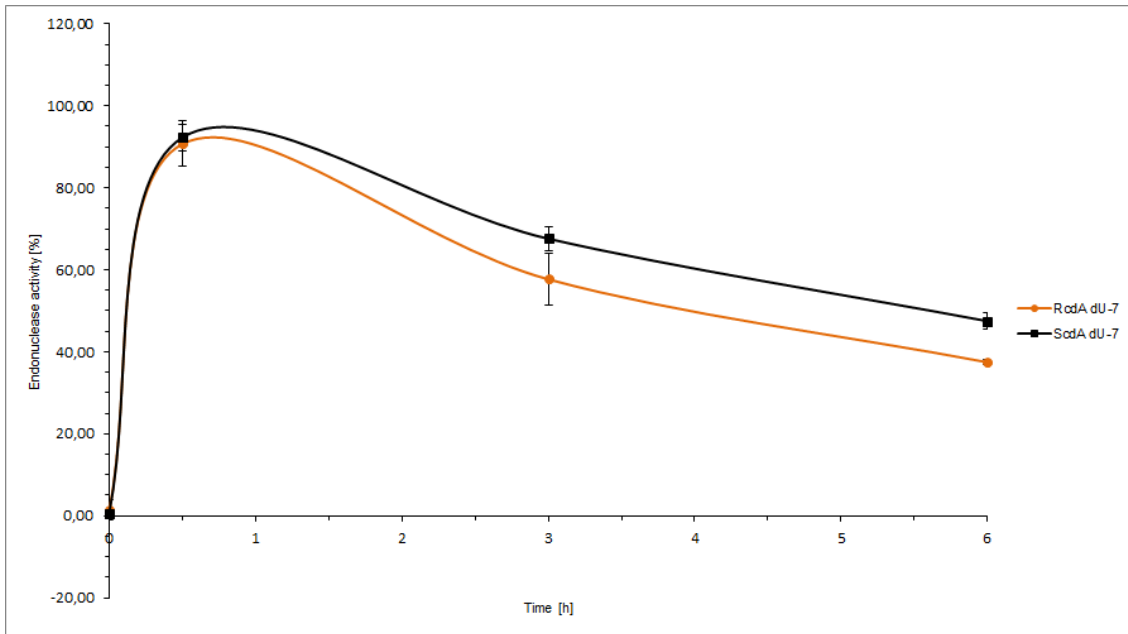


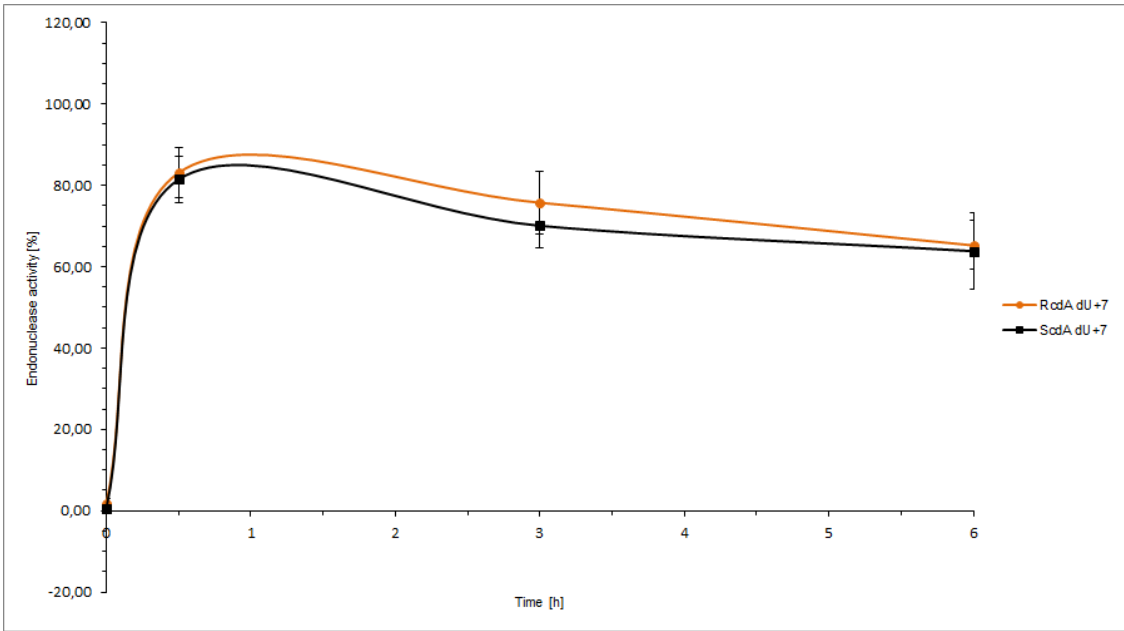
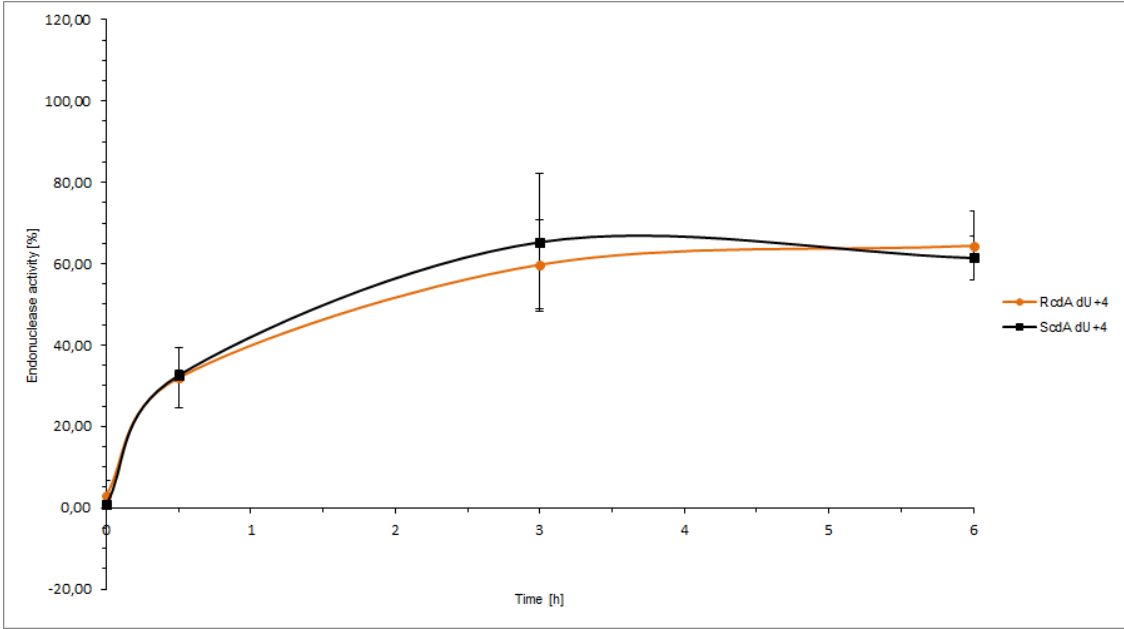
C.

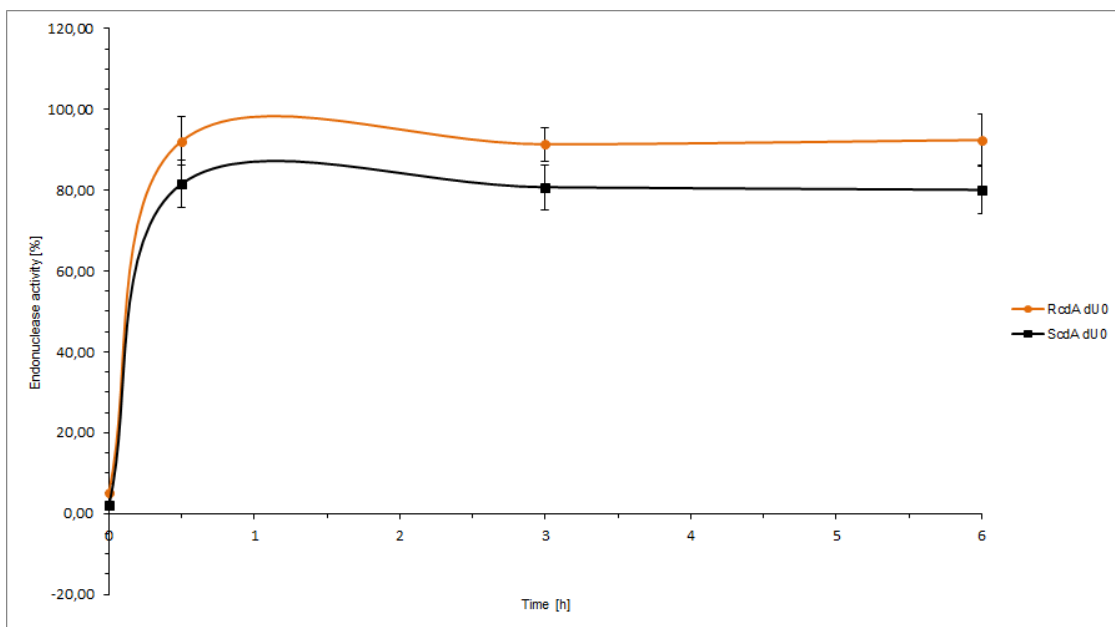


**Figure S5.** Graphical representation of the results for RcdA. (A) endonuclease activity +SD, (B) polymerase activity + SD; (C) figure legend.

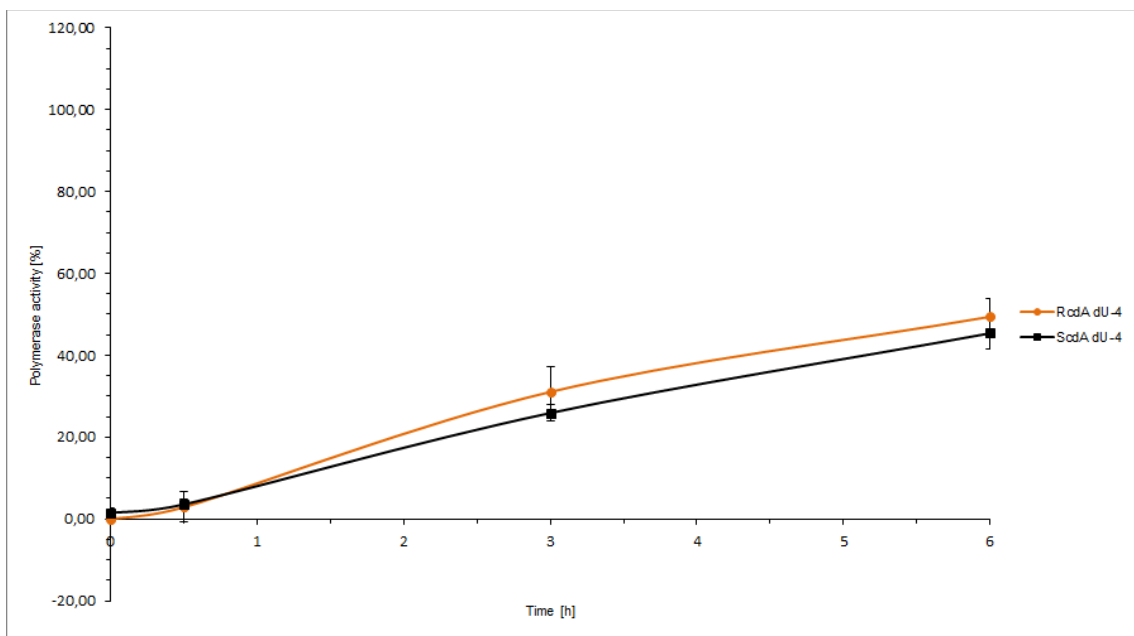
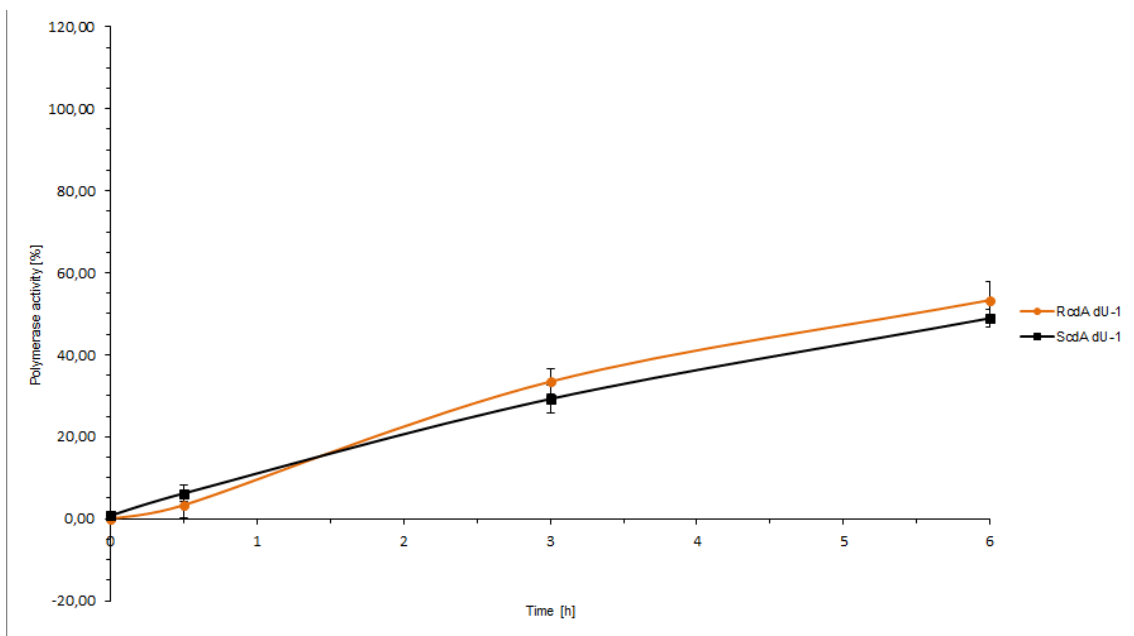


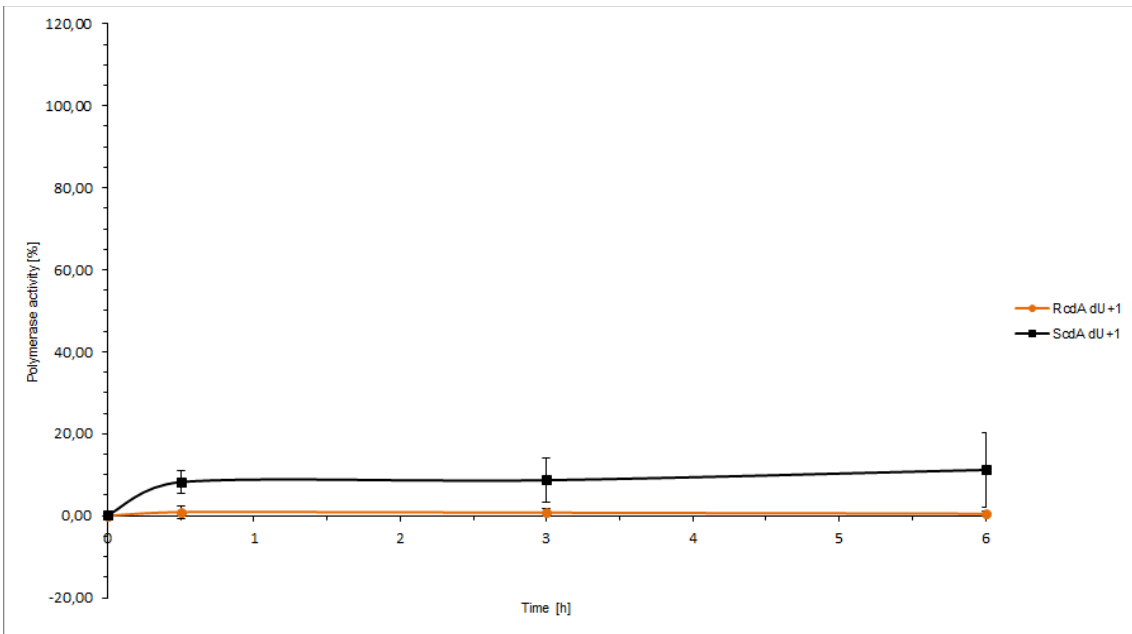
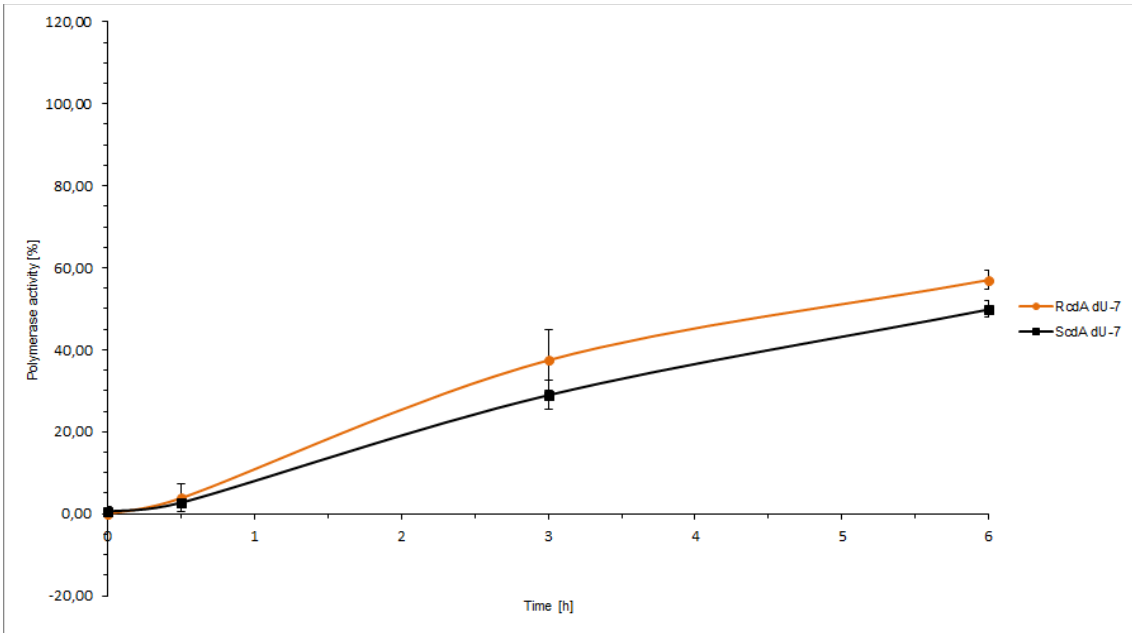




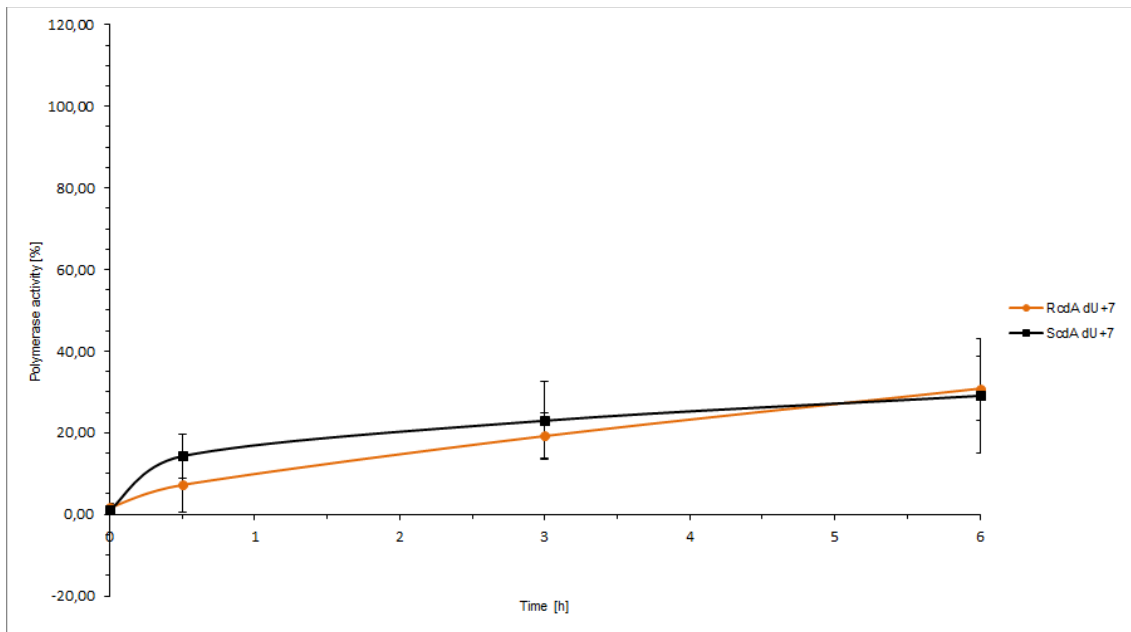
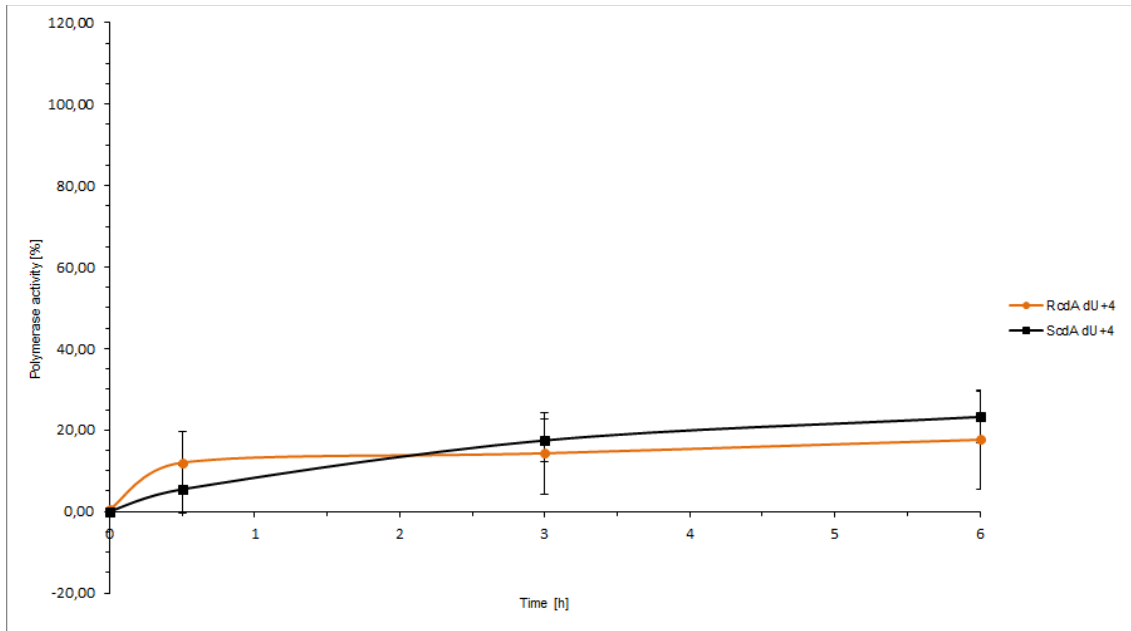


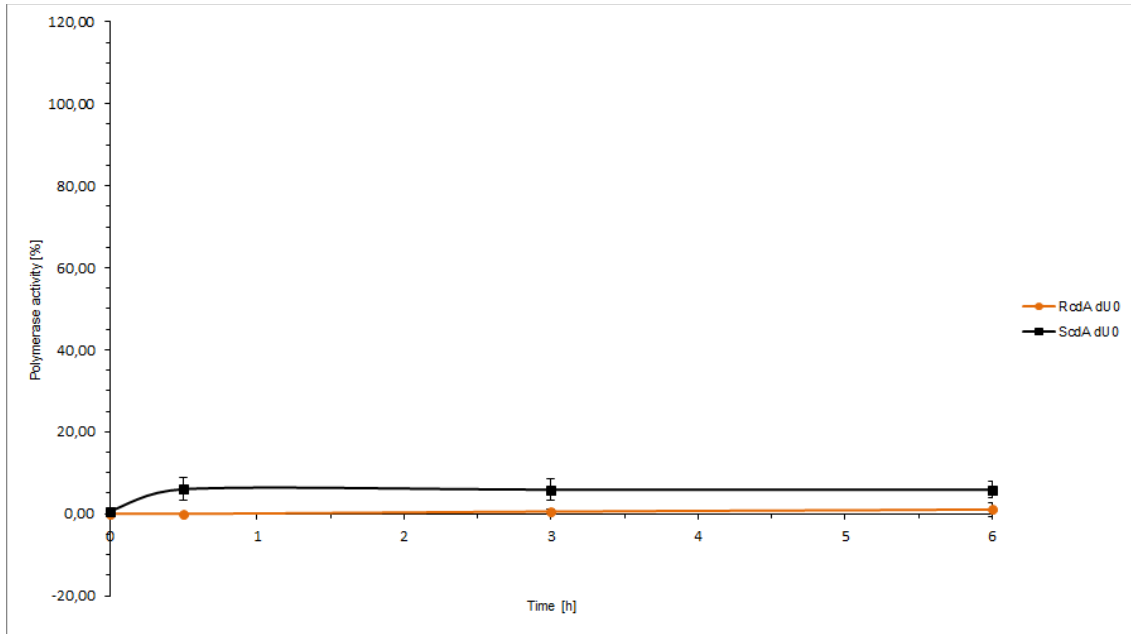
**Figure S6.** Endonuclease activity [%] of ScdA vs. RcdA – comparison of individual strands.



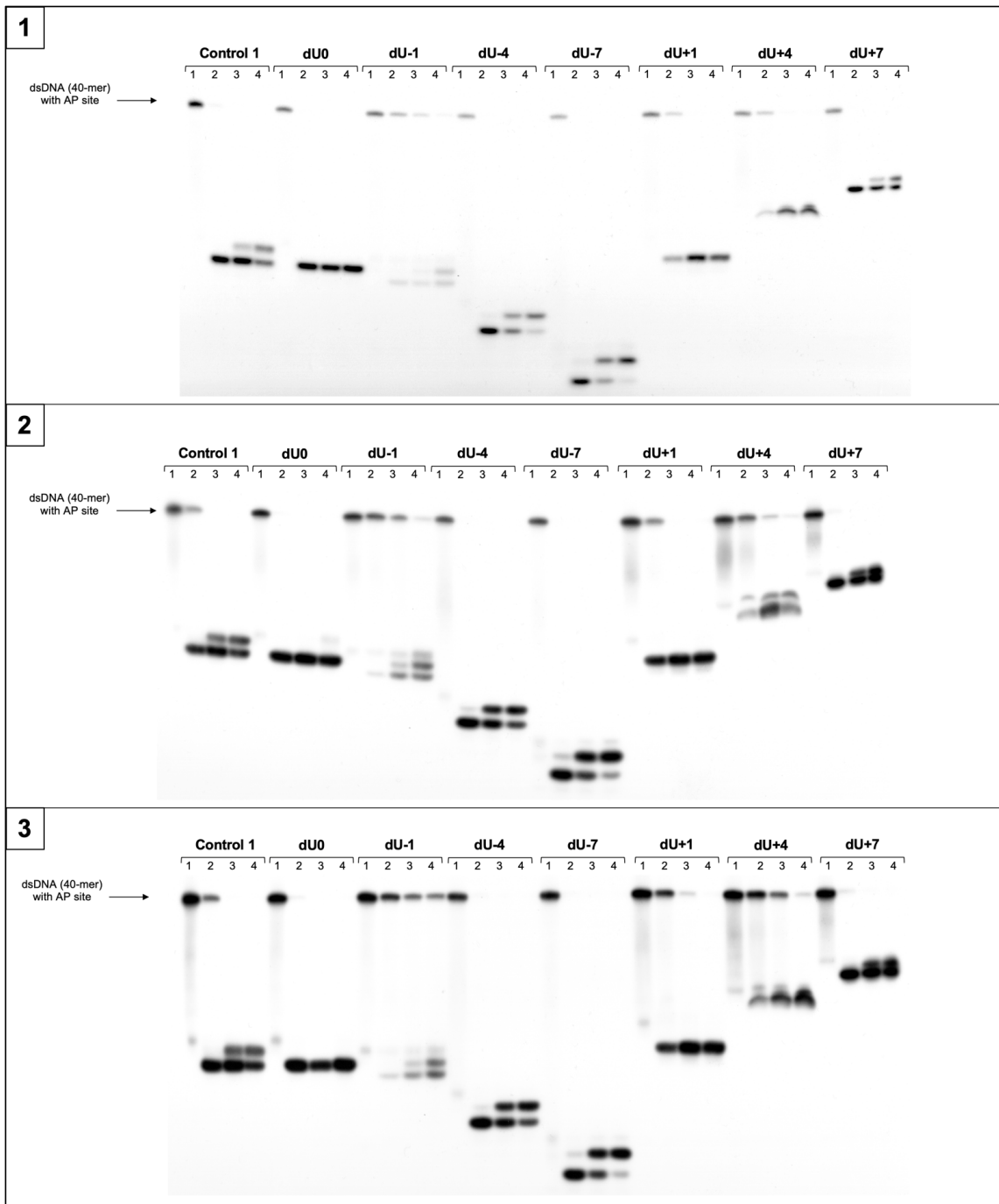




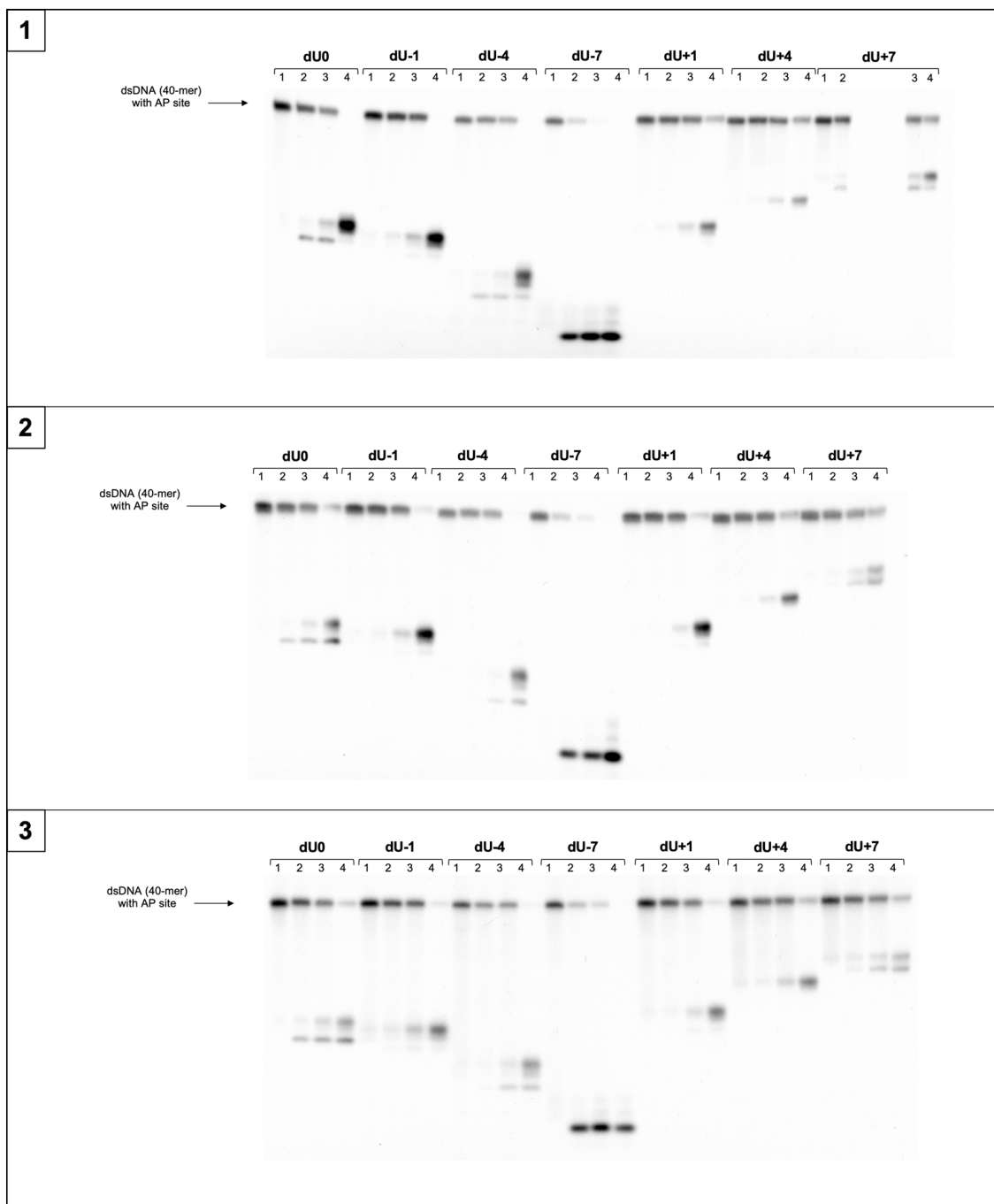




**Figure S7.** Polymerase activity [%] of ScdA vs. RcdA – comparison of individual strands.



**Figure S8.** The autoradiograms of denaturing PAGE presenting repair of dsDNA containing clustered damage with AP site in one strand and ScdG in the opposing strand. Each lane number indicates different assay time: lane 1 - 0 min; lane 2 - 30 min; lane 3 - 3h; lane 4 - 6h. Three experimental replications are presented.



**Figure S9.** The autoradiograms of denaturing PAGE presenting repair of dsDNA containing clustered damage with AP site in one strand and **RcdG** in the opposing strand. Each lane number indicates different assay time: lane 1 - 0 min; lane 2 - 30 min; lane 3 - 3h; lane 4 - 6h. Three experimental replications are presented.

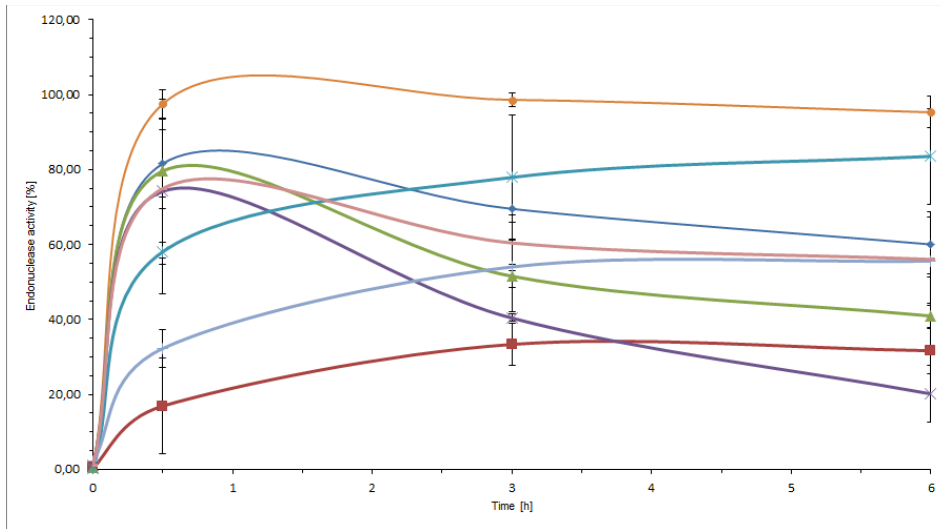
**Table S6.** Endonuclease activity – ScdG and RcdG. Raw numerical data of densitometry obtained from Quantity One software.

RcdG		Time [h]				ScdG		Time [h]			
		0	0,5	3	6			0	0,5	3	6
Strand	Data set	Endonuclease activity [%]				Strand	Data set	Endonuclease activity [%]			
dU0	1.	1,34	3,52	20,80	80,18	dU0	1.	0,92	99,54	99,53	94,41
	2.	0,15	11,18	19,91	34,40		2.	0,61	93,19	96,39	91,56
	3.	0,29	16,50	26,36	38,06		3.	0,00	99,82	99,91	99,87
	Avg	0,59	10,40	22,36	50,88		Avg	0,51	97,51	98,61	95,28
	SD	0,65	6,52	3,49	25,44		SD	0,47	3,75	1,93	4,22
dU-1	1.	0,00	6,45	24,32	74,24	dU-1	1.	0,00	8,07	38,34	33,08
	2.	2,20	5,31	23,15	82,50		2.	0,00	11,18	34,38	36,89
	3.	0,33	3,20	6,32	9,06		3.	1,15	31,47	27,36	25,02
	Avg	0,84	4,99	17,93	55,27		Avg	0,38	16,91	33,36	31,66
	SD	1,19	1,65	10,07	40,23		SD	0,66	12,71	5,56	6,06
dU-4	1.	0,00	0,00	7,57	63,04	dU-4	1.	0,00	89,74	52,47	38,80
	2.	0,55	0,97	6,30	78,72		2.	0,00	91,49	54,07	39,32
	3.	0,00	2,24	18,02	23,49		3.	1,24	57,67	48,13	44,72
	Avg	0,18	1,07	10,63	55,08		Avg	0,41	79,63	51,56	40,95
	SD	0,32	1,12	6,43	28,46		SD	0,71	19,04	3,07	3,28
dU-7	1.	2,53	73,82	81,68	77,08	dU-7	1.	0,28	79,48	39,88	18,78
	2.	0,00	82,62	93,85	87,47		2.	1,87	90,66	41,51	13,46
	3.	0,00	77,19	84,31	94,72		3.	0,72	52,53	39,74	28,23
	Avg	0,84	77,88	86,61	86,42		Avg	0,96	74,22	40,38	20,16
	SD	1,46	4,44	6,41	8,86		SD	0,82	19,60	0,98	7,48
dU+1	1.	1,43	3,17	18,68	58,64	dU+1	1.	0,00	69,95	86,05	85,67
	2.	0,60	1,19	13,39	82,12		2.	0,00	57,01	88,82	95,16
	3.	0,13	4,81	19,43	74,05		3.	0,49	47,27	58,87	69,80
	Avg	0,72	3,06	17,17	71,60		Avg	0,16	58,08	77,91	83,54
	SD	0,66	1,81	3,29	11,93		SD	0,28	11,38	16,55	12,81
dU+4	1.	1,19	2,64	13,43	45,41	dU+4	1.	1,07	27,69	66,03	56,93
	2.	0,89	1,77	10,91	66,59		2.	2,90	31,21	53,65	66,57
	3.	0,33	7,52	22,42	61,76		3.	2,24	37,85	42,39	43,19
	Avg	0,80	3,98	15,58	57,92		Avg	2,07	32,25	54,02	55,56
	SD	0,44	3,10	6,05	11,10		SD	0,93	5,16	11,83	11,75
dU+7	1.	0,45	10,43	19,35	13,91	dU+7	1.	2,27	86,81	63,04	54,57
	2.	1,27	2,84	16,54	30,64		2.	0,21	84,48	66,20	60,46
	3.	1,47	5,89	19,34	32,14		3.	1,08	53,61	52,08	53,08
	Avg	1,06	6,39	18,41	25,56		Avg	1,18	74,96	60,44	56,04
	SD	0,54	3,82	1,62	10,12		SD	1,03	18,53	7,41	3,90

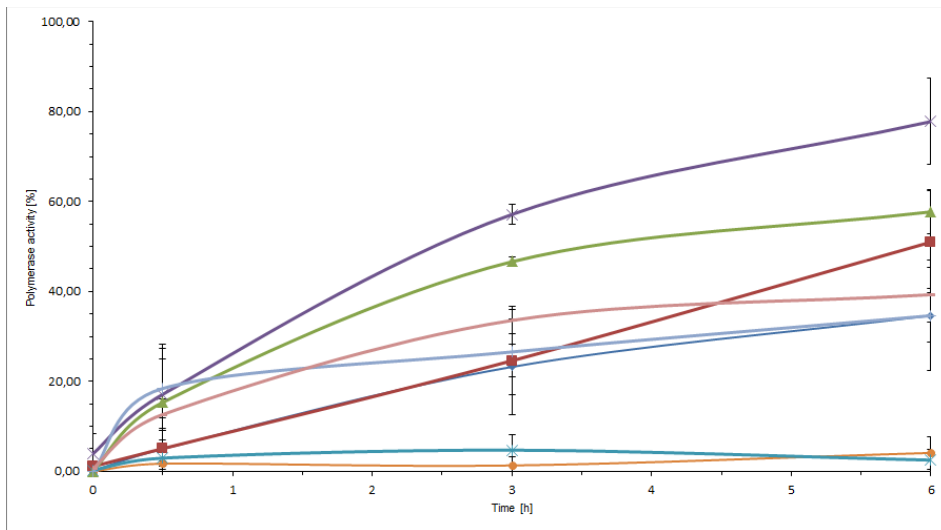
**Table S7.** Polymerase activity – ScdG and RcdG. Raw numerical data of densitometry obtained from Quantity One software.

<b>RcdG</b>		<b>Time [h]</b>				<b>ScdG</b>		<b>Time [h]</b>			
<b>Strand</b>	<b>Data set</b>	<b>0</b>	<b>0,5</b>	<b>3</b>	<b>6</b>	<b>Strand</b>	<b>Data set</b>	<b>0</b>	<b>0,5</b>	<b>3</b>	<b>6</b>
		<b>Polymerase activity [%]</b>						<b>Polymerase activity [%]</b>			
dU0	1.	0,54	0,47	0,71	12,18	dU0	1.	0,00	0,11	0,39	5,48
	2.	1,13	2,33	12,25	47,64		2.	0,00	5,08	3,60	6,88
	3.	2,08	5,22	17,95	44,40		3.	0,00	0,00	0,00	0,00
	Avg	1,25	2,67	10,30	34,74		Avg	0,00	1,73	1,33	4,12
	SD	0,78	2,39	8,78	19,60		SD	0,00	2,90	1,97	3,64
dU-1	1.	0,00	0,00	0,00	2,69	dU-1	1.	1,41	5,04	28,71	61,81
	2.	0,62	0,71	1,09	3,69		2.	1,94	1,16	21,72	39,25
	3.	1,15	11,76	29,72	81,46		3.	0,00	8,99	23,41	51,96
	Avg	0,59	4,16	10,27	29,28		Avg	1,11	5,06	24,61	51,01
	SD	0,58	6,60	16,86	45,19		SD	1,00	3,92	3,64	11,31
dU-4	1.	0,00	0,00	0,00	0,60	dU-4	1.	0,00	9,70	47,47	61,13
	2.	0,00	0,00	0,00	0,13		2.	0,00	6,09	45,34	60,05
	3.	0,00	5,34	17,32	72,03		3.	0,00	30,25	47,09	52,01
	Avg	0,00	1,78	5,77	24,25		Avg	0,00	15,35	46,64	57,73
	SD	0,00	3,08	10,00	41,37		SD	0,00	13,03	1,13	4,98
dU-7	1.	0,00	9,40	12,05	18,83	dU-7	1.	2,50	17,11	58,97	81,01
	2.	0,00	0,00	0,36	11,33		2.	0,34	6,89	57,65	85,37
	3.	1,36	0,83	4,27	4,20		3.	8,89	27,44	54,82	67,03
	Avg	0,45	3,41	5,56	11,45		Avg	3,91	17,15	57,15	77,80
	SD	0,78	5,20	5,95	7,32		SD	4,45	10,28	2,12	9,58
dU+1	1.	0,33	0,31	0,84	5,83	dU+1	1.	0,81	2,73	2,16	2,07
	2.	0,25	0,20	0,42	2,48		2.	0,00	1,29	3,45	0,33
	3.	2,22	1,69	2,09	4,62		3.	0,00	4,89	8,57	5,15
	Avg	0,93	0,73	1,12	4,31		Avg	0,27	2,97	4,73	2,51
	SD	1,11	0,83	0,87	1,70		SD	0,47	1,81	3,39	2,44
dU+4	1.	1,07	0,77	0,90	1,07	dU+4	1.	0,00	14,91	24,25	37,13
	2.	1,03	0,97	0,77	1,87		2.	0,05	14,51	18,46	27,86
	3.	0,44	4,30	5,06	4,35		3.	0,00	25,93	36,99	38,93
	Avg	0,85	2,01	2,24	2,43		Avg	0,02	18,45	26,57	34,64
	SD	0,35	1,98	2,44	1,71		SD	0,03	6,48	9,48	5,94
dU+7	1.	2,72	3,97	15,31	47,85	dU+7	1.	0,00	11,11	36,85	45,40
	2.	1,64	3,18	10,41	36,39		2.	0,04	10,19	32,92	39,18
	3.	1,35	9,93	15,28	33,45		3.	1,93	16,69	30,97	33,33
	Avg	1,90	5,69	13,66	39,23		Avg	0,66	12,66	33,58	39,30
	SD	0,72	3,69	2,82	7,61		SD	1,10	3,52	3,00	6,03

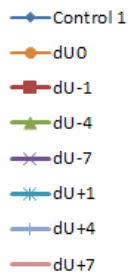
A.



B.

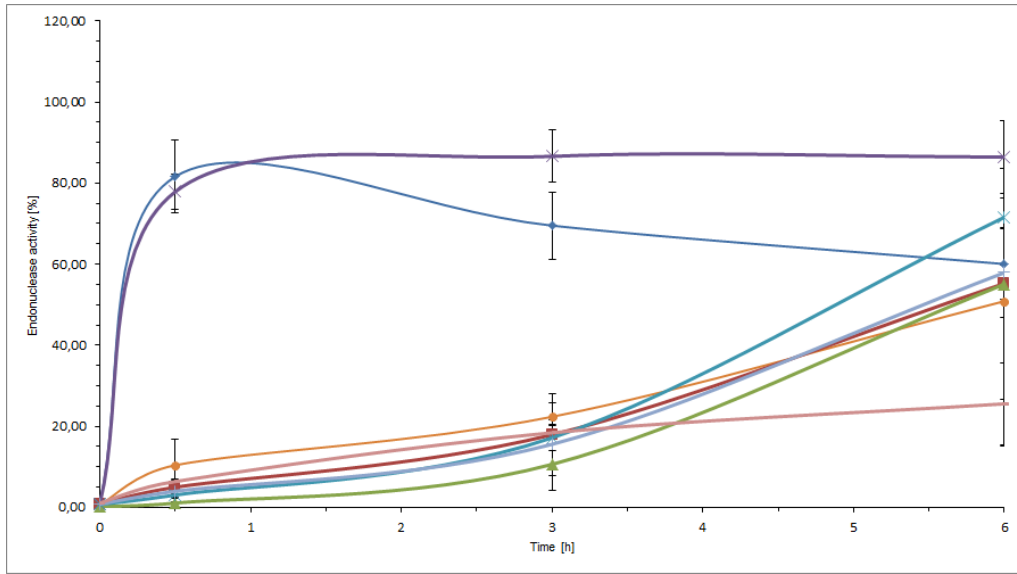


C.

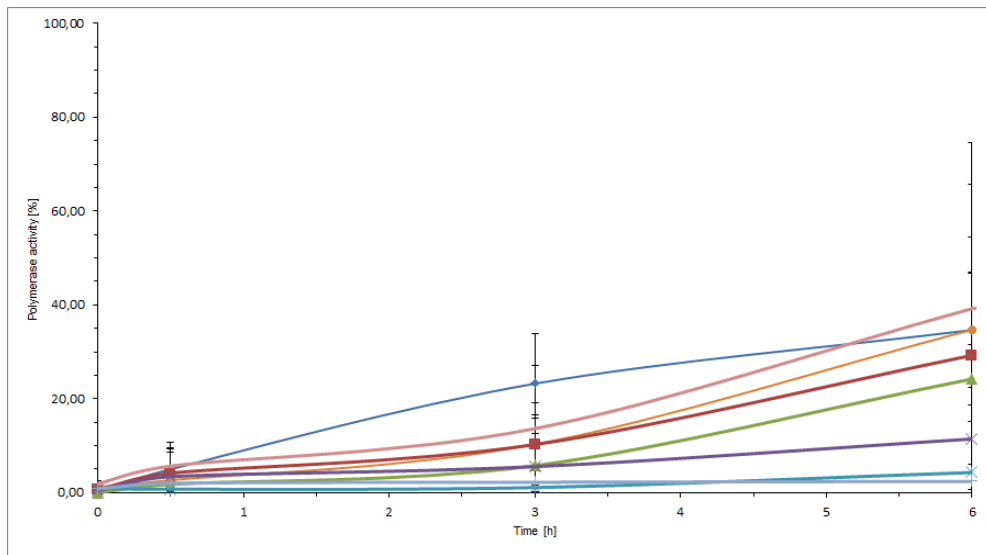


**Figure S10.** Graphical representation of the results for ScdG. (A) endonuclease activity +SD, (B) polymerase activity + SD; (C) figure legend.

A.



B.



C.

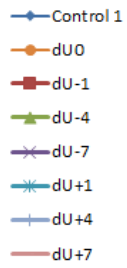
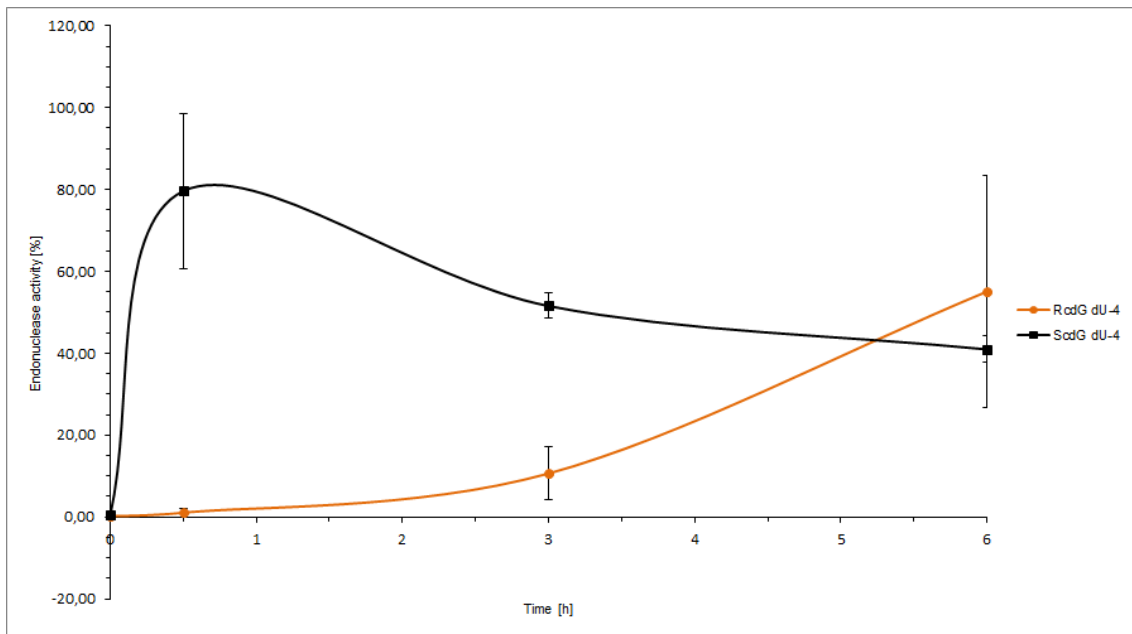
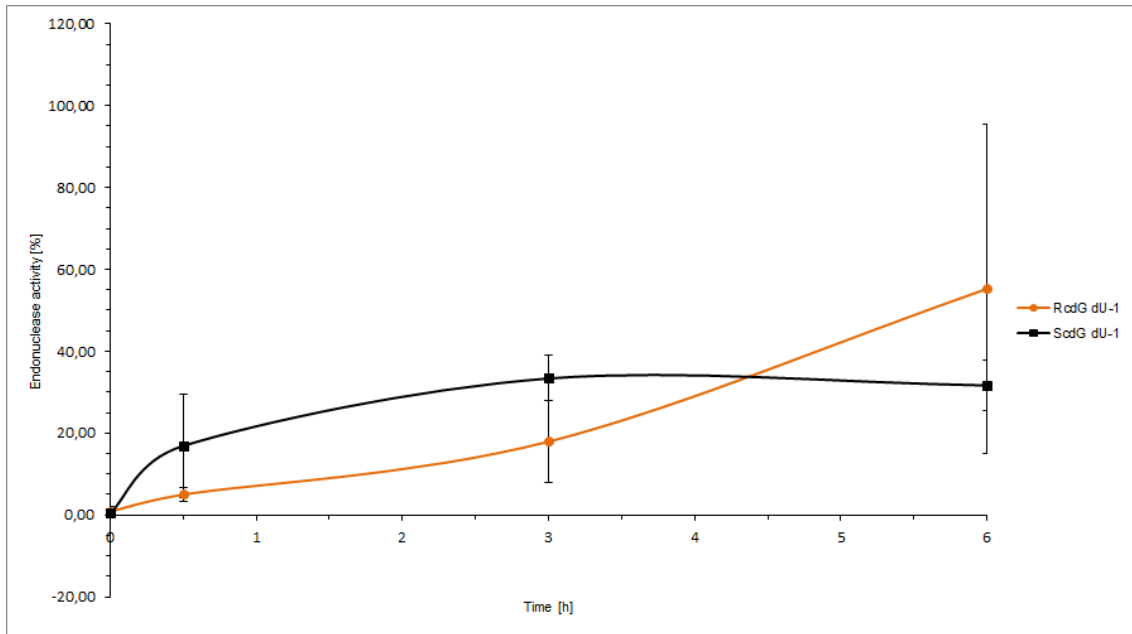
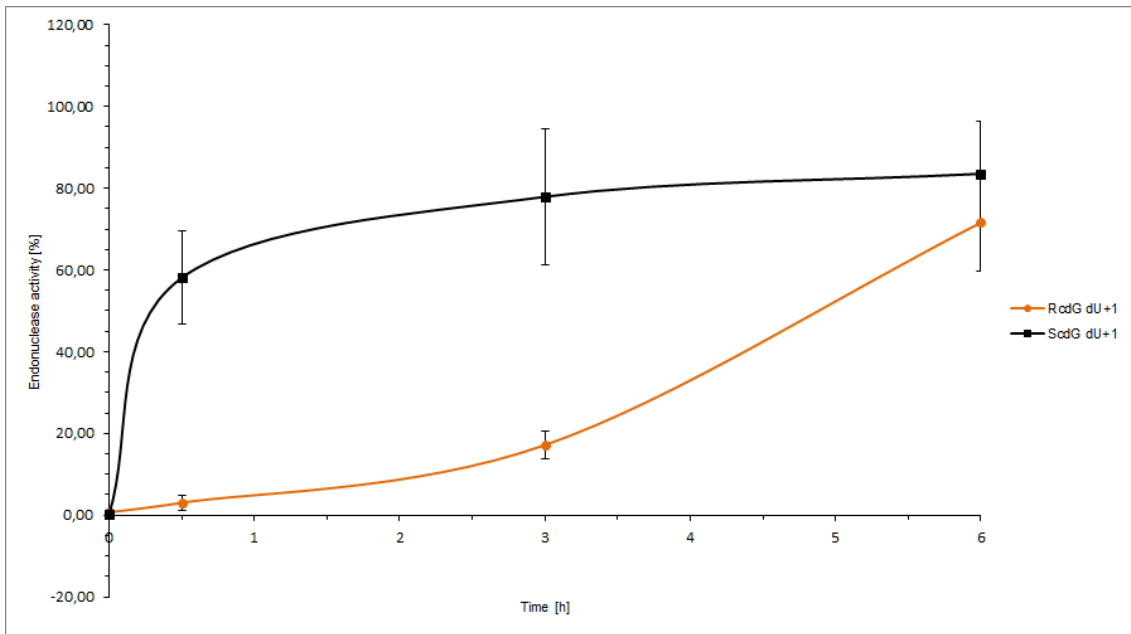
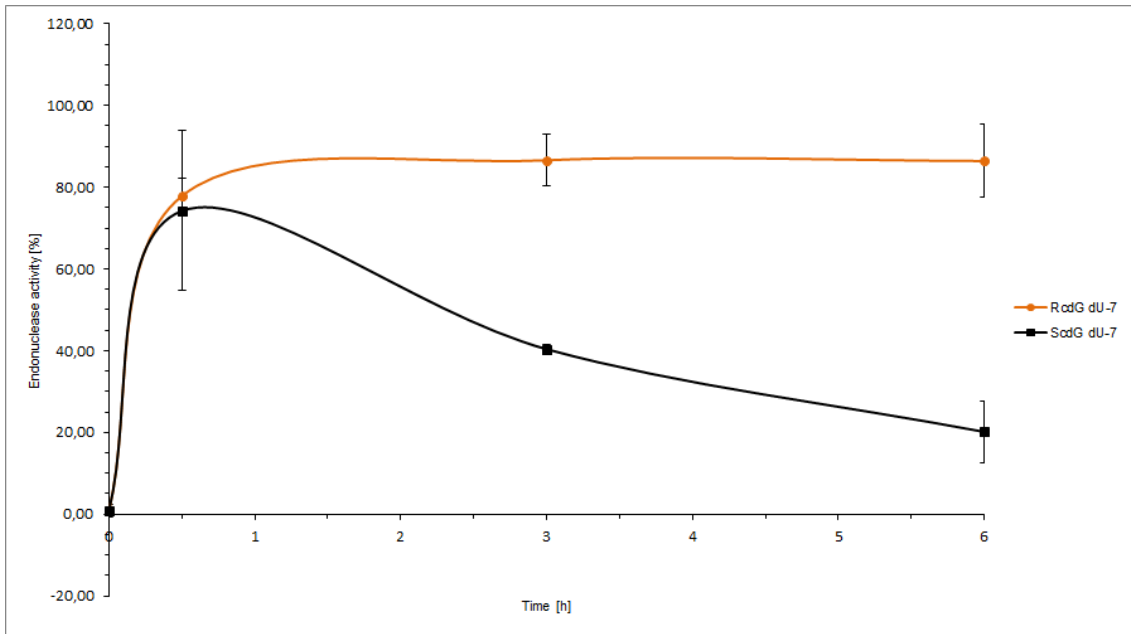
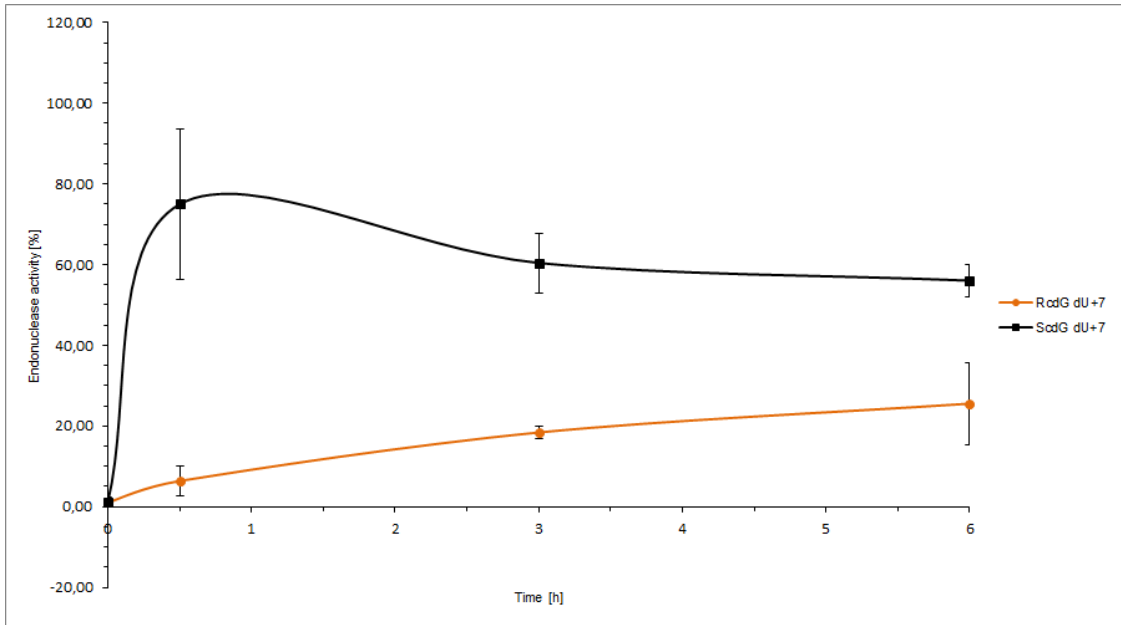
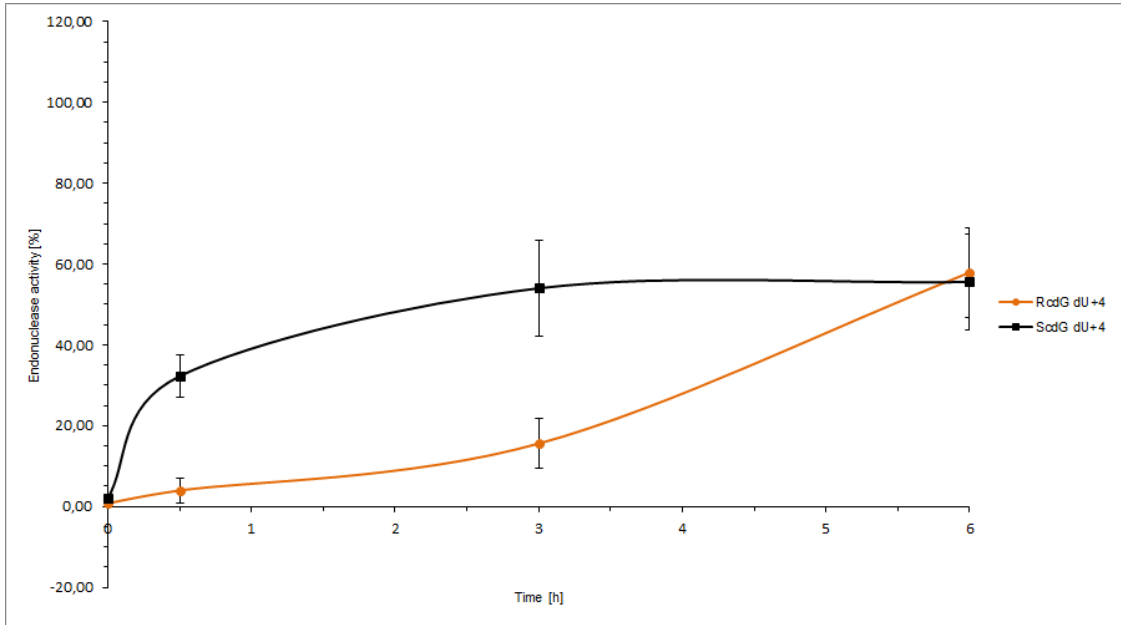


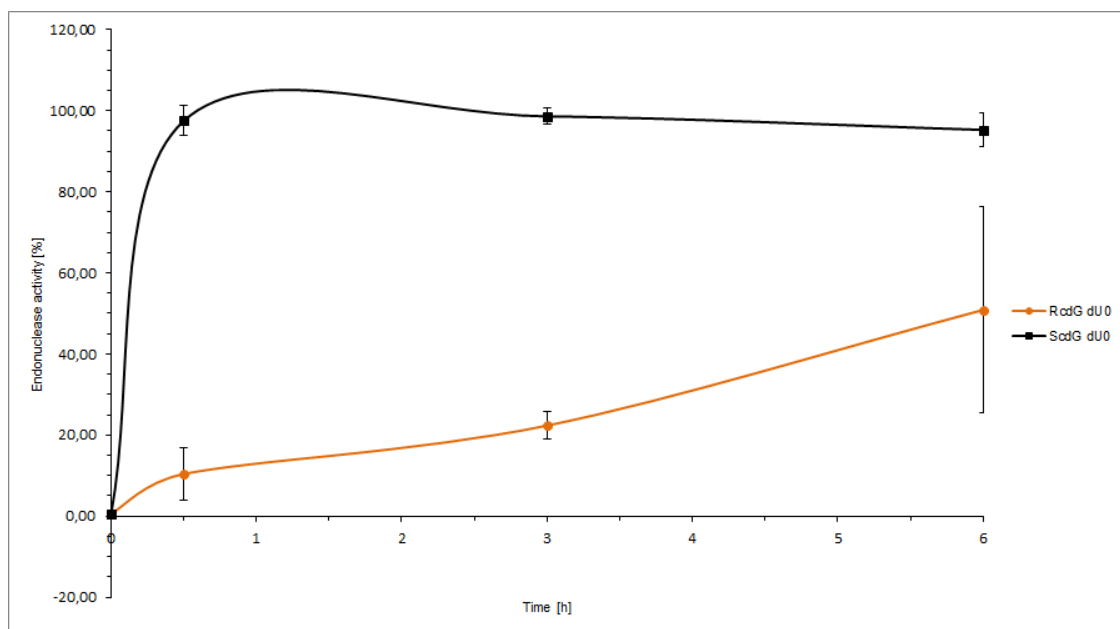
Figure S11. Graphical representation of the results for RcdG. (A) endonuclease activity +SD, (B) polymerase activity + SD; (C) figure legend.



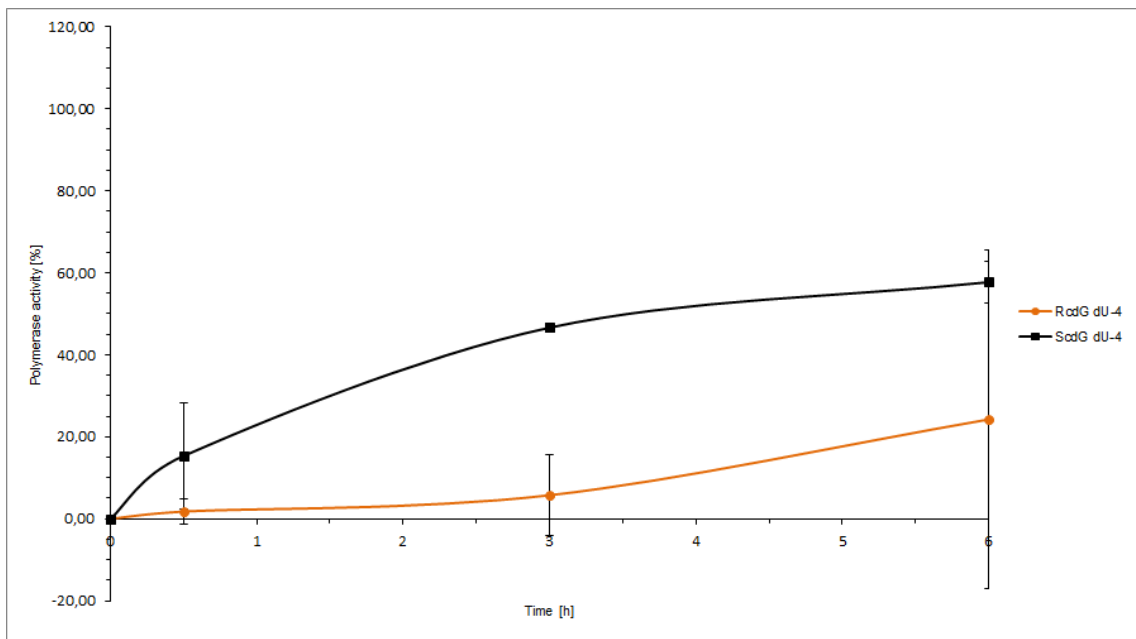
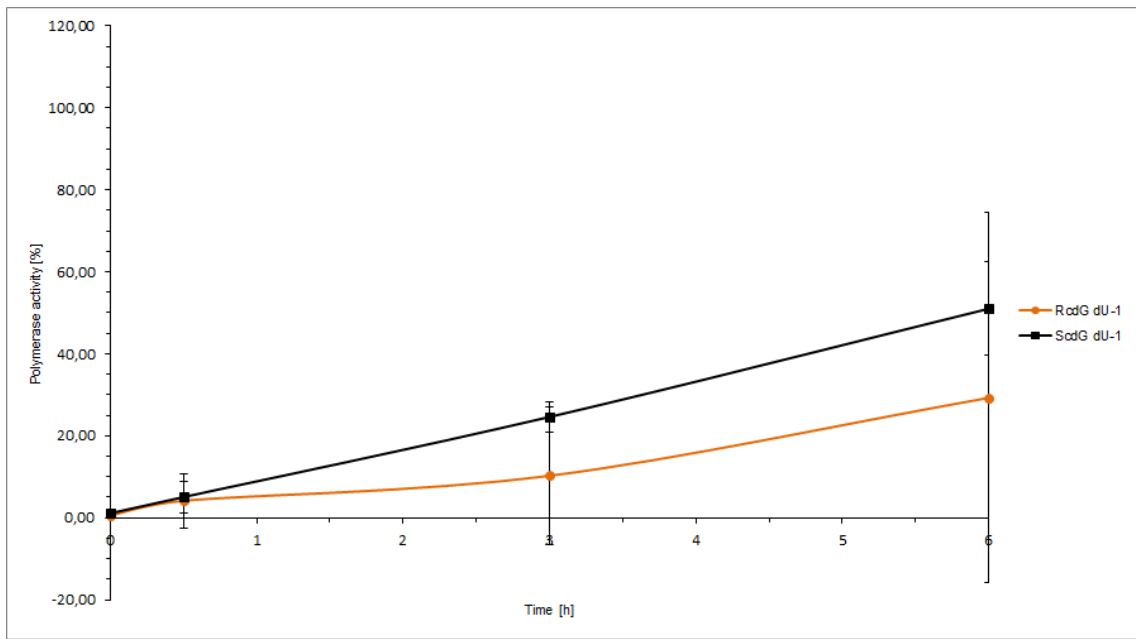


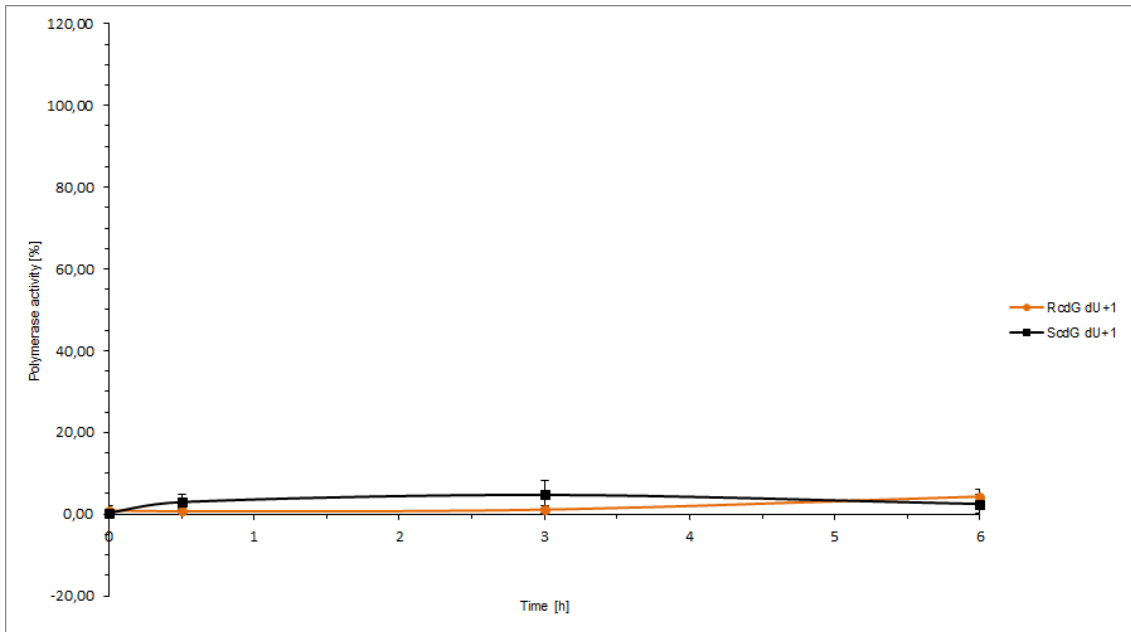
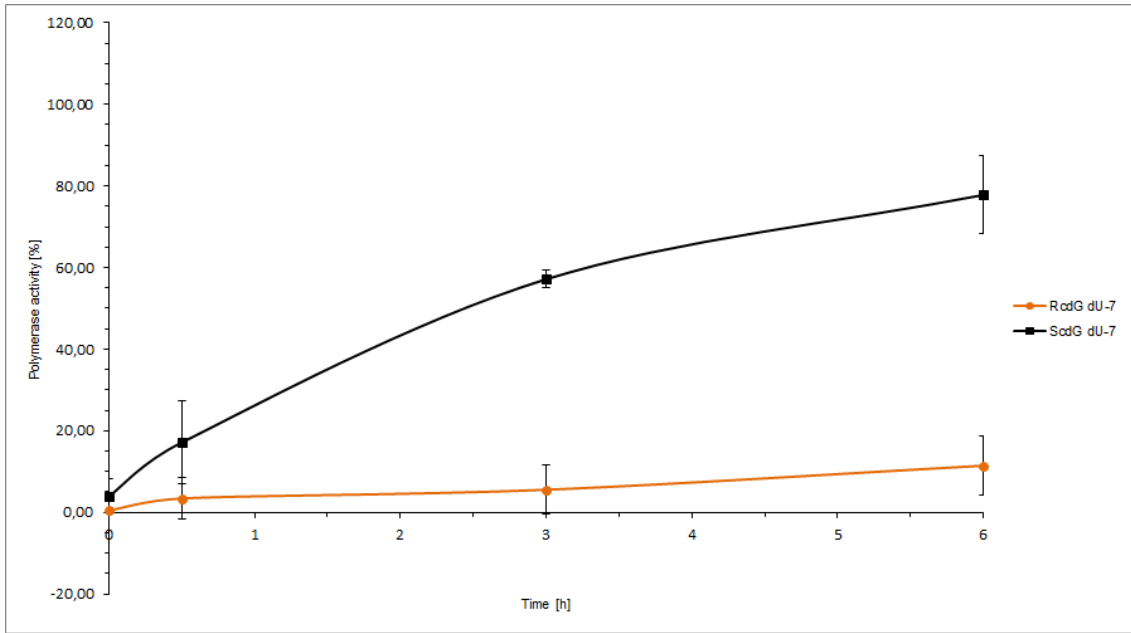


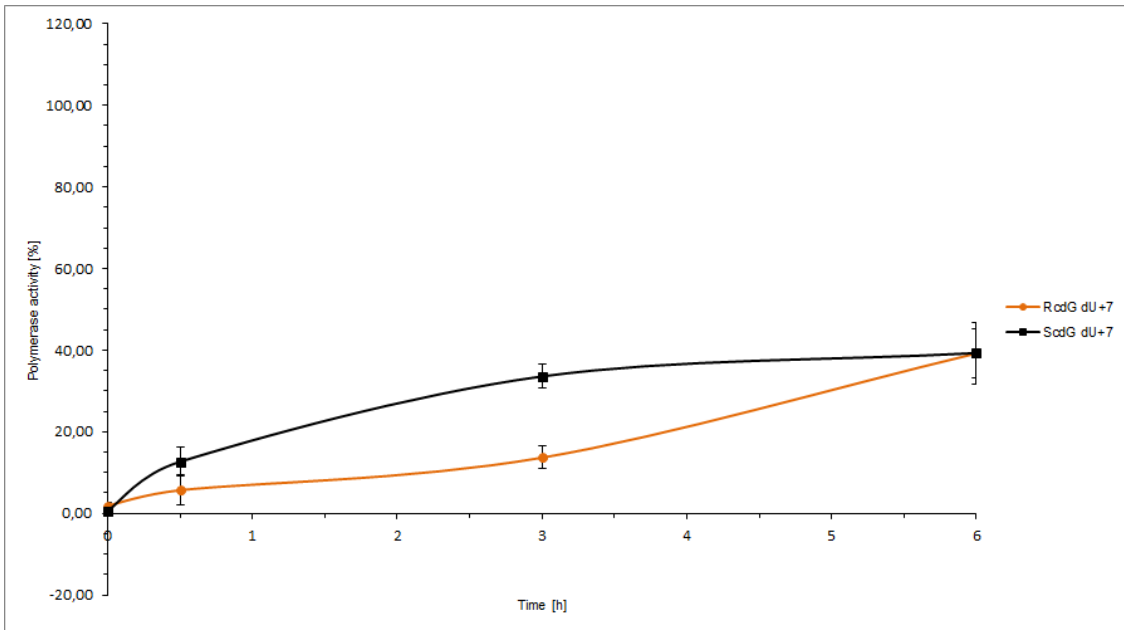
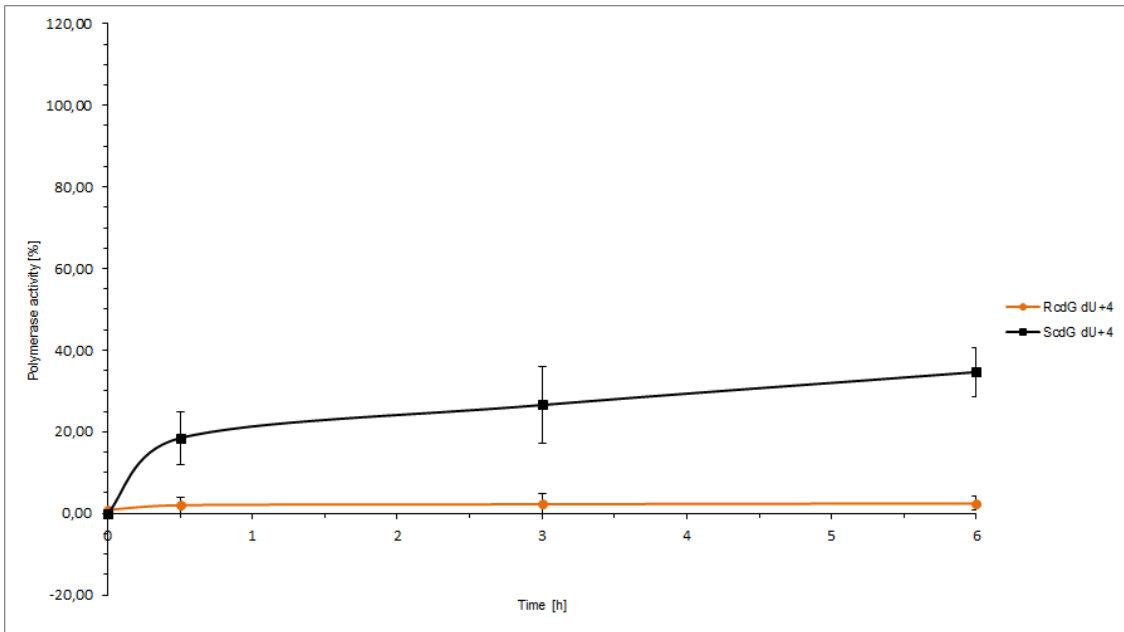


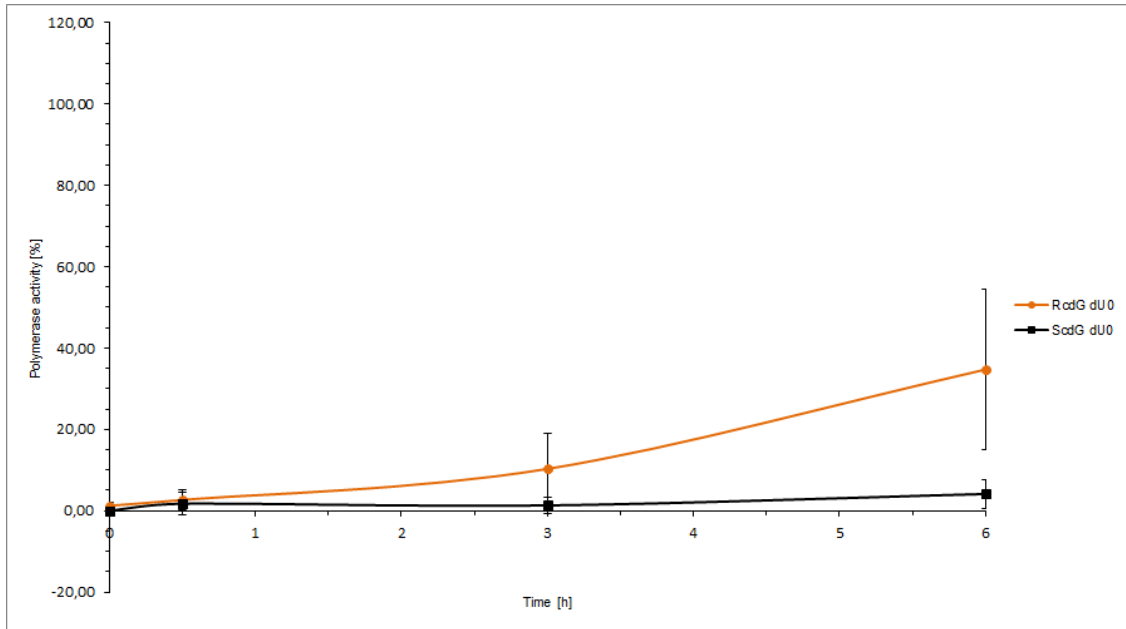


**Figure S12.** Endonuclease activity [%] of ScdG vs. RcdG – comparison of individual strands.



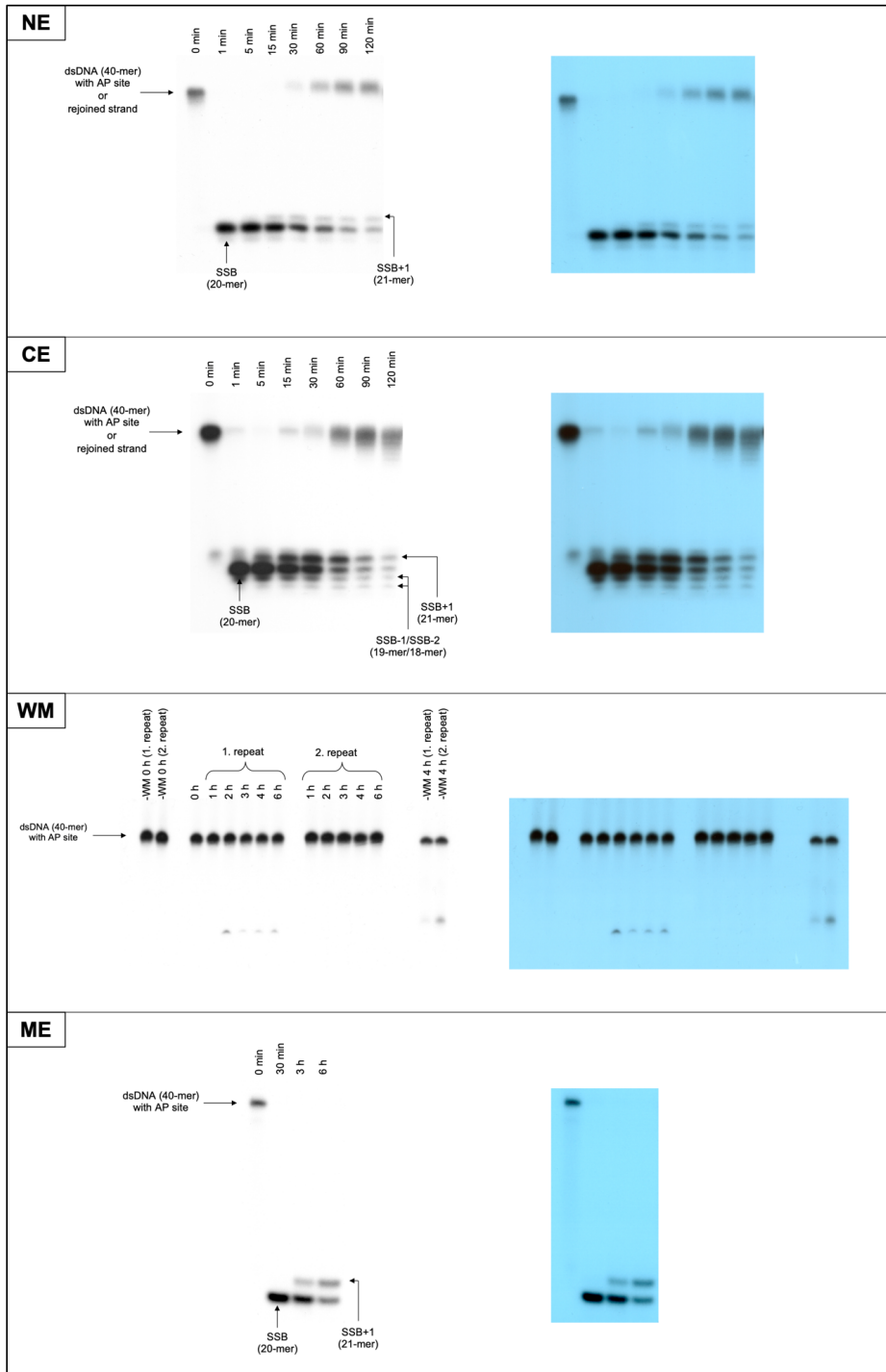






**Figure S13.** Polymerase activity [%] of ScdG vs. RcdG – comparison of individual strands.





**Figure S14.** Functional activity test of mitochondrial extract (ME, 20  $\mu$ g) by comparison with whole mitochondria fraction (WM, 20  $\mu$ g), nuclear extract (NE, 10  $\mu$ g), and cytoplasmic extract (CE, 10  $\mu$ g) of *xrs5* cell line using Control 1 (ds-oligo with single AP site lesion). SSB – single strand break (AP site cleavage resulting from endonucleolytic activity of ME, NE, and CE), SSB+1 - cleaved strand with 1 nucleotide incorporated (resulting from polymerase activity of ME, NE, and CE); SSB-1/SSB-2 - cleaved strand with 1 or 2 nucleotides cleaved (resulting from exonucleolytic activity of CE). Original scans of X-ray films are presented on the right, and annotated, graphically processed radiograms are presented on the left.

13.4. Publikacja IV

**Boguszewska K.**, Kaźmierczak-Barańska J., Karwowski B.T.,

*Mutagenicity of a bi-stranded clustered DNA lesion containing (5'S) or (5'R) 5',8-cyclo-2'-deoxyAdenosine in Escherichia coli model* [w:] Acta Biochimica Polonica, 2022, 69 (4), 865-869, doi: 10.18388/abp.2020\_6382

**IF<sub>2022</sub>=2,149, MEiN<sub>2022</sub>=70 pkt**

## Mutagenicity of a bi-stranded clustered DNA lesion containing (5'S) or (5'R) 5',8-cyclo-2'-deoxyAdenosine in *Escherichia coli* model

Karolina Boguszewska, Julia Kaźmierczak-Barańska and Bolesław T. Karwowski✉

DNA Damage Laboratory of Food Science Department, Faculty of Pharmacy, Medical University of Lodz, Łódź, Poland

**Ionizing radiation induces DNA damage, including characteristic clusters and tandem lesions e.g., 5',8-cyclo-2'-deoxyPurines (cdPus). Clustered DNA Lesions (CDL) defined as 2 or more lesions within 1-2 helical turns resulting from a single radiation track contribute to the harmful effects of radiation. Moreover, the presence of CDL and cdPus in human DNA may decrease the efficiency of the DNA repair mechanisms, which in consequence may lead to, e.g., carcinogenesis. This preliminary study showed the mutagenic potential of CDL containing dU on one strand and 5',8-cyclo-2'-deoxyAdenosine (cdA) on a complementary strand separated by up to 4 bp. Mutagenicity was determined using *Escherichia coli* reporter assay and 40-mer model ds-oligonucleotides with CDL. Mutation frequencies were determined to be significantly higher for CDL than for single isolated lesions (cdA or dU placed only in one strand). The results demonstrated that the dU lesion located on the opposite DNA strand separated by 0 or 1 bp from cdA led to severe mutagenicity. The most frequent mutations observed comprised point deletions and transitions. Oligonucleotides with CDL containing ScdA/RcdA demonstrated even up to 100% mutation rate. Interestingly, increasing the distance between lesions within CDL to 4 bp led to full recovery of the correct sequence of ds-oligonucleotides, indicating an efficient repair process. The results obtained with the bacterial model are in agreement with previous *in vitro* studies on eukaryotic models. The high mutagenicity and/or inhibited repair process of clusters with lesions located in close proximity provides additional verification of the previously presented trends describing how the distance between cdPu and dU affects DNA repair processes.**

**Keywords:** 5',8-cyclo-2'-deoxyadenosine (cdA), clustered DNA lesion, DNA damage, DNA repair, mutagenicity, *Escherichia coli*

**Received:** 01 June, 2022; **revised:** 12 August, 2022; **accepted:** 02 September, 2022; **available on-line:** 07 October, 2022

✉e-mail: [boleslaw.karwowski@umed.lodz.pl](mailto:boleslaw.karwowski@umed.lodz.pl)

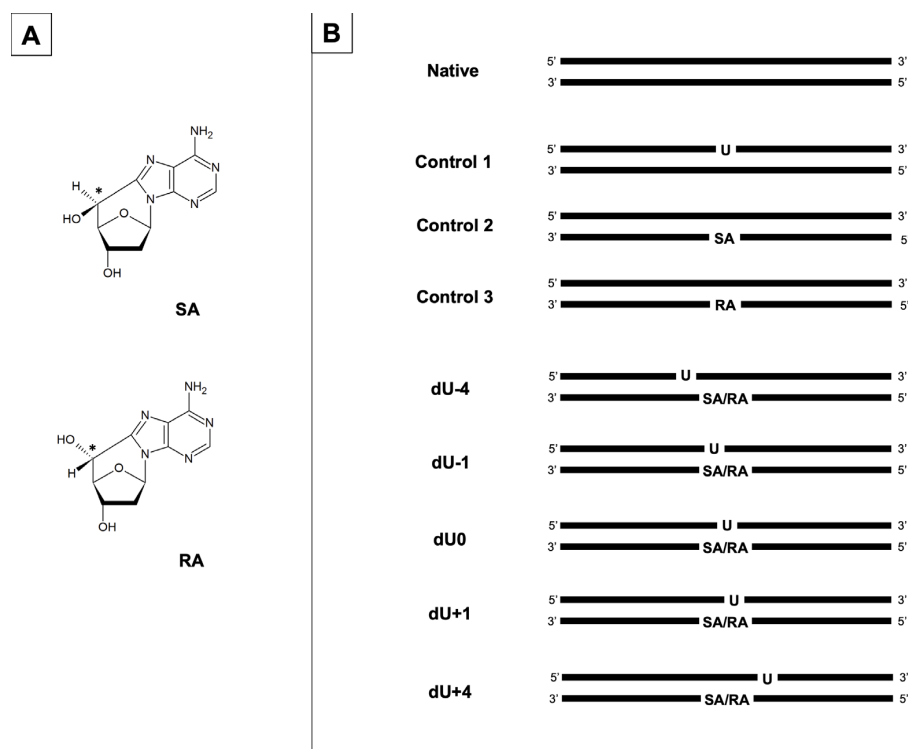
**Acknowledgements of Financial Support:** This research was funded by the National Science Center, Poland (grant No. 2016/23/B/NZ7/03367).

**Abbreviations:** AP site, apurinic/apyrimidinic site; BER, Base Excision Repair; CDL, Clustered DNA Lesions; cdPus, 5',8-cyclo-2'-deoxy-Purines; cdA, 5',8-cyclo-2'-deoxyAdenosine; ScdA, (5'S) 5',8-cyclo-2'-deoxyAdenosine; RcdA, (5'R) 5',8-cyclo-2'-deoxyAdenosine; DSB, double-strand break; IR, ionizing radiation; oligo, oligonucleotide

### INTRODUCTION

Ionizing radiation (IR) induces the direct or indirect formation of various DNA damage. From the chemical point of view, the lesions produced by exogenous fac-

tors (e.g., ultraviolet, X-ray,  $\gamma$ -rays, etc.) and endogenous ones (e.g., estrogens, metabolites, respiratory cycles) are structurally identical. Radiation-induced lesions (e.g., during radiotherapy), such as Clustered DNA Lesions (CDL, 2 or more lesions within 1-2 helical turns created by the passage of a single radiation track) and/or 5',8-cyclo-2'-deoxyPurines (cdPus) can affect the spatial structure of the double helix and subsequently impair the repair of genetic material. CdPus being a unique DNA lesion have the additional covalent bond between C5' and C8 of the guanine or adenine moieties. Depending on C5' chirality (5'S or 5'R diastereomer) cdPus demonstrated different biological impact (Kuraoka *et al.*, 2000). Changes in the geometry of the DNA double helix structure are more likely to occur if rigid lesions such as cdPu appear (in comparison with the flexible lesions such as <sup>os</sup>dG) (Kusumoto *et al.*, 2002; Brooks, 2017). Subsequently, cdPus may interfere with repair and replication in *Escherichia coli* because in most cases polymerases cannot bypass its complex structure and Nucleotide Excision Repair (NER) is inefficient (Jasti *et al.*, 2011; David-Cordonniert *et al.*, 2000; Pednekar *et al.*, 2014). When CDL contains an apurinic/apyrimidinic site (AP site) and cdPu, the efficiency of proteins involved in the repair of the AP site through the Base Excision Repair (BER) machinery can decrease, as shown in our previous studies on nuclear and mitochondrial extracts of eukaryotic cells (Karwowski, 2019; Boguszewska *et al.*, 2021a; Kaźmierczak-Barańska *et al.*, 2021; Boguszewska *et al.*, 2021b; Karwowski *et al.*, 2014; Karwowski, 2021). The AP site located opposite to 5',8-cyclo-2'-deoxyAdenosine (cdA), or 1 nucleobase in the 5'-end direction was found to be a cause of the termination of ds-oligo repair, as polymerases cannot operate properly. Interestingly, when the distance between lesions increased to 7 or 10 nucleobases (in both directions), the repair process occurred quite efficiently, and the strand reconstitution was observed. The most problematic CDL 'variant' included AP site placed 4 bases in the 5'-end direction from cdA (inefficient strand ligation). In contrast to above, the AP site settled 4 bases in the 3'-end direction from cdA resulting in its proper repair. Interestingly, the proper enzymatic action was observed when the distance between the lesions located on the same strand increased to 5 nucleobases in the 5'-end direction (Karwowski, 2021). The DNA repair capacity differed depending on the type of cdPu, its diastereomeric form (5'S or 5'R), and the interlesion distance. These features directly influenced the activity of proteins involved in DNA repair (Karwowski, 2019; Boguszewska *et al.*, 2021a; Szewczuk *et al.*, 2021; Kaźmierczak-Barańska *et al.*, 2021; Boguszewska *et al.*, 2021b). When eukaryotic DNA repair enzymes cannot form active complexes with DNA due to structural changes (e.g., resulting from cdPu occurrence), the DNA lesion remains in the cell unre-



**Figure 1. (A)** The chemical structures of the (5'S)-5',8-cyclo-2'-deoxyAdenosine (SA), (5'R)-5',8-cyclo-2'-deoxyAdenosine (RA); **(B)** The investigated ds-oligonucleotides (40 bp) with lesion positioning. U – represents location of a 2'-deoxyUridine (dU); SA/RA – represents location of the (5'S) or (5'R) 5',8-cyclo-2'-deoxyAdenosine; negative numbers – represent dU location 1–4 bp in 3'-end direction; positive numbers – represent dU location 1–4 bp in 5'-end direction.

paired, which can lead to mutations and finally to pathogenic states (e.g., carcinogenesis and/or accelerated aging). The goal of this preliminary study was to i) assess the general trends of CDL repair in the bacterial model, ii) to compare the impact of the distance between lesions within the cluster and the diastereomeric form of cdPu between bacterial model and previously studied eukaryotic models, and iii) to additionally verify and justify the use of *in vitro* eukaryotic models in CDL studies. This article has shown the biological consequences of complex CDL using a plasmid-based assay and a set of 40-mer ds-oligos containing dU (as a precursor of an AP site) and (5'R) or (5'S) cdA separated by 1–4 bp. The frequency of CDL mutation was evaluated and compared with the individual model lesion (dU). Furthermore, the influence of the distance between the lesions and the diastereomeric form of cdA has been assessed. The results presented show that CDL containing cdA and dU separated by 0–1 bp are highly mutagenic in *E. coli*.

## MATERIALS AND METHODS

### Preparation of oligonucleotides for the *E. coli* reporter system

Oligos used in this study (40 bp) contained ds-CDL: dU on one strand and cdA on the opposite strand distanced 0, 1, or 4 bases in both directions (Fig. 1, Table S1 at <https://ojs.ptbioch.edu.pl/index.php/abp/>). Oligos were obtained and characterized as previously described (Boguszewska *et al.*, 2021b). The mass spectra of the oligos are shown in the Supplementary Materials (Fig. S1,

Table S2 at <https://ojs.ptbioch.edu.pl/index.php/abp/>). The single-stranded oligos were hybridized (90°C for 10 min, followed by slow cooling) with a 1.5-fold excess of the complementary strand in pure H<sub>2</sub>O. The double-stranded oligos were phosphorylated at the 5'-end with 10 U T4 polynucleotide kinase (New England BioLabs, Ipswich, MA, USA) with 10 mM ATP in 1× T4 kinase reaction buffer at 37°C for 30 min. The duplexes were precipitated with cold ethanol (250 µL), placed on dry ice for 30 min, centrifuged (13000 rpm, 4°C, 30 min), and dissolved in pure H<sub>2</sub>O. The control oligos contained undamaged sequence (Native), single dU (Control 1), and single cdA (5'S and 5'R diastereomers, denoted Control 2 and 3, respectively) as shown in Fig. 1 and Table S1 at <https://ojs.ptbioch.edu.pl/index.php/abp/>.

### Plasmid preparation and ligation

The plasmid pUC18 (5 µg, ThermoFisher Scientific, MA, USA) was linearized with 100 U SmaI (New England BioLabs, Ipswich, MA, USA) in 1× rCutSmart buffer at 25°C for 24 h followed by SmaI inactivation (65°C, 20 min). The linear plasmid was then incubated with 5 U calf intestinal alkaline phosphatase (New England BioLabs, Ipswich, MA, USA) at 37°C for 15 min followed by a second incubation at 55°C for 45 min. The linear dephosphorylated plasmid was purified with a Monarch® PCR & DNA Cleanup Kit (New England BioLabs, Ipswich, MA, USA) according to the manufacturer's protocol. Aliquots of 200 fmol pUC18 plasmid DNA were ligated to 5 pmol of each oligo using the Quick Ligation Kit (New England BioLabs, Ipswich, MA, USA) at 25°C for 24 h.

### Transformation of electrocompetent *E. coli*

The ligation products (50 ng) were added to 25  $\mu$ l of electrocompetent *E. coli* bacteria (DH10 $\beta$ , New England BioLabs, Ipswich, MA, USA) and electroporated in an electroporation cuvette using Bio-Rad pulser (1.8 mV with a time constant  $\sim$ 5 ms). After electroporation, 975  $\mu$ l of SOC was immediately added, followed by incubation at 37°C for 1 h with agitation (100 rpm). Transformants were selected using LB agar plates containing 100  $\mu$ g/ml ampicillin at 37°C for 24 h. All transformations were performed three times.

### Sequence analysis of mutated plasmid DNA

Single colonies grown on LB agar plates containing 100  $\mu$ g/ml ampicillin and incubated at 37°C for 24 h were picked at random and used to inoculate separate aliquots of LB broth. The transformants were grown using

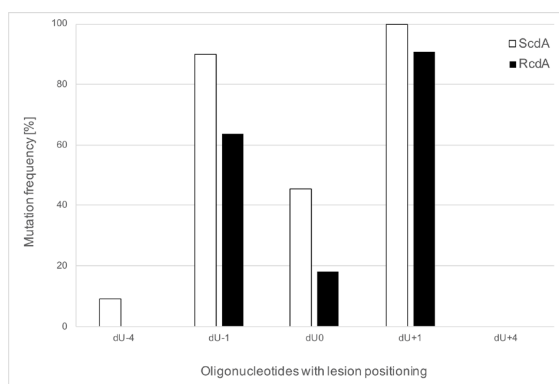
5 ml of LB broth containing 1  $\mu$ g/ml ampicillin at 37°C for 16 h. The plasmid DNA was isolated from bacteria using the GeneMATRIX Plasmid Miniprep DNA Purification Kit (EURx, Gdańsk, Poland) according to the manufacturer's protocol. The DNA of the bacterial plasmid was sequenced using the Applied Biosystems Big Dye sequencing kit (ThermoFisher Scientific, MA, USA) and the M13pUCr and M13pUCf primers that amplified the sequence across the inserted oligo with the damaged site. Sequencing data were analyzed using the Needleman-Wunsch global alignment tool online for nucleotide sequences (Fig. S2 at <https://ojs.ptbioch.edu.pl/index.php/abp/>). The mutation frequency was calculated by dividing the number of mutations found in the oligo by the total number of sequenced oligos. The frequency of individual mutations was calculated by dividing the number of times a mutation occurred by the total number of mutated sequences (Table 1).

**Table 1.** Mutations observed at the site of damage ( $\pm$  3 bp) resulting from the bi-stranded clustered DNA lesions containing 5',8-cyclo-2'-deoxyAdenosine (cdA) and 2'-deoxyUridine (dU) at different interlesion distances. The full sequences are shown in Supplementary materials (Fig. S2 at <https://ojs.ptbioch.edu.pl/index.php/abp/>).

Substrate oligonucleotide	Mutation frequency [%]	Type of mutation	Frequency of mutation type [%]
ScdA/dU0	45.5	$\Delta$ dU:ScdA	20.0 (1/5)
		$\Delta$ GC at +1 position	20.0 (1/5)
		$\Delta$ TA at +2 position	20.0 (1/5)
		25 bp deletion at dU:ScdA	20.0 (1/5)
		26 bp deletion at dU:ScdA	20.0 (1/5)
RcdA/dU0	18.2	$\Delta$ dU:RcdA	100.0 (2/2)
		$\Delta$ T:ScdA	22.2 (2/9)
		$\Delta$ dU:G	33.3 (3/9)
ScdA/dU-1	90.0	4 bp deletion at T:ScdA	11.1 (1/9)
		8 bp deletion at T:ScdA	11.1 (1/9)
		U:G to T:A	22.2 (2/9)
		$\Delta$ dU:G	22.2 (2/9)
		$\Delta$ CG at +1 position	22.2 (2/9)
RcdA/dU-1	63.6	$\Delta$ TA at +2 position	11.1 (1/9)
		6 bp deletion at T:RcdA	11.1 (1/9)
		22 bp deletion at T:RcdA	11.1 (1/9)
		$\Delta$ T at 0 and $\Delta$ G at -1 positions	11.1 (1/9)
		U:G to T:A	11.1 (1/9)
		$\Delta$ T:ScdA	7.7 (1/13)
		$\Delta$ dU:G	30.8 (4/13)
ScdA/dU+1	100.0	$\Delta$ TA at +2 position	7.7 (1/13)
		C:G to C:A transition at -1 position	7.7 (1/13)
		U:G to T:G transition at + 1 position	7.7 (1/13)
		5 bp deletion at T:ScdA	7.7 (1/13)
		28 bp deletion at T:ScdA	7.7 (1/13)
		U:G to T:A	23.1 (3/13)
		$\Delta$ dU:G	27.3 (3/11)
RcdA/dU+1	90.9	$\Delta$ TA at +2 position	9.1 (1/11)
		$\Delta$ C at +1 position	9.1 (1/11)
		U:G to T:A	36.4 (4/11)
		5 bp deletion at T:ScdA	9.1 (1/11)
		T:RcdA to C:G	9.1 (1/11)

## RESULTS AND DISCUSSION

IR (e.g., ultraviolet, X-ray) can lead to the formation of characteristic lesion clusters which may decrease DNA repair efficiency (Sage & Harrison, 2011). This study evaluated the mutagenic potential of bistranded CDL (containing cdA and dU at different positions, Fig. 1) using a plasmid-based assay and an *E. coli* bacterial model (Cunniffe *et al.*, 2014). Mutations resulting from the presence of investigated CDL were characterized by sequence analysis. The results obtained have shown that the mutation frequency was much higher for investigated CDL than for the oligo with an undamaged sequence and oligos containing only dU or cdA lesions (Fig. S2 at <https://ojs.ptbioch.edu.pl/index.php/abp/>). The sequence of the undamaged oligonucleotide was intact after recovery of the *E. coli* plasmid. Furthermore, no mutations were found for oligos containing isolated lesions (Control 1–3, Fig. 1, Table S1 and Fig. S2 at <https://ojs.ptbioch.edu.pl/index.php/abp/>). Therefore, isolated lesions (dU and cdA) were effectively removed by the bacterial DNA repair systems and the correct genetic information was recovered. The situation became more complicated in the case of double-stranded CDL containing (5'S) 5',8-cyclo-2'-deoxyAdenosine (ScdA) or (5'R) 5',8-cyclo-2'-deoxyAdenosine (RcdA) on one strand and dU on the complementary strand distanced up to 4 bp (Fig. 1, Fig. S2 at <https://ojs.ptbioch.edu.pl/index.php/abp/>). The presence of RcdA has been shown to lead to a lower frequency of mutation formation than the presence of ScdA (Fig. 2). This observation was in good agreement with our previous, recently published studies of complex CDL in which RcdA was more easily repaired than ScdA; therefore, DNA repair enzymes are more likely to recognize and remove it from the plasmid sequence (Karwowski, 2013). On the other hand, previous studies have shown that the repair of lesions within the cluster occurs in a certain order to minimize the formation of potentially lethal double-strand breaks (DSB) (Cunniffe *et al.*, 2014; Lomax *et al.*, 2004; Eccles



**Figure 2.** Mutation frequency caused by bi-stranded clustered DNA lesions containing (5'S)-5',8-cyclo-2'-deoxyAdenosine (ScdA) or (5'R)-5',8-cyclo-2'-deoxyAdenosine (RcdA) and 2'-deoxyUridine (dU) separated by 0–4 bp.

Mutation frequency was calculated by dividing the number of mutations found in the single sample sequence by the total number of samples sequenced. The frequency of individual mutations was calculated by dividing the number of times a mutation occurred by the total number of mutated sequences.

*et al.*, 2009). The results presented may also indicate hierarchical repair (Eccles *et al.*, 2009). The results of the *E. coli*-based assay show that the 4 bp distance between the lesions within a cluster is sufficient for undisturbed removal of dU and cdA (Fig. 2). Oligos denoted as dU+4 and dU-4 for both diastereomers have shown no changes in the sequence (comparing to native, undamaged ds-oligo, Fig. S2 at <https://ojs.ptbioch.edu.pl/index.php/abp/>). The only exception occurred for the oligo denoted ScdA/dU-4, since a case of 22 bp deletion was detected at the ScdA site (Fig. 2 and Fig. S2 at <https://ojs.ptbioch.edu.pl/index.php/abp/>). It is noteworthy that in our previous *in vitro* studies on the influence of cdPu on the BER mechanism, dU+4 presented numerous significant difficulties during repair, *i.e.*, disturbed strand elongation by polymerases, no strand ligation, and strand degradation. However, it seemed that this mutual placement of the dU+4 lesion is not problematic in the case of a living organism, such as the discussed *E. coli* bacterial model.

The most mutagenic variants among the investigated ds-oligos comprised dU0, dU-1, and dU+1 (Fig. 2, Table 1). The mutation frequency increased in the following order: RcdA/dU0 < ScdA/dU0 < RcdA/dU-1 < ScdA/dU-1 < RcdA/dU+1 < ScdA/dU+1. The fact that clusters containing dU+1 (for both diastereomers of cdA) have the highest mutagenic potential corresponded to previous studies in eukaryotic models (Pearson *et al.*, 2004; Cunniffe *et al.*, 2014; Karwowski, 2019; Boguszewska *et al.*, 2021a; Kaźmierczak-Barańska *et al.*, 2021; Boguszewska *et al.*, 2021b; Karwowski *et al.*, 2014). It was found that the most abundant mutation in the case of ScdA/dU+1 was dU:G deletion (30.8%). The second most frequent change was U:G → T:A transition (Table 1). Interestingly, for RcdA/dU+1 the opposite results were observed. The most repeated mutation was U:G → T:A transition (36.4%) while deletion of the dU:G pair was the second most frequent in the structure of the clustered lesion area (Table 1). In the case of dU-1, the most common mutation was dU:G deletion for ScdA. In the case of RcdA/dU-1 dU:G deletion and C:G deletion located at position +1 to cdPu showed the same mutation frequency (22.2%, Table 1). Lesions located opposite each other within the cluster (position dU0) resulted in deletions at the damage site. When the (5'R) isomer was present within CDL, only the dU:RcdA pair was removed. On the other hand, oligos containing the ScdA/dU0 cluster resulted in point deletions at 0, +1, and +2 positions and a larger deletion of 26 bp (Table 1 and Fig. S2 at <https://ojs.ptbioch.edu.pl/index.php/abp/>). The results obtained and presented in this article of an *E. coli*-based assay suggest that the bacteria were more prone to remove 'problematic' base pairs from the DNA sequence that cause deletions than to replace them with correct or incorrect bases. This observation was made concerning a dU distanced 0 or 1 bp from the discussed CDL containing ScdA or RcdA. The deletions occurred most frequently at the location of dU, most probably due to disturbed processes of repair and/or replication.

In conclusion, it has been shown that cdA separated by 0 or 1 nucleobase from the other lesion located on the opposite strand within the cluster causes numerous mutations. The increased frequency of mutations may indicate impaired *E. coli* DNA repair mechanisms by CDL containing cdPus. On the other hand, the distance of 4 bp between cdA and dU within the cluster seemed to provide sufficient "space" for the repair enzymes to operate properly; therefore, the lesions were removed from the DNA sequence and the correct genetic information

was regained. In addition, the ScdA lesion seemed to be efficiently managed by bacterial repair mechanisms. This phenomenon is beneficial due to the more frequent incidence of ScdA isomer than RcdA in dsDNA. Additionally, transition mutations resulting from this complex case of CDL are likely to impair protein structures if they are located within a gene sequence. This study shed some new light on the repair machinery of complex CDL including cdA and dU by the entire living organism. The discussed results of the *E. coli*-based assay have confirmed some of our previous observations from *in vitro* experiments with cellular extracts of eukaryotic cells (xrs5, BJ, and XPC). Interestingly, the results have shown that despite the model (eukaryotic or bacterial) the distance between lesions within the cluster and the diastereomeric form of cdPu present similar trends of DNA repair disruptions. From our point of view, it provided additional verification of the previously presented trends that describe how the distance between cdPu and dU impacts the eukaryotic DNA repair processes and provided additional justification for performing CDL studies with *in vitro* models, which is common in the field. This study has shown for the first time the differences between the impact of diastereomeric forms of cdA on the repair of the second lesion in the *E. coli* model. This article presented preliminary and initial results that require further studies in the context of recognition of DNA repair mechanisms involved in the repair of CDL and tandem lesions induced by IR.

#### Declarations

**Author Contributions:** Conceptualization and methodology B.K.; validation, K.B., J.K.-B., and B.K.; formal analysis, K.B. and B.K.; investigation, K.B., and B.K.; resources, B.K.; data curation, B.K.; writing – original draft preparation, K.B., and B.K.; writing – review and editing, K.B., J.K.-B., and B.K.; visualization, K.B.; supervision, B.K.; project administration, B.K.; funding acquisition, B.K. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

**Compliance with Ethical Standards:** This article does not contain descriptions of studies performed by the authors with the participation of humans or using animals as objects.

#### REFERENCES

- Boguszewska K, Kaźmierczak-Barańska J, Karwowski BT (2021a) The influence of 5',8-cyclo-2'-deoxypurines on the mitochondrial repair of clustered DNA damage in xrs5 cells: The preliminary study. *Molecules* **26**: 7042. <https://doi.org/10.3390/molecules26227042>
- Boguszewska K, Szewczuk M, Kaźmierczak-Barańska J, Karwowski BT (2021b) 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* **10**: 725. <https://doi.org/10.3390/cells10040725>
- Brooks PJ (2017) The cyclopurine deoxynucleosides: DNA repair, biological effects, mechanistic insights, and unanswered questions. *Free Radic. Biol. Med.* **107**: 90–100. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2016.12.028>
- Cunniffe S, O'Neill P, Greenberg MM, Lomax ME (2014) Reduced repair capacity of a DNA clustered damage site comprised of 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine and 2-deoxyribonolactone results in an increased mutagenic potential of these lesions. *Mut. Res. – Fundam. Mol. Mech. Mutagen.* **762**: 32–39. <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2014.02.005>
- David-Cordonniert M-H, Laval J, O'Neil P (2000) Clustered DNA damage, influence on damage excision by xrs5 nuclear extracts and *Escherichia coli* Nth and Fpg proteins. *J. Biol. Chem.* **275**: 11865–11873. <https://doi.org/https://doi.org/10.1074/jbc.275.16.11865>
- Eccles IJ, Lomax ME, O'Neill P (2009) Hierarchy of lesion processing governs the repair, double-strand break formation, and mutability of three-lesion clustered DNA damage. *Nucleic Acids Res.* **38**: 1123–1134. <https://doi.org/10.1093/nar/gkp1070>
- Jasti VP, Das RS, Hilton BA, Weerasooriya S, Zou Y, Basu AK (2011) (5'S)-8,5'-Cyclo-2'-Deoxyguanosine is a strong block to replication, a potent pol V-dependent mutagenic lesion, and is inefficiently repaired in *Escherichia coli*. *Biochemistry* **50**: 3862–3865. <https://doi.org/10.1021/bi2004944>
- Karwowski BT (2013) The role of (5'R) and (5'S) 5',8-cyclo-2'-deoxyadenosine in ds-DNA structure. A comparative QM/MM theoretical study. *Comput. Theor. Chem.* **1010**: 38–44. <https://doi.org/10.1016/j.comptc.2013.01.014>
- Karwowski BT, Bellon S, O'Neill P, Lomax ME, Cadet J (2014) Effects of (5'S)-5',8-cyclo-2'-deoxyadenosine on the base excision repair of oxidatively generated clustered DNA damage. A biochemical and theoretical study. *Org. Biomol. Chem.* **12**: 8671–8682. <https://doi.org/10.1039/c4ob01089b>
- Karwowski BT (2019) 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. *Cells* **8**: 1303 <https://doi.org/10.3390/cells8111303>
- Karwowski BT (2021) (5'S) 5',8-cyclo-2'-deoxyadenosine cannot stop BER. Clustered DNA lesion studies. *Int. J. Mol. Sci.* **22**: 1–18. <https://doi.org/10.3390/ijms22115934>
- Kaźmierczak-Barańska J, Boguszewska K, Szewczuk M, Karwowski BT (2021) 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* **10**: 3254. <https://doi.org/10.3390/cells10113254>
- Kuraoka I, Bender C, Romieu A, Cadet J, Wood RD, Lindahl T (2000) 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.* **97**: 3832–3837. <https://doi.org/10.1073/pnas.070471597>
- Kusumoto R, Masutani C, Iwai S, Hanaoka F (2002) Translesion synthesis by human DNA polymerase  $\eta$  across thymine glycol lesions. *Biochemistry* **41**: 6090–6099. <https://doi.org/10.1021/bi025549k>
- Lomax ME, Cunniffe S, O'Neill P (2004) 8-OxoG retards the activity of the ligase III/XRCC1 complex during the repair of a single-strand break, when present within a clustered DNA damage site. *DNA Repair* **3**: 289–299. <https://doi.org/10.1016/j.DNAREP.2003.11.006>
- Pearson CG, Shikazono N, Thacker J, O'Neill P (2004) Enhanced mutagenic potential of 8-oxo-7,8-dihydroguanine when present within a clustered DNA damage site. *Nucleic Acids Res.* **32**: 263–270. <https://doi.org/10.1093/nar/gkh150>
- Pednekar V, Weerasooriya S, Jasti VP, Basu AK (2014) Mutagenicity and genotoxicity of (5'S)-8,5'-cyclo-2'-deoxyadenosine in *Escherichia coli* and replication of (5'S)-8,5'-cyclopurine-2'-deoxynucleosides *in vitro* by DNA polymerase IV, exo-free Klenow fragment, and Dpo4. *Chem. Res. Toxicol.* **27**: 200–210. <https://doi.org/10.1021/tx4002786>
- Sage E, Harrison L (2011) Clustered DNA lesion repair in eukaryotes: Relevance to mutagenesis and cell survival. *Mut. Res. – Fundam. Mol. Mech. Mutagen.* **711**: 123–133. <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2010.12.010>
- Szewczuk M, Boguszewska K, Kaźmierczak-Barańska J, Karwowski BT (2021) 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* **26**: 5177 <https://doi.org/10.3390/molecules26175177>

## Supplementary Materials

### Mutagenicity of a bi-stranded clustered DNA Lesion containing (5'S) or (5'R) 5',8-cyclo-2'-deoxyAdenosine in *Escherichia coli* model

K. Boguszewska, J. Kaźmierczak-Barańska and B. T. Karwowski

**Table S1.** The list of full sequences of double-stranded substrate oligonucleotides containing 2'-deoxyuridine (dU) and 5',8-cyclo-2'-deoxyadenosine (cdA).

	Sequence
Native	5' -CTCTTGTCAGGAATATTGTCTCTATGCTCCCACCAAAGGC-3' 3' -GAGAACAGTCCTTATAACAGAGATACGAGGGTGGTTTCCG-5'
Control 1	5' -CTCTTGTCAGGAATATTGTCT <u>U</u> CTATGCTCCCACCAAAGGC-3' 3' -GAGAACAGTCCTTATAACAGAGATACGAGGGTGGTTTCCG-5'
Control 2 / Control 3	5' -GCCTTTGGTGGGAGCATAG <u>X</u> GACAATATTCCTGACAAGAG-3' 3' -CGGAAACCACCCTCGTATCTCTGTTATAAGGACTGTTCTC-5'
dU-4	5' -CTCTTGTCAGGAATATTGTCTCTATGCTCCCACCAAAGGC-3' 3' -GAGAACAGTCCTTATAACAG <u>X</u> GATACGAGGGTGGTTTCCG-5'
dU-1	5' -CTCTTGTCAGGAATATTGTCT <u>U</u> CTATGCTCCCACCAAAGGC-3' 3' -GAGAACAGTCCTTATAACAG <u>X</u> GATACGAGGGTGGTTTCCG-5'
dU0	5' -CTCTTGTCAGGAATATTGTCT <u>U</u> CTATGCTCCCACCAAAGGC-3' 3' -GAGAACAGTCCTTATAACAG <u>X</u> GATACGAGGGTGGTTTCCG-5'
dU+1	5' -CTCTTGTCAGGAATATTGTCT <u>U</u> TATGCTCCCACCAAAGGC-3' 3' -GAGAACAGTCCTTATAACAG <u>X</u> GATACGAGGGTGGTTTCCG-5'
dU+4	5' -CTCTTGTCAGGAATATTGTCTCTA <u>U</u> GCTCCCACCAAAGGC-3' 3' -GAGAACAGTCCTTATAACAG <u>X</u> GATACGAGGGTGGTTTCCG-5'

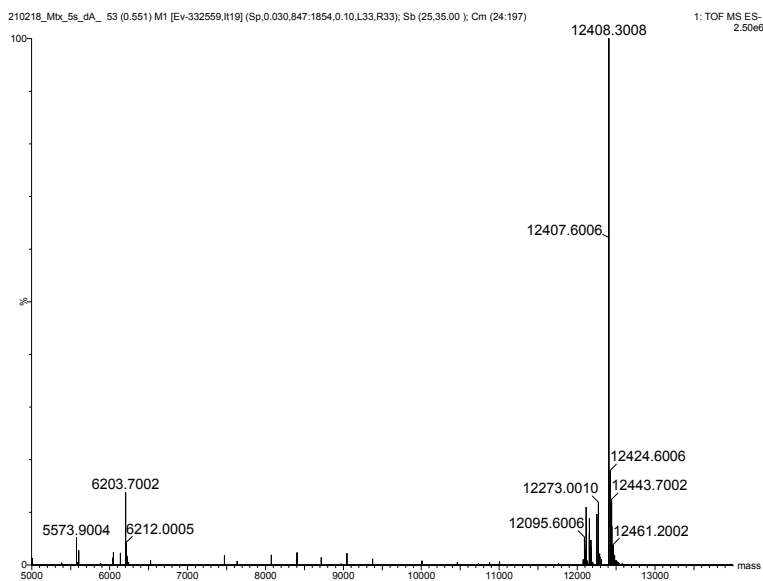
U – represents 2'-deoxyuridine (dU); X – represents (5'S)-5',8-cyclo-2'-deoxyadenosine (ScdA) or (5'R)-5',8-cyclo-2'-deoxyadenosine (RcdA)

**Table S2.** The masses (calculated vs. found) of chosen substrate oligonucleotides (40 bp).

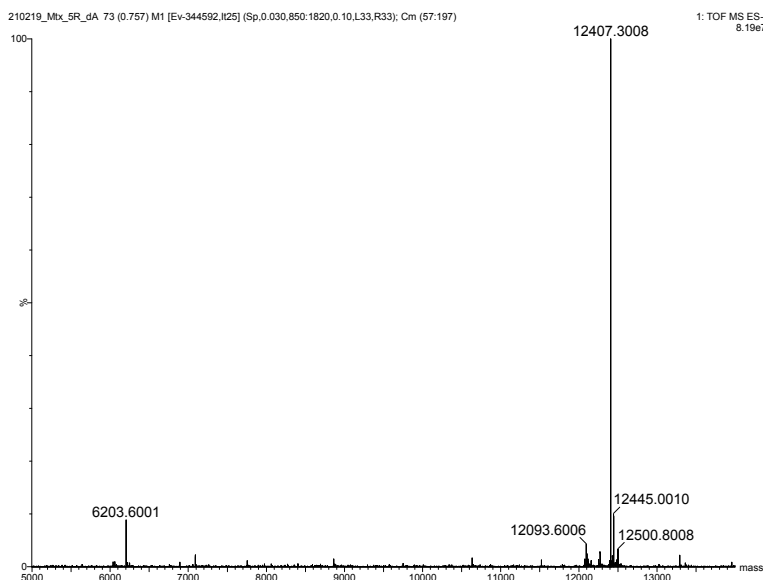
Oligonucleotide	Calculated Mass	Found Mass
Control 1 (dU strand)	12,167.90	12,168.25
Native	12,181.98	12,182.42
Mtx-ScdA	12,407.00	12,408.30
Mtx-RcdA	12,407.00	12,407.30



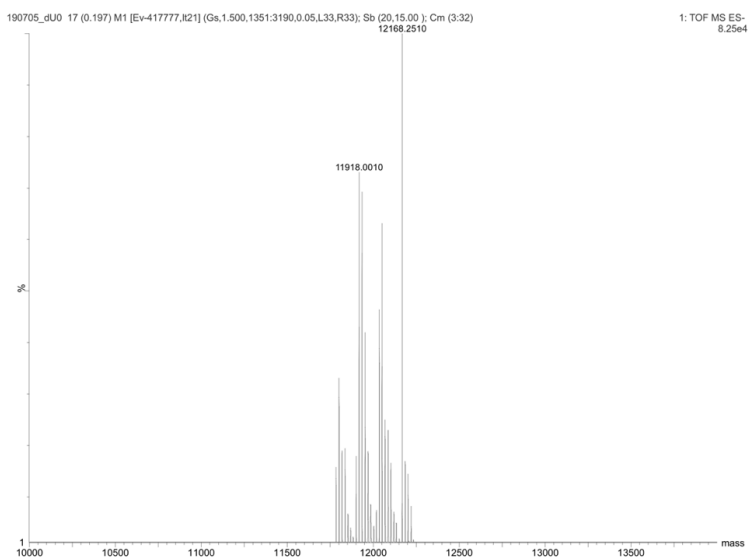
**A. ssDNA with (5'S)-5',8-cyclo-2'-deoxyadenosine (Mtx-ScdA)**



**B. ssDNA with (5'R)-5',8-cyclo-2'-deoxyadenosine (Mtx-RcdA)**



C. ssDNA with 2'-deoxyuridine (Control 1 – dU strand)



D. native ssDNA

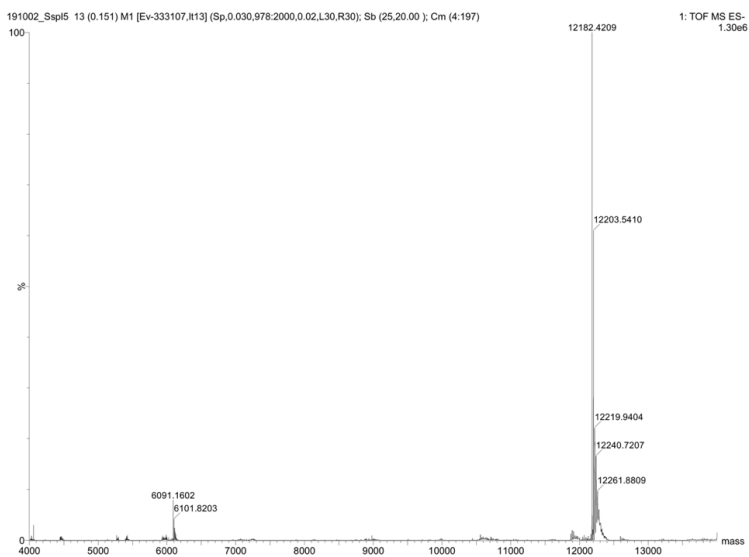


Figure S1. Mass spectra of substrate oligonucleotides containing cdPu.



D. Control 3

Oligo		Sequence - before E.coli transformation	
Control 3	5' CTCTTTGTCAGGAAATAATTGTC 3' GAGAACAAGTCCCTATAAACAAG	T RX	CTATGCTCCCAACCAAGGC3' GATACGAGGGTGGTTTCCG5'
Sequence - after plasmid recovery from E.coli			
Sample 1	5' CTCTTTGTCAGGAAATAATTGTC 3' GAGAACAAGTCCCTATAAACAAG	T A	CTATGCTCCCAACCAAGGC3' GATACGAGGGTGGTTTCCG5'
Sample 2	5' CTCTTTGTCAGGAAATAATTGTC 3' GAGAACAAGTCCCTATAAACAAG	T A	CTATGCTCCCAACCAAGGC3' GATACGAGGGTGGTTTCCG5'
Sample 3	5' CTCTTTGTCAGGAAATAATTGTC 3' GAGAACAAGTCCCTATAAACAAG	T A	CTATGCTCCCAACCAAGGC3' GATACGAGGGTGGTTTCCG5'
Sample 4	5' CTCTTTGTCAGGAAATAATTGTC 3' GAGAACAAGTCCCTATAAACAAG	T A	CTATGCTCCCAACCAAGGC3' GATACGAGGGTGGTTTCCG5'
Sample 5	5' CTCTTTGTCAGGAAATAATTGTC 3' GAGAACAAGTCCCTATAAACAAG	T A	CTATGCTCCCAACCAAGGC3' GATACGAGGGTGGTTTCCG5'
Sample 6	5' CTCTTTGTCAGGAAATAATTGTC 3' GAGAACAAGTCCCTATAAACAAG	T A	CTATGCTCCCAACCAAGGC3' GATACGAGGGTGGTTTCCG5'
Sample 7	5' CTCTTTGTCAGGAAATAATTGTC 3' GAGAACAAGTCCCTATAAACAAG	T A	CTATGCTCCCAACCAAGGC3' GATACGAGGGTGGTTTCCG5'
Sample 8	5' CTCTTTGTCAGGAAATAATTGTC 3' GAGAACAAGTCCCTATAAACAAG	T A	CTATGCTCCCAACCAAGGC3' GATACGAGGGTGGTTTCCG5'
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			

E. ScdA/dUO

Oligo		Sequence - before E.coli transformation	
ScdA/dUO	5' CTCTTTGTCAGGAAATAATTGTC 3' GAGAACAAGTCCCTATAAACAAG	U RX	CTATGCTCCCAACCAAGGC3' GATACGAGGGTGGTTTCCG5'
Sequence - after plasmid recovery from E.coli			
Sample 1	5' CTCTTTGTCAGGAAATAATTGTC 3' GAGAACAAGTCCCTATAAACAAG	T A	CTATGCTCCCAACCAAGGC3' GATACGAGGGTGGTTTCCG5'
Sample 2	5' CTCTTTGTCAGGAAATAATTGTC 3' GAGAACAAGTCCCTATAAACAAG	T A	CTATGCTCCCAACCAAGGC3' GATACGAGGGTGGTTTCCG5'
Sample 3	5' CTCTTTGTCAGGAAATAATTGTC 3' GAGAACAAGTCCCTATAAACAAG	T A	CTATGCTCCCAACCAAGGC3' GATACGAGGGTGGTTTCCG5'
Sample 4	5' CTCTTTGTCAGGAAATAATTGTC 3' GAGAACAAGTCCCTATAAACAAG	T A	CTATGCTCCCAACCAAGGC3' GATACGAGGGTGGTTTCCG5'
Sample 5	5' CTCTTTGTCAGGAAATAATTGTC 3' GAGAACAAGTCCCTATAAACAAG	T A	CTATGCTCCCAACCAAGGC3' GATACGAGGGTGGTTTCCG5'
Sample 6	5' CTCTTTGTCAGGAAATAATTGTC 3' GAGAACAAGTCCCTATAAACAAG	T A	CTATGCTCCCAACCAAGGC3' GATACGAGGGTGGTTTCCG5'
Sample 7	5' <span style="color: red;">Δ</span> 3' <span style="color: red;">Δ</span>		GCTCCCAACCAAGGC3' CGAGGGTGGTTTCCG5'
Sample 8	5' CTCTTTGTCAGGAAATAATTGTC 3' GAGAACAAGTCCCTATAAACAAG	Δ Δ	CTATGCTCCCAACCAAGGC3' GATACGAGGGTGGTTTCCG5'
Sample 9	5' <span style="color: red;">Δ</span> 3' <span style="color: red;">Δ</span>		CTCCCAACCAAGGC3' GAGGGTGGTTTCCG5'
Sample 10	5' CTCTTTGTCAGGAAATAATTGTC 3' GAGAACAAGTCCCTATAAACAAG	T A	CTATGCTCCCAACCAAGGC3' GATACGAGGGTGGTTTCCG5'
Sample 11	5' CTCTTTGTCAGGAAATAATTGTC 3' GAGAACAAGTCCCTATAAACAAG	T A	CTATGCTCCCAACCAAGGC3' GATACGAGGGTGGTTTCCG5'
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			

F. RcdA/dUO

Oligo	Sequence - before E.coli transformation	
RcdA/dUO	5' CTCTTTGTCAGGAAATAATTGTC	UCTATGCTCCCAACCAAGGC3'
	3' GAGAACAGTCCCTATAACAAG	RXGATAAGGGTGGTTTCCG5'
Sequence - after plasmid recovery from E.coli		
Sample 1	5' CTCTTTGTCAGGAAATAATTGTC	TCTATGCTCCCAACCAAGGC3'
	3' GAGAACAGTCCCTATAACAAG	AGATAAGGGTGGTTTCCG5'
Sample 2	5' CTCTTTGTCAGGAAATAATTGTC	TCTATGCTCCCAACCAAGGC3'
	3' GAGAACAGTCCCTATAACAAG	AGATAAGGGTGGTTTCCG5'
Sample 3	5' CTCTTTGTCAGGAAATAATTGTC	TCTATGCTCCCAACCAAGGC3'
	3' GAGAACAGTCCCTATAACAAG	AGATAAGGGTGGTTTCCG5'
Sample 4	5' CTCTTTGTCAGGAAATAATTGTC	TCTATGCTCCCAACCAAGGC3'
	3' GAGAACAGTCCCTATAACAAG	AGATAAGGGTGGTTTCCG5'
Sample 5	5' CTCTTTGTCAGGAAATAATTGTC	TCTATGCTCCCAACCAAGGC3'
	3' GAGAACAGTCCCTATAACAAG	AGATAAGGGTGGTTTCCG5'
Sample 6	5' CTCTTTGTCAGGAAATAATTGTC	TCTATGCTCCCAACCAAGGC3'
	3' GAGAACAGTCCCTATAACAAG	AGATAAGGGTGGTTTCCG5'
Sample 7	5' CTCTTTGTCAGGAAATAATTGTC	TCTATGCTCCCAACCAAGGC3'
	3' GAGAACAGTCCCTATAACAAG	AGATAAGGGTGGTTTCCG5'
Sample 8	5' CTCTTTGTCAGGAAATAATTGTC	TCTATGCTCCCAACCAAGGC3'
	3' GAGAACAGTCCCTATAACAAG	AGATAAGGGTGGTTTCCG5'
Sample 9	5' CTCTTTGTCAGGAAATAATTGTC	TCTATGCTCCCAACCAAGGC3'
	3' GAGAACAGTCCCTATAACAAG	AGATAAGGGTGGTTTCCG5'
Sample 10	5' CTCTTTGTCAGGAAATAATTGTC	TCTATGCTCCCAACCAAGGC3'
	3' GAGAACAGTCCCTATAACAAG	AGATAAGGGTGGTTTCCG5'
Sample 11	5' CTCTTTGTCAGGAAATAATTGTC	TCTATGCTCCCAACCAAGGC3'
	3' GAGAACAGTCCCTATAACAAG	AGATAAGGGTGGTTTCCG5'

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

G. ScdA/dU-1

Oligo	Sequence - before E.coli transformation	
ScdA/dU-1	5' CTCTTTGTCAGGAAATAATTGTC	UCTATGCTCCCAACCAAGGC3'
	3' GAGAACAGTCCCTATAACAAG	SXGATAAGGGTGGTTTCCG5'
Sequence - after plasmid recovery from E.coli		
Sample 1	5' CTCTTTGTCAGGAAATAATTGTC	CCTATGCTCCCAACCAAGGC3'
	3' GAGAACAGTCCCTATAACAAG	AGATAAGGGTGGTTTCCG5'
Sample 2	5' CTCTTTGTCAGGAAATAATTGTC	TCTATGCTCCCAACCAAGGC3'
	3' GAGAACAGTCCCTATAACAAG	AGATAAGGGTGGTTTCCG5'
Sample 3	5' CTCTTTGTCAGGAAATAATTGTC	TCTATGCTCCCAACCAAGGC3'
	3' GAGAACAGTCCCTATAACAAG	AGATAAGGGTGGTTTCCG5'
Sample 4	5' CTCTTTGTCAGGAAATAATTGTC	TCTATGCTCCCAACCAAGGC3'
	3' GAGAACAGTCCCTATAACAAG	AGATAAGGGTGGTTTCCG5'
Sample 5	5' CTCTTTGTCAGGAAATAATTGTC	TCTATGCTCCCAACCAAGGC3'
	3' GAGAACAGTCCCTATAACAAG	AGATAAGGGTGGTTTCCG5'
Sample 6	5' CTCTTTGTCAGGAAATAATTGTC	TCTATGCTCCCAACCAAGGC3'
	3' GAGAACAGTCCCTATAACAAG	AGATAAGGGTGGTTTCCG5'
Sample 7	5' CTCTTTGTCAGGAAATAATTGTC	TCTATGCTCCCAACCAAGGC3'
	3' GAGAACAGTCCCTATAACAAG	AGATAAGGGTGGTTTCCG5'
Sample 8	5' CTCTTTGTCAGGAAATAATTGTC	TCTATGCTCCCAACCAAGGC3'
	3' GAGAACAGTCCCTATAACAAG	AGATAAGGGTGGTTTCCG5'
Sample 9	5' CTCTTTGTCAGGAAATAATTGTC	TCTATGCTCCCAACCAAGGC3'
	3' GAGAACAGTCCCTATAACAAG	AGATAAGGGTGGTTTCCG5'
Sample 10	5' CTCTTTGTCAGGAAATAATTGTC	TCTATGCTCCCAACCAAGGC3'
	3' GAGAACAGTCCCTATAACAAG	AGATAAGGGTGGTTTCCG5'

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

H. RcdA/dU-1

Oligo		Sequence - before E.coli transformation	
RcdA/dU-1	5'	C T C T T G T C A G G A A T A T T G T U T C T A T G C T C C A C C A A A G G C 3'	
	3'	G A G A A C A G T C C T T A T A A C A G R X G A T A C G A G G G T G G T T T C C G 5'	
Sequence - after plasmid recovery from E.coli			
Sample 1	5'	C T C T T G T C A G G A A T A T T G T C T C T A T G C T C C C A C C A A A G G C 3'	
	3'	G A G A A C A G T C C T T A T A A C A G A G A T A C G A G G G T G G T T T C C G 5'	
Sample 2	5'	C T C T T G T C A G G A A T A T T G T T A T G T C C C A C C A A A G G C 3'	
	3'	G A G A A C A G T C C T T A T A A C A G A A T A C A G A G G G T G G T T T C C G 5'	
Sample 3	5'	C T C T T G T C A G G A A T A T T G T T C T A T G C T C C C A C C A A A G G C 3'	
	3'	G A G A A C A G T C C T T A T A A C A G A G A T A C G A G G G T G G T T T C C G 5'	
Sample 4	5'	C T C T T G T C A G G A A T A T T G T C T C T A T G C T C C C A C C A A A G G C 3'	
	3'	G A G A A C A G T C C T T A T A A C A G A G A T A C G A G G G T G G T T T C C G 5'	
Sample 5	5'	C T C T T G T C A G G A A T A T T G T C T C T A T G C T C C C A C C A A A G G C 3'	
	3'	G A G A A C A G T C C T T A T A A C A G A G A T A C G A G G G T G G T T T C C G 5'	
Sample 6	5'	C T C T T G T C A G G A A T A T T G T T T C T A T G C T C C C A C C A A A G G C 3'	
	3'	G A G A A C A G T C C T T A T A A C A G A G A T A C G A G G G T G G T T T C C G 5'	
Sample 7	5'	C T C T T G T C A G G A A T A T T G T A T G C T C C C A C C A A A G G C 3'	
	3'	G A G A A C A G T C C T T A T A A A T A C G A G G G T G G T T T C C G 5'	
Sample 8	5'	C T C T T G T C A G G A A T A T T G T C T C T A T G C T C C C A C C A A A G G C 3'	
	3'	G A G A A C A G T C C T T A T A A C A G A G A T A C G A G G G T G G T T T C C G 5'	
Sample 9	5'	C T C T T G T C A G G A A T A T T G T C T A T G C T C C C A C C A A A G G C 3'	
	3'	G A G A A C A G T C C T T A T A A C A G A G A T A C G A G G G T G G T T T C C G 5'	
Sample 10	5'	C T C T T G T C A G G A A T A T T G	3'
	3'	G A G A A C A G T C C T T A T A A C	5'
Sample 11	5'	C T C T T G T C A G G A A T A T T G T C T A T G C T C C C A C C A A A G G C 3'	
	3'	G A G A A C A G T C C T T A T A A C A G A T A C G A G G G T G G T T T C C G 5'	

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

I. ScdA/dU+1

Oligo		Sequence - before E.coli transformation	
ScdA/dU+1	5'	C T C T T G T C A G G A A T A T T G T C T U T A T G C T C C C A C C A A A G G C 3'	
	3'	G A G A A C A G T C C T T A T A A C A G S X G A T A C G A G G G T G G T T T C C G 5'	
Sequence - after plasmid recovery from E.coli			
Sample 1	5'	C T C T T G T C A G G A A T A T T G T C T T A T G C T C C C A C C A A A G G C 3'	
	3'	G A G A A C A G T C C T T A T A A C A G A A A T A C G A G G G T G G T T T C C G 5'	
Sample 2	5'	C T C T T G T C A G G A A T A T T G T C T A T G C T C C C A C C A A A G G C 3'	
	3'	G A G A A C A G T C C T T A T A A C A G A A T A C G A G G G T G G T T T C C G 5'	
Sample 3	5'	C T C T T G T C A G G A A T A T T G T C T A T C T C C C A C C A A A G G C 3'	
	3'	G A G A A C A G T C C T T A T A A C A G A T A G A G G G T G G T T T C C G 5'	
Sample 4	5'	C T C T T G T C A G G A A T A T T G T C T T A T G C T C C C A C C A A A G G C 3'	
	3'	G A G A A C A G T C C T T A T A A C A G A G A T A C G A G G G T G G T T T C C G 5'	
Sample 5	5'	C T C T T G T C A G G A A T A T T G T C T T A T G C T C C C A C C A A A G G C 3'	
	3'	G A G A A C A G T C C T T A T A A C A G A A A T A C G A G G G T G G T T T C C G 5'	
Sample 6	5'	C T C T T G T C A G G A A T A T T G T C T A T G C T C C C A C C A A A G G C 3'	
	3'	G A G A A C A G T C C T T A T A A C A G A A T A C G A G G G T G G T T T C C G 5'	
Sample 7	5'	C T C T T G T C A G G A A T A T T G T C T A G C T C C C A C C A A A G G C 3'	
	3'	G A G A A C A G T C C T T A T A A C A G G A T C G A G G G T G G T T T C C G 5'	
Sample 8	5'	C T C T T G T C A G G A A T A T T G T C T T A T G C T C C C A C C A A A G G C 3'	
	3'	G A G A A C A G T C C T T A T A A C A G A A A T A C G A G G G T G G T T T C C G 5'	
Sample 9	5'	C T C T T G T C A G G A A T A T T G T C T A T G C T C C C A C C A A A G G C 3'	
	3'	G A G A A C A G T C C T T A T A A C A G A A T A C G A G G G T G G T T T C C G 5'	
Sample 10	5'	C T C T T G T C A G G A A T A T T G T T G C T C C C A C C A A A G G C 3'	
	3'	G A G A A C A G T C C T T A T A A C A A C G A G G G T G G T T T C C G 5'	
Sample 11	5'	C T C T T G T C A G G A	3'
	3'	G A G A A C A G T C C T	5'

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

J. RcdA/dU+1

Oligo		Sequence - before E.coli transformation	
RcdA/dU+1	5' CTCTTGTCAAGGAATAATTGTCTCT	U	TATGCTCCCAACAAGGC3'
	3' GAGAACAGTCCCTTATAACAAG	RX	GATACGAGGGTGGTTTCCG5'
Sequence - after plasmid recovery from E.coli			
Sample 1	5' CTCTTGTCAAGGAATAATTGTCTCT	T	TATGCTCCCAACAAGGC3'
	3' GAGAACAGTCCCTTATAACAAG	A	AATACGAGGGTGGTTTCCG5'
Sample 2	5' CTCTTGTCAAGGAATAATTGTCTCT	T	TATGCTCCCAACAAGGC3'
	3' GAGAACAGTCCCTTATAACAAG	A	AATACGAGGGTGGTTTCCG5'
Sample 3	5' CTCTTGTCAAGGAATAATTGTCTCT	T	TATGCTCCCAACAAGGC3'
	3' GAGAACAGTCCCTTATAACAAG	A	Δ AATACGAGGGTGGTTTCCG5'
Sample 4	5' CTCTTGTCAAGGAATAATTGTCTCT	C	TATGCTCCCAACAAGGC3'
	3' GAGAACAGTCCCTTATAACAAG	G	GATACGAGGGTGGTTTCCG5'
Sample 5	5' CTCTTGTCAAGGAATAATTGTCTCT	C	TATGCTCCCAACAAGGC3'
	3' GAGAACAGTCCCTTATAACAAG	A	GATACGAGGGTGGTTTCCG5'
Sample 6	5' CTCTTGTCAAGGAATAATTGTCTCT	T	TATGCTCCCAACAAGGC3'
	3' GAGAACAGTCCCTTATAACAAG	A	AATACGAGGGTGGTTTCCG5'
Sample 7	5' CTCTTGTCAAGGAATAATTGTCTCT	T	TATGCTCCCAACAAGGC3'
	3' GAGAACAGTCCCTTATAACAAG	A	Δ AATACGAGGGTGGTTTCCG5'
Sample 8	5' CTCTTGTCAAGGAATAATTGTCTCT	T	TATGCTCCCAACAAGGC3'
	3' GAGAACAGTCCCTTATAACAAG	A	AATACGAGGGTGGTTTCCG5'
Sample 9	5' CTCTTGTCAAGGAATAATTGTCTCT	T	TATGCTCCCAACAAGGC3'
	3' GAGAACAGTCCCTTATAACAAG	A	Δ AATACGAGGGTGGTTTCCG5'
Sample 10	5' CTCTTGTCAAGGAATAATTGTCTCT		GCTCCCAACAAGGC3'
	3' GAGAACAGTCCCTTATAACAAG		Δ C G A G G G T G G T T T C C G 5'
Sample 11	5' CTCTTGTCAAGGAATAATTGTCTCT	T	TATGCTCCCAACAAGGC3'
	3' GAGAACAGTCCCTTATAACAAG	A	Δ GATACGAGGGTGGTTTCCG5'

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

K. ScdA/dU-4

Oligo		Sequence - before E.coli transformation	
ScdA/dU-4	5' CTCTTGTCAAGGAATAATTGTCTCT	U	TATGCTCCCAACAAGGC3'
	3' GAGAACAGTCCCTTATAACAAG	SX	GATACGAGGGTGGTTTCCG5'
Sequence - after plasmid recovery from E.coli			
Sample 1	5' CTCTTGTCAAGGAATAATTGTCTCT	T	TATGCTCCCAACAAGGC3'
	3' GAGAACAGTCCCTTATAACAAG	A	GATACGAGGGTGGTTTCCG5'
Sample 2	5' CTCTTGTCAAGGAATAATTGTCTCT	T	TATGCTCCCAACAAGGC3'
	3' GAGAACAGTCCCTTATAACAAG	A	GATACGAGGGTGGTTTCCG5'
Sample 3	5' CTCTTGTCAAGGAATAATTGTCTCT	T	TATGCTCCCAACAAGGC3'
	3' GAGAACAGTCCCTTATAACAAG	A	GATACGAGGGTGGTTTCCG5'
Sample 4	5' CTCTTGTCAAGGAATAATTGTCTCT	T	TATGCTCCCAACAAGGC3'
	3' GAGAACAGTCCCTTATAACAAG	A	GATACGAGGGTGGTTTCCG5'
Sample 5	5' CTCTTGTCAAGGAATAATTGTCTCT	T	TATGCTCCCAACAAGGC3'
	3' GAGAACAGTCCCTTATAACAAG	A	GATACGAGGGTGGTTTCCG5'
Sample 6	5' CTCTTGTCAAGGAATAATTGTCTCT	T	TATGCTCCCAACAAGGC3'
	3' GAGAACAGTCCCTTATAACAAG	A	GATACGAGGGTGGTTTCCG5'
Sample 7	5' CTCTTGTCAAGGAATAATTGTCTCT	T	TATGCTCCCAACAAGGC3'
	3' GAGAACAGTCCCTTATAACAAG	A	GATACGAGGGTGGTTTCCG5'
Sample 8	5' CTCTTGTCAAGGAATAATTGTCTCT	T	TATGCTCCCAACAAGGC3'
	3' GAGAACAGTCCCTTATAACAAG	A	GATACGAGGGTGGTTTCCG5'
Sample 9	5' CTCTTGTCAAGGAATAATTGTCTCT	T	TATGCTCCCAACAAGGC3'
	3' GAGAACAGTCCCTTATAACAAG	A	GATACGAGGGTGGTTTCCG5'
Sample 10	5' CTCTTGTCAAGGAATAATTGTCTCT	T	TATGCTCCCAACAAGGC3'
	3' GAGAACAGTCCCTTATAACAAG	A	GATACGAGGGTGGTTTCCG5'
Sample 11	5' CTCTTGTCAAGGAATAATTGTCTCT		Δ 3'
	3' GAGAACAGTCCCTTATAACAAG		5'

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

L. RcdA/dU-4

Oligo		Sequence - before E.coli transformation	
RcdA/dU-4	5'	CTCTTGTCAGGAAATATTU	GTCCTCTATGCTCCCAACCAAGGC3'
	3'	GAGAACAGTCCCTTATAACAAG	RXGATACGAGGGTGGTTTCCG5'
Sequence - after plasmid recovery from E.coli			
Sample 1	5'	CTCTTGTCAGGAAATATT	TGTCCTCTATGCTCCCAACCAAGGC3'
	3'	GAGAACAGTCCCTTATAACAAG	AGATACGAGGGTGGTTTCCG5'
Sample 2	5'	CTCTTGTCAGGAAATATT	TGTCCTCTATGCTCCCAACCAAGGC3'
	3'	GAGAACAGTCCCTTATAACAAG	AGATACGAGGGTGGTTTCCG5'
Sample 3	5'	CTCTTGTCAGGAAATATT	TGTCCTCTATGCTCCCAACCAAGGC3'
	3'	GAGAACAGTCCCTTATAACAAG	AGATACGAGGGTGGTTTCCG5'
Sample 4	5'	CTCTTGTCAGGAAATATT	TGTCCTCTATGCTCCCAACCAAGGC3'
	3'	GAGAACAGTCCCTTATAACAAG	AGATACGAGGGTGGTTTCCG5'
Sample 5	5'	CTCTTGTCAGGAAATATT	TGTCCTCTATGCTCCCAACCAAGGC3'
	3'	GAGAACAGTCCCTTATAACAAG	AGATACGAGGGTGGTTTCCG5'
Sample 6	5'	CTCTTGTCAGGAAATATT	TGTCCTCTATGCTCCCAACCAAGGC3'
	3'	GAGAACAGTCCCTTATAACAAG	AGATACGAGGGTGGTTTCCG5'
Sample 7	5'	CTCTTGTCAGGAAATATT	TGTCCTCTATGCTCCCAACCAAGGC3'
	3'	GAGAACAGTCCCTTATAACAAG	AGATACGAGGGTGGTTTCCG5'
Sample 8	5'	CTCTTGTCAGGAAATATT	TGTCCTCTATGCTCCCAACCAAGGC3'
	3'	GAGAACAGTCCCTTATAACAAG	AGATACGAGGGTGGTTTCCG5'
Sample 9	5'	CTCTTGTCAGGAAATATT	TGTCCTCTATGCTCCCAACCAAGGC3'
	3'	GAGAACAGTCCCTTATAACAAG	AGATACGAGGGTGGTTTCCG5'
Sample 10	5'	CTCTTGTCAGGAAATATT	TGTCCTCTATGCTCCCAACCAAGGC3'
	3'	GAGAACAGTCCCTTATAACAAG	AGATACGAGGGTGGTTTCCG5'

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

M. ScdA/dU+4

Oligo		Sequence - before E.coli transformation	
ScdA/dU+4	5'	CTCTTGTCAGGAAATATTGTC	TCTATUGCTCCCAACCAAGGC3'
	3'	GAGAACAGTCCCTTATAACAAG	SXGATACGAGGGTGGTTTCCG5'
Sequence - after plasmid recovery from E.coli			
Sample 1	5'	CTCTTGTCAGGAAATATTGTC	TCTATUGCTCCCAACCAAGGC3'
	3'	GAGAACAGTCCCTTATAACAAG	AGATACGAGGGTGGTTTCCG5'
Sample 2	5'	CTCTTGTCAGGAAATATTGTC	TCTATUGCTCCCAACCAAGGC3'
	3'	GAGAACAGTCCCTTATAACAAG	AGATACGAGGGTGGTTTCCG5'
Sample 3	5'	CTCTTGTCAGGAAATATTGTC	TCTATUGCTCCCAACCAAGGC3'
	3'	GAGAACAGTCCCTTATAACAAG	AGATACGAGGGTGGTTTCCG5'
Sample 4	5'	CTCTTGTCAGGAAATATTGTC	TCTATUGCTCCCAACCAAGGC3'
	3'	GAGAACAGTCCCTTATAACAAG	AGATACGAGGGTGGTTTCCG5'
Sample 5	5'	CTCTTGTCAGGAAATATTGTC	TCTATUGCTCCCAACCAAGGC3'
	3'	GAGAACAGTCCCTTATAACAAG	AGATACGAGGGTGGTTTCCG5'
Sample 6	5'	CTCTTGTCAGGAAATATTGTC	TCTATUGCTCCCAACCAAGGC3'
	3'	GAGAACAGTCCCTTATAACAAG	AGATACGAGGGTGGTTTCCG5'
Sample 7	5'	CTCTTGTCAGGAAATATTGTC	TCTATUGCTCCCAACCAAGGC3'
	3'	GAGAACAGTCCCTTATAACAAG	AGATACGAGGGTGGTTTCCG5'
Sample 8	5'	CTCTTGTCAGGAAATATTGTC	TCTATUGCTCCCAACCAAGGC3'
	3'	GAGAACAGTCCCTTATAACAAG	AGATACGAGGGTGGTTTCCG5'
Sample 9	5'	CTCTTGTCAGGAAATATTGTC	TCTATUGCTCCCAACCAAGGC3'
	3'	GAGAACAGTCCCTTATAACAAG	AGATACGAGGGTGGTTTCCG5'

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



N. RcdA/dU+4

Oligo	Sequence - before <i>E.coli</i> transformation																																										
RcdA/dU+4	5'	C	T	C	T	T	G	T	C	A	G	G	A	A	T	A	T	T	G	T	C	T	C	T	A	U	G	C	T	C	C	A	C	C	A	A	A	G	G	C	3'		
	3'	G	A	G	A	A	C	A	G	T	C	C	T	T	A	T	A	A	C	A	G	R	X	G	A	T	A	C	G	A	G	G	G	T	G	G	T	T	T	C	C	G	5'
	Sequence - after plasmid recovery from <i>E.coli</i>																																										
Sample 1	5'	C	T	C	T	T	G	T	C	A	G	G	A	A	T	A	T	T	G	T	C	T	C	T	A	T	G	C	T	C	C	A	C	C	A	A	A	G	G	C	3'		
	3'	G	A	G	A	A	C	A	G	T	C	C	T	T	A	T	A	A	C	A	G	A	G	A	T	A	C	G	A	G	G	G	T	G	G	T	T	T	C	C	G	5'	
Sample 2	5'	C	T	C	T	T	G	T	C	A	G	G	A	A	T	A	T	T	G	T	C	T	C	T	A	T	G	C	T	C	C	A	C	C	A	A	A	G	G	C	3'		
	3'	G	A	G	A	A	C	A	G	T	C	C	T	T	A	T	A	A	C	A	G	A	G	A	T	A	C	G	A	G	G	T	G	G	T	T	T	C	C	G	5'		
Sample 3	5'	C	T	C	T	T	G	T	C	A	G	G	A	A	T	A	T	T	G	T	C	T	C	T	A	T	G	C	T	C	C	A	C	C	A	A	A	G	G	C	3'		
	3'	G	A	G	A	A	C	A	G	T	C	C	T	T	A	T	A	A	C	A	G	A	G	A	T	A	C	G	A	G	G	T	G	G	T	T	T	C	C	G	5'		
Sample 4	5'	C	T	C	T	T	G	T	C	A	G	G	A	A	T	A	T	T	G	T	C	T	C	T	A	T	G	C	T	C	C	A	C	C	A	A	A	G	G	C	3'		
	3'	G	A	G	A	A	C	A	G	T	C	C	T	T	A	T	A	A	C	A	G	A	G	A	T	A	C	G	A	G	G	T	G	G	T	T	T	C	C	G	5'		
Sample 5	5'	C	T	C	T	T	G	T	C	A	G	G	A	A	T	A	T	T	G	T	C	T	C	T	A	T	G	C	T	C	C	A	C	C	A	A	A	G	G	C	3'		
	3'	G	A	G	A	A	C	A	G	T	C	C	T	T	A	T	A	A	C	A	G	A	G	A	T	A	C	G	A	G	G	T	G	G	T	T	T	C	C	G	5'		
Sample 6	5'	C	T	C	T	T	G	T	C	A	G	G	A	A	T	A	T	T	G	T	C	T	C	T	A	T	G	C	T	C	C	A	C	C	A	A	A	G	G	C	3'		
	3'	G	A	G	A	A	C	A	G	T	C	C	T	T	A	T	A	A	C	A	G	A	G	A	T	A	C	G	A	G	G	T	G	G	T	T	T	C	C	G	5'		
Sample 7	5'	C	T	C	T	T	G	T	C	A	G	G	A	A	T	A	T	T	G	T	C	T	C	T	A	T	G	C	T	C	C	A	C	C	A	A	A	G	G	C	3'		
	3'	G	A	G	A	A	C	A	G	T	C	C	T	T	A	T	A	A	C	A	G	A	G	A	T	A	C	G	A	G	G	T	G	G	T	T	T	C	C	G	5'		
Sample 8	5'	C	T	C	T	T	G	T	C	A	G	G	A	A	T	A	T	T	G	T	C	T	C	T	A	T	G	C	T	C	C	A	C	C	A	A	A	G	G	C	3'		
	3'	G	A	G	A	A	C	A	G	T	C	C	T	T	A	T	A	A	C	A	G	A	G	A	T	A	C	G	A	G	G	T	G	G	T	T	T	C	C	G	5'		
Sample 9	5'	C	T	C	T	T	G	T	C	A	G	G	A	A	T	A	T	T	G	T	C	T	C	T	A	T	G	C	T	C	C	A	C	C	A	A	A	G	G	C	3'		
	3'	G	A	G	A	A	C	A	G	T	C	C	T	T	A	T	A	A	C	A	G	A	G	A	T	A	C	G	A	G	G	T	G	G	T	T	T	C	C	G	5'		

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

**Figure S2.** The full sequence comparison of investigated oligonucleotides before *E.coli* transformation and after plasmid recovery from bacteria. **Grey color** – marks the nucleobases corresponding to the location of lesions. **Red color** – marks the mutations found within the site of damage ( $\pm 3$  bp).

## 14. Oświadczenia osoby ubiegającej się o stopień doktora



Łódź, 10.05.2023 r.

mgr inż. Karolina Boguszewska  
Zakład Bromatologii  
Wydział Farmaceutyczny  
Uniwersytet Medyczny w Łodzi

**Przewodnicząca Rady Nauk  
Farmaceutycznych/Prodziekan ds. Nauki\*  
Uniwersytetu Medycznego w Łodzi**

### **OŚWIADCZENIE AUTORA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ**

Świadomy/a odpowiedzialności prawnej oświadczam, że niniejsza rozprawa doktorska została przygotowana przeze mnie samodzielnie i nie zawiera treści uzyskanych w sposób niezgodny z obowiązującymi przepisami.

Oświadczam również, że prezentowana przeze mnie rozprawa doktorska nie była wcześniej podmiotem procedur związanych z uzyskaniem stopnia naukowego w żadnej wyższej uczelni, instytucie badawczym i/lub jednostce badawczo-rozwojowej.

*Boguszewska Karolina*  
(data i podpis Kandydata)

\* niewłaściwe skreślić

Załącznik nr 2 do zarządzenia nr 110/2021  
z dnia 28 października 2021 r.  
Rektora Uniwersytetu Medycznego w Łodzi

Łódź, 10.05.2023 r.

mgr inż. Karolina Boguszewska  
karolina.boguszewska@stud.umed.lodz.pl  
+ 48 508 075 160  
Wydział Farmaceutyczny

**Przewodnicząca Rady Nauk Farmaceutycznych  
UM w Łodzi  
prof. dr hab. Anna Kilanowicz-Sapota**

### **OŚWIADCZENIE**

Oświadczam, że zapoznałem się z postanowieniami zarządzenia nr 110/2021 z dnia 28 października 2021 r. Rektora Uniwersytetu Medycznego w Łodzi w sprawie przeprowadzania w Uniwersytecie Medycznym w Łodzi obrony rozprawy doktorskiej w Uniwersytecie Medycznym w Łodzi oraz zobowiązuję się do ich przestrzegania.

*Boguszewska Karolina*  
(data i podpis Kandydata)

Łódź, 10.05.2023 r.

mgr inż. Karolina Boguszewska  
karolina.boguszewska@stud.umed.lodz.pl  
+ 48 508 075 160  
Wydział Farmaceutyczny

**Przewodnicząca Rady Nauk Farmaceutycznych  
UM w Łodzi  
prof. dr hab. Anna Kilanowicz-Sapota**

### **OŚWIADCZENIE\***

Oświadczam, że wyrażam zgodę na nieodpłatne udostępnienie w siedzibie i na stronie internetowej Centrum Informacyjno-Bibliotecznego rozprawy doktorskiej pt.:

“Wpływ 5',8-cyko-2'-deoksyipuryn na mechanizmy naprawy uszkodzeń zespolonych DNA w ekstraktach mitochondrialnych”

w celu umożliwienia zapoznania się z jej treścią wszystkim osobom zainteresowanym, zgodnie z § 7 ust. 3 rozporządzenia Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego z dnia 19 stycznia 2018 r. w sprawie szczegółowego trybu i warunków przeprowadzania czynności w przewodzie doktorskim, w postępowaniu habilitacyjnym oraz w postępowaniu o nadanie tytułu profesora (Dz. U. z 2018 r. poz. 261) oraz zobowiązuję się do przekazania egzemplarza rozprawy doktorskiej w formie pisemnej oraz w formie elektronicznej w formacie PDF – na oznaczonej imieniem i nazwiskiem płycie CD lub DVD, w celu jej archiwizacji.

Jednocześnie oświadczam, że jestem wyłącznym twórcą ww. rozprawy doktorskiej, w rozumieniu ustawy z dnia 4 lutego 1994 r. o prawie autorskim (Dz. U. z 2020 r. poz. 288).

*Boguszewska Karolina*  
(data i podpis Kandydata)

\*oświadczenie dotyczy postępowań wszczętych przed 1 października 2019 r.

## 15. Oświadczenia współautorów

Łódź, dnia 10.05.2023 r.

**mgr inż. Karolina Boguszewska**  
Zakład Bromatologii  
Wydział Farmaceutyczny  
Uniwersytet Medyczny w Łodzi

### OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że mój udział w poniższych pracach przedstawia się następująco:

W publikacji **Boguszewska K.**, Szewczuk M., Kaźmierczak-Barańska J., Karwowski B.T., *The Similarities Between Human and Bacteria in the Context of Structure, Genome and Base Excision Repair*, *Molecules*, 2020, 25 (12), 2857, 1-30, doi: 10.3390/molecules25122857

mój udział polegał na współtworzeniu koncepcji i przygotowaniu pierwszej wersji manuskryptu, współautorstwie manuskryptu, korekcie językowej końcowej wersji manuskryptu oraz współprzygotowaniu odpowiedzi dla recenzentów. Mój udział szacuję na 70%.

W publikacji **Boguszewska K.**, Kaźmierczak-Barańska J., Karwowski B.T., *The Influence of 5',8-Cyclo-2'-deoxypurines on the Mitochondrial Repair of Clustered DNA Damage in Xrs5 Cells: The Preliminary Study*, *Molecules*, 2021, 26 (22), 7042, 10.3390/molecules26227042

mój udział polegał na współtworzeniu planu pracy, koordynowaniu procesu przygotowania i pomiarze stężenia białek ekstraktu mitochondrialnego linii xrs5, analizie stabilności oligonukleotydów matrycowych pod wpływem wybranych enzymów i ekstraktu komórkowego, przygotowaniu oligonukleotydów do badań systemów naprawczych z wykorzystaniem eukariotycznych ekstraktów komórkowych (znakowanie jednoniciowych oligonukleotydów na 5'-końcu izotopem <sup>32</sup>P, hybrydyzacja <sup>32</sup>P-oligonukleotydów, przygotowanie dwuniciowych oligonukleotydów zawierających miejsce apurynowe/apirimidynowe, analiza i weryfikacja poprawności przebiegu każdego etapu), analizie aktywności enzymatycznej białek odpowiedzialnych za poszczególne etapy naprawy uszkodzeń zespolonych DNA zawierających 5',8-cyklo-2'-deoksypuryny w ekstrakcie mitochondrialnym linii xrs5, walidacji metodyki badawczej, analizie i interpretacji otrzymanych wyników, przygotowaniu pierwszej wersji manuskryptu, współautorstwie manuskryptu, korekcie językowej końcowej wersji manuskryptu oraz współprzygotowaniu odpowiedzi dla recenzentów. Mój udział szacuję na 50%.

W publikacji **Boguszewska K.**, Karwowski B.T., Kaźmierczak-Barańska J., *The Usefulness of Autoradiography for DNA Repair Proteins Activity Detection in the Cytoplasm towards Radiolabeled Oligonucleotides Containing 5',8-Cyclo-2'-deoxyadenosine*, *Chemosensors*, 2022, 10 (6), 204, doi: 10.3390/chemosensors10060204

mój udział polegał na współtworzeniu planu pracy, koordynowaniu procesu przygotowania i pomiarze stężenia białek ekstraktów cytoplazmatycznych linii xrs5, BJ i XPC, analizie stabilności oligonukleotydów matrycowych pod wpływem wybranych enzymów i ekstraktu komórkowego, przygotowaniu oligonukleotydów do badań systemów naprawczych z wykorzystaniem eukariotycznych ekstraktów komórkowych (znakowanie

jednoniciowych oligonukleotydów na 5'-końcu izotopem  $^{32}\text{P}$ , hybrydyzacja  $^{32}\text{P}$ -oligonukleotydów, przygotowanie dwuniciowych oligonukleotydów zawierających miejsce apurynowe/apirymidynowe, analiza i weryfikacja poprawności przebiegu każdego etapu), analizie aktywności enzymatycznej białek odpowiedzialnych za poszczególne etapy naprawy uszkodzeń zespolonych DNA zawierających 5',8-cyklo-2'-deoksy puryny w ekstraktach cytoplazmatycznych, analizie i interpretacji otrzymanych wyników, przygotowaniu pierwszej wersji manuskryptu, współautorstwie manuskryptu, korekcie językowej końcowej wersji manuskryptu oraz współprzygotowaniu odpowiedzi dla recenzentów. Mój udział szacuję na 60%.

W publikacji **Boguszewska K.**, Kaźmierczak-Barańska J., Karwowski B.T., *Mutagenicity of a bi-stranded clustered DNA lesion containing (5'S) or (5'R) 5',8-cyclo-2'-deoxyAdenosine in Escherichia coli model*, Acta Biochimica Polonica, 2022, 69 (4), 865-869, doi: 10.18388/abp.2020\_6382

mój udział polegał na współtworzeniu planu pracy, przygotowaniu dwuniciowych oligonukleotydów do badań systemów naprawczych z wykorzystaniem komórek bakteryjnych *E.coli*, przygotowaniu plazmidu zawierającego uszkodzenia zespolone zawierające 5',8-cyklo-2'-deoksyadenozynę, przeprowadzeniu transformacji bakterii *E.coli* i selekcji transformantów, izolacji DNA plazmidowego z wyselekcjonowanych kolonii transformantów, koordynowaniu procesu sekwencjonowania pozyskanego DNA plazmidowego, analizie mutagenności badanych uszkodzeń zespolonych zawierających 5',8-cyklo-2'-deoksyadenozynę, walidacji metodyki badawczej, opracowaniu, analizie i interpretacji otrzymanych wyników, przygotowaniu pierwszej wersji manuskryptu, współautorstwie manuskryptu, korekcie językowej końcowej wersji manuskryptu oraz współprzygotowaniu odpowiedzi dla recenzentów. Mój udział szacuję na 70%.

*Boguszewska Kereniwa*  
(podpis)

Katedra Bromatologii  
Wydział Farmaceutyczny  
Uniwersytet Medyczny w Łodzi

### Oświadczenie

Oświadczam, iż w pracach:

**Publikacja I** Boguszewska K., Szewczuk M., Kaźmierczak-Barańska J., Karwowski B.T., *The Similarities Between Human and Bacteria in the Context of Structure, Genome and Base Excision Repair* [w:] *Molecules*, 2020, 25 (12), 2857, 1-30, doi: 10.3390/molecules25122857,

**Publikacja II** Boguszewska K., Karwowski B.T., Kaźmierczak-Barańska J., *The Usefulness of Autoradiography for DNA Repair Proteins Activity Detection in the Cytoplasm towards Radiolabeled Oligonucleotides Containing 5',8-Cyclo-2'-deoxyadenosine* [w:] *Chemosensors*, 2022, 10 (6), 204, doi: 10.3390/chemosensors10060204,

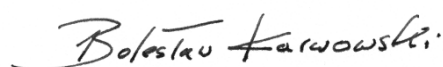
**Publikacja III** Boguszewska K., Kaźmierczak-Barańska J., Karwowski B.T., *The Influence of 5',8-Cyclo-2'-deoxypurines on the Mitochondrial Repair of Clustered DNA Damage in Xrs5 Cells: The Preliminary Study* [w:] *Molecules*, 2021, 26 (22), 7042, 10.3390/molecules26227042,

**Publikacja IV** Boguszewska K., Kaźmierczak-Barańska J., Karwowski B.T., *Mutagenicity of a bi-stranded clustered DNA lesion containing (5'S) or (5'R) 5',8-cyclo-2'-deoxyAdenosine in Escherichia coli model* [w:] *Acta Biochimica Polonica*, 2022, 69 (4), 865-869, doi: 10.18388/abp.2020\_6382,

mój udział polegał na nadzorze nad prawidłowością prowadzonych badań eksperymentalnych oraz interpretacją wyników w ramach realizacji utworzonej przeze mnie koncepcji badań oraz syntezy odpowiednich amidofosforynowych analogów 5',8-cyklo-2'-deoksypuryn. W ramach mojej opieki nad prowadzonymi przez Panią magister Karolinę Boguszeuską pracami współudział mój polegał na konsultacjach merytorycznych oraz finalnej korekcie merytorycznej artykułów naukowych.

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie w/w prac przez Panią magister Karolinę Boguszeuską jako części rozprawy doktorskiej w formie spójnego merytorycznie cyklu opublikowanych artykułów naukowych.

Oświadczam, że samodzielna i możliwa do wyodrębnienia część prac wskazuje na indywidualny wkład Pani mgr Karoliny Boguszeuskiej w opracowanie koncepcji i wykonanie części eksperymentalnej, opracowanie i interpretację wyników w w/w pracy.



Prof. dr hab. n. farm. Bolesław Karwowski

Łódź, dnia 18.05.2023 r.

**dr n. chem. Julia Kaźmierczak-Barańska**  
Zakład Bromatologii  
Wydział Farmaceutyczny  
Uniwersytet Medyczny w Łodzi

## OŚWIADCZENIE

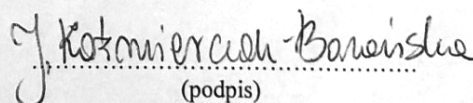
Oświadczam, iż w pracach:

1. Boguszewska K., Szewczuk M., **Kaźmierczak-Barańska J.**, Karwowski B.T., *The Similarities Between Human and Bacteria in the Context of Structure, Genome and Base Excision Repair*, *Molecules*, 2020, 25 (12), 2857, 1-30, doi: 10.3390/molecules25122857,
2. Boguszewska K., **Kaźmierczak-Barańska J.**, Karwowski B.T., *The Influence of 5',8-Cyclo-2'-deoxypurines on the Mitochondrial Repair of Clustered DNA Damage in Xrs5 Cells: The Preliminary Study*, *Molecules*, 2021, 26 (22), 7042, 10.3390/molecules26227042,
3. Boguszewska K., Karwowski B.T., **Kaźmierczak-Barańska J.**, *The Usefulness of Autoradiography for DNA Repair Proteins Activity Detection in the Cytoplasm towards Radiolabeled Oligonucleotides Containing 5',8-Cyclo-2'-deoxyadenosine*, *Chemosensors*, 2022, 10 (6), 204, doi: 10.3390/chemosensors10060204,
4. Boguszewska K., **Kaźmierczak-Barańska J.**, Karwowski B.T., *Mutagenicity of a bi-stranded clustered DNA lesion containing (5'S) or (5'R) 5',8-cyclo-2'-deoxyAdenosine in Escherichia coli model*, *Acta Biochimica Polonica*, 2022, 69 (4), 865-869, doi: 10.18388/abp.2020\_6382,

mój udział polegał na konsultacji metodyki oraz nadzorze nad poprawnością prowadzonych eksperymentów z wykorzystaniem ekstraktów komórkowych linii xsr5, BJ i XPC; na prowadzeniu hodowli komórek eukariotycznych linii xsr5, BJ i XPC i otrzymaniu aktywnych ekstraktów komórkowych wykorzystanych do dalszych etapów badań; na współautorstwie i korekcie końcowej wersji manuskryptu oraz wsparciu w rozwiązywaniu problemów naukowo-badawczych podniesionych przez recenzentów.

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie ww. pracy przez mgr inż. Karolinę Boguszewską jako część rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów opublikowanych w czasopiśmie naukowych.

Oświadczam, że samodzielna i możliwa do wyodrębnienia część prac wskazuje na indywidualny wkład mgr inż. Karoliny Boguszewskiej w wykonanie części eksperymentalnej i interpretację wyników ww. pracy.

  
(podpis)



Łódź, dnia 10.05.2023 r.

**mgr inż. Michał Szewczuk**  
Zakład Bromatologii  
Wydział Farmaceutyczny  
Uniwersytet Medyczny w Łodzi

### OŚWIADCZENIE

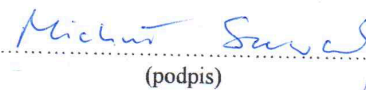
Oświadczam, iż w pracy:

1. Boguszewska K., **Szewczuk M.**, Kaźmierczak-Barańska J., Karwowski B.T., *The Similarities Between Human and Bacteria in the Context of Structure, Genome and Base Excision Repair*, *Molecules*, 2020, 25 (12), 2857, 1-30, doi: 10.3390/molecules25122857,

mój udział polegał na współautorstwie i korekcie końcowej wersji manuskryptu.

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie ww. pracy przez mgr inż. Karolinę Boguszewską jako część rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów opublikowanych w czasopismach naukowych.

Oświadczam, że samodzielna i możliwa do wyodrębnienia część prac wskazuje na indywidualny wkład mgr inż. Karoliny Boguszewskiej w przygotowanie ww. pracy.

  
(podpis)

## 16. Wykształcenie i całkowity dorobek naukowy osoby ubiegającej się o stopień doktora

### Wykształcenie

- 2020 – 2021 **Politechnika Warszawska**, Wydział Elektroniki i Technik Informacyjnych,  
Instytut Automatyki i Informatyki Stosowanej  
Studia podyplomowe  
Zarządzanie projektami: metodyki, praktyka, techniki, narzędzia
- 2018 – 2023 **Uniwersytet Medyczny w Łodzi**, Wydział Farmaceutyczny  
Studia doktoranckie  
Pracownia Uszkodzeń Kwasów Nukleinowych, Zakład Bromatologii  
Promotor: prof. dr hab. Bolesław T. Karwowski  
Realizacja pracy doktorskiej:  
„Wpływ 5',8-cyklo-2'-deoksypuryn na mechanizmy naprawy uszkodzeń zespoleń DNA w ekstraktach mitochondrialnych”
- 2016 – 2018 **Uniwersytet Medyczny w Łodzi**, Wydział Farmaceutyczny  
Studia doktoranckie  
Zakład Farmacji Aptecznej  
Opiekun: dr hab. Katarzyna Błaszczak-Świątkiewicz  
Realizacja projektu badawczego:  
„Badanie molekularnych mechanizmów działania związków chemicznych w kontekście nowoczesnej terapii przeciwnowotworowej”
- 2013 – 2015 **Politechnika Łódzka**, Wydział Biotechnologii i Nauk o Żywności  
Tytuł magistra Biotechnologii  
Specjalizacja: Biotechnologia Molekularna i Biochemia Techniczna  
Opiekun: dr hab. Edyta Gendaszewska-Darmach  
Promotor: prof. dr hab. Maria Koziółkiewicz  
Realizacja pracy dyplomowej:  
„Wpływ tiofosforanowych analogów nukleotydów na wydzielanie kolagenu przez szczurze fibroblasty skóry”
- 2011 – 2014 **Politechnika Łódzka**, Wydział Biotechnologii i Nauk o Żywności  
Tytuł inżyniera Biotechnologii  
Specjalizacja: Biotechnologia Molekularna i Biochemia Techniczna  
Opiekun: dr hab. Edyta Gendaszewska-Darmach

Promotor: prof. dr hab. Maria Koziółkiewicz

Realizacja pracy dyplomowej:

„Wpływ tiofosforanowych analogów nukleotydów na przeżywalność szczurzych fibroblastów skóry”

2008 – 2013 **Politechnika Łódzka**, Wydział Biotechnologii i Nauk o Żywności

Tytuł inżyniera Technologii Żywności i Żywienia Człowieka

Specjalizacja: Chemia Żywności i Surowców Kosmetycznych

Promotor: dr hab. inż. Joanna Leszczyńska

Realizacja pracy dyplomowej:

„Nowe tendencje rozwoju metod immunometrycznych”

### ***Działalność dydaktyczna***

2018 – 2022 Prowadzenie zajęć dydaktycznych z przedmiotów Dietetyka, Bromatologia, Higiena i Epidemiologia, Podstawy żywienia człowieka

2022 Pełnienie roli opiekuna 1 pracy magisterskiej

2019 – 2022 Opieka nad członkami Koła Naukowego przy Zakładzie Bromatologii

### ***Nagrody i stypendia za działalność naukową***

2021 Zespołowa Nagroda Naukowa Rektora Uniwersytetu Medycznego w Łodzi za publikację „Effects of 5',8'-Cyclo-2'-Deoxypurines on the Base Excision Repair of Clustered DNA Lesions in Nuclear Extracts of the XPC Cell Line", IF<sub>2021</sub>=6,6

2018 – 2022 Stypendium Rektora Uniwersytetu Medycznego w Łodzi dla najlepszych doktorantów za osiągnięcia naukowe

### ***Lista publikacji***

#### **Prace oryginalne**

1. 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*  
[w:] Cells, 2021, 10 (4), 725, 1-18, **IF<sub>2021</sub>=4,366, MEiN<sub>2021</sub>=140 pkt**;
2. Szewczuk M., Boguszewska K., Kaźmierczak-Barańska J., Karwowski B.T.,  
*The Influence of 5'S and 5'R cdA and cdG on the Activity of BsmAI and SspI Restriction Enzymes*  
[w:] Molecules, 2021, 26 (12), 3750, **IF<sub>2021</sub>=3,267, MEiN<sub>2021</sub>=100 pkt**;
3. 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?*

[w:] *Molecules*, 2021, 26 (17), 5177, **IF<sub>2021</sub>=4,411, MEiN<sub>2021</sub>=100 pkt;**

4. 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*

[w:] *Cells*, 2021, 10 (11), 3254, **IF<sub>2021</sub>=6,6, MEiN<sub>2021</sub>=140 pkt;**

5. Boguszewska K., Kaźmierczak-Barańska J., Karwowski B.T.,

*The Influence of 5',8-Cyclo-2'-deoxypurines on the Mitochondrial Repair of Clustered DNA Damage in Xrs5 Cells: The Preliminary Study*

[w:] *Molecules*, 2021, 26 (22), 7042, **IF<sub>2021</sub>=4,411, MEiN<sub>2021</sub>=100 pkt;**

6. Boguszewska K., Karwowski B.T., Kaźmierczak-Barańska J.,

*The Usefulness of Autoradiography for DNA Repair Proteins Activity Detection in the Cytoplasm towards Radiolabeled Oligonucleotides Containing 5',8-Cyclo-2'-deoxyadenosine*

[w:] *Chemosensors*, 2022, 10 (6), 204, **IF<sub>2022</sub>=4,229, MEiN<sub>2022</sub>=20 pkt;**

7. Boguszewska K., Kaźmierczak-Barańska J., Karwowski B.T.,

*Mutagenicity of a bi-stranded clustered DNA lesion containing (5'S) or (5'R) 5',8-cyclo-2'-deoxyAdenosine in Escherichia coli model*

[w:] *Acta Biochimica Polonica*, 2022, 69 (4), 865-869, **IF<sub>2022</sub>=2,149, MEiN<sub>2022</sub>=70 pkt.**

### **Prace przeglądowe**

1. Boguszewska K., Szewczuk M.,

*Nowe trendy rozwoju metod immunometrycznych w kontekście badań nad uszkodzeniami DNA*

[w:] Ejdys S., Staszak P. (red), *Nauka i wiedza kluczem do poznania świata cz. 3*, ISBN: 978-83-953049-3-4, Waleńców, 2019, 79-99, **MNiSW<sub>2019</sub>=5 pkt;**

2. Boguszewska K., Szewczuk M., Urbaniak S., Karwowski B.T.,

*Review: immunoassays in DNA damage and instability detection*

[w:] *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2019, 76 (23), 4689-4704, **IF<sub>2019</sub>=7,014, MNiSW<sub>2019</sub>=140 pkt;**

3. Szewczuk M., Boguszewska K.,

*Wpływ AMPK na naprawę uszkodzeń DNA*

[w:] Ejdys S., Staszak P. (red), *Nauka i wiedza kluczem do poznania świata cz. 3*, ISBN: 978-83-953049-3-4, Waleńców, 2019, 100-118, **MNiSW<sub>2019</sub>=5 pkt;**

4. Boguszewska K., Szewczuk M., Karwowski B.T.,

*Naprawa uszkodzeń DNA w mitochondriach – system BER*

- [w:] Maciąg K., Danielewska A. (red), Wybrane zagadnienia z zakresu nauk biologicznych i weterynaryjnych, ISBN: 978-83-65932-95-2, Lublin, 2019, Wydawnictwo Naukowe TYGIEL, 7-18, **MNiSW<sub>2019</sub>=5 pkt;**
5. Szewczuk M., Boguszewska K., Karwowski B.T.,  
*Rola OGG1 w przebiegu procesu naprawy DNA przez system BER*  
[w:] Maciąg K., Danielewska A. (red), Wybrane zagadnienia z zakresu nauk biologicznych i weterynaryjnych, ISBN: 978-83-65932-95-2, Lublin, 2019, Wydawnictwo Naukowe TYGIEL, 19-27, **MNiSW<sub>2019</sub>=5 pkt;**
  6. Urbaniak S., Boguszewska K., Szewczuk M., Kaźmierczak-Barańska J., Karwowski B.T.,  
*8-Oxo-7,8-Dihydro-2'-Deoxyguanosine (8-oxodG) and 8-Hydroxy-2'-Deoxyguanosine (8-OHdG) as a Potential Biomarker for Gestational Diabetes Mellitus (GDM) Development*  
[w:] *Molecules*, 2020, 25 (1), 1-13, **IF<sub>2020</sub>=3,060, MNiSW<sub>2019</sub>=100 pkt;**
  7. Kaźmierczak-Barańska J., Boguszewska K., Adamus-Grabicka A., Karwowski B.T.,  
*Two faces of vitamin C – Antioxidative and Pro-oxidative Agent*  
[w:] *Nutrients*, 2020, 12 (5), 1501, 1-19, **IF<sub>2020</sub>=4,171, MNiSW<sub>2019</sub>=140 pkt;**
  8. Boguszewska K., Szewczuk M., Kaźmierczak-Barańska J., Karwowski B.T.,  
*The Similarities Between Human and Bacteria in the Context of Structure, Genome and Base Excision Repair*  
[w:] *Molecules*, 2020, 25 (12), 2857, 1-30, **IF<sub>2020</sub>=3,060, MNiSW<sub>2019</sub>=100 pkt;**
  9. Szewczuk M., Urbaniak S., Boguszewska K., Karwowski B.T.,  
*The role of AMPK in metabolism and its influence on DNA damage repair*  
[w:] *Molecular Biology Reports*, 2020, 1-12, **IF<sub>2020</sub>=2,107, MNiSW<sub>2019</sub>=70 pkt;**
  10. Halczuk K., Boguszewska K., Urbaniak S., 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?*  
[w:] *Yale Journal of Biology and Medicine*, 2020, 93 (4), 501-515, **IF<sub>2020</sub>=3,549, MNiSW<sub>2019</sub>=70 pkt;**
  11. Kaźmierczak-Barańska J., Boguszewska K., Karwowski B.T.,  
*Nutrition Can Help DNA Repair in the Case of Aging*  
[w:] *Nutrients*, 2020, 12 (11), 3828, 1-20, **IF<sub>2020</sub>=4,171, MNiSW<sub>2019</sub>=140 pkt.**

Sumaryczny współczynnik **Impact Factor** według listy JCR zgodnie z rokiem opublikowania wynosi **56,565**, łączna punktacja **MEiN/MNiSW** wynosi **1450**.

### *Komunikaty zjazdowe*

- 2020 I Interdyscyplinarna Konferencja Doktorantów Uniwersytetu Medycznego w Łodzi  
„Doc UMED” (Łódź, Polska)  
Boguszevska K., Bolesław T. Karwowski  
Poster: „Jak blisko nam do bakterii? Mitochondria i bakterie w kontekście podobieństw ich struktury, genomu i systemu naprawczego BER”
- 2019 III Studenckiej Konferencji Biologii Medycznej (Warszawa, Polska)  
Boguszevska K., Szewczuk M., Bolesław T. Karwowski  
Poster: „BER w akcji – naprawa uszkodzeń zespolonych w mitochondrialnym DNA”
- 2019 III Konferencja Naukowo-Szkoleniowa Studentów Wydziału Farmaceutycznego Uniwersytetu medycznego w Łodzi (Łódź, Polska)  
Boguszevska K., Bolesław T. Karwowski  
Poster: „Powierzchniowy rezonans plazmowy - zastosowanie w wykrywaniu uszkodzeń DNA”,
- 2019 XI Interdyscyplinarna Konferencja Naukowa TYGIEL (Lublin, Polska)  
Szewczuk M., Boguszevska K., Bolesław T. Karwowski  
Poster: „Wpływ kinazy AMPK na mechanizmy naprawcze DNA”

