UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

INSTITUTO DE QUÍMICA

Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Bioquímica)

MATEUS PRATES MORI

NOVO PAPEL DA PROTEÍNA XPC NA REGULAÇÃO DOS COMPLEXOS DA CADEIA DE TRANSPORTE DE ELÉTRONS E DESEQUILÍBRIO REDOX

Versão corrigida

SÃO PAULO

Data de depósito da SPG

02/03/2015

MATEUS PRATES MORI

NOVO PAPEL DA PROTEÍNA XPC NA REGULAÇÃO DOS COMPLEXOS DA CADEIA DE TRANSPORTE DE ELÉTRONS E DESEQUILÍBRIO REDOX

Tese de Doutorado apresentado ao Instituto de Química da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas (Bioquímica).

Orientadora: Profa. Dra Nadja Cristhina de Souza-Pinto

SÃO PAULO

2015

Ficha Catalográfica
Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

Mori, Mateus Prates
M854n Novo papel da o proteína XPC na regulação dos complexos da cadeia de transporte de elétrons e desequilíbrio redox / Mateus Prates Mori -- São Paulo, 2015.
173p.

Tese (doutorado) - Instituto de Química da Universidade de São Paulo. Departamento de Bioquímica
Orientador: Souza-Pinto, Nadja Cristhina de

1. DNA : Reparo 2. DNA : Mitoncondria I. T. II. Souza-Pinto, Nadja Cristhina de, orientador.

574.873282 CDD

MORI, Mateus Prates. Novo papel da proteína XPC na regulação dos complexos da cadeia de transporte de elétrons e desequilíbrio redox

Tese de Doutorado apresentado ao Instituto de Química da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas (Bioquímica).

Aprovado em: ___/___/_____

Banca Examinadora

Prof. Dr _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Ao corpo de Cristo que se reúne na Igreja Presbiteriana de Pinheiros, pelo consolo, pelo incentivo, pelas críticas, pela realidade, pela verdade e pelas orações. Esse trabalho é de todos vocês, em Cristo Jesus, nosso Senhor.

SOLI DEO GLORIA!

AGRADECIMENTOS

Desistir é sempre uma opção. Durante esses 6 anos de doutorado essa foi uma realidade quase diária. Olhar pela janela e enxergar a total falta de propósito desse mundo talvez seja a maior realidade. Porém, na mesma janela, olhar para o céu e ser tomado pelo infinito talvez seja a maior necessidade. Escolhi a loucura da necessidade divina à sabedoria da realidade materialista. E não há um dia sequer que louvo a Deus pela loucura da perseverança.

Ao Único e Verdadeiro Deus imanente, mas transcendente, justo juiz, mas advogado e réu vicário, soberano Senhor, mas pessoal Salvador, divino, porém humano. Rendo-te graças por não desistir de mim, apesar de mim.

Ao meu irmão adotivo Rafael Gama pela surreal unidade na diversidade. Amigo mais chegado que irmão, sempre levarei na memória momentos inesquecíveis como o conto do repolho no hambúrguer, a fábula da batata assada no aeroporto e a peregrinação a Ibiúna. Muito obrigado por esses 3 anos de amizade, muitas vezes regada a lágrimas e conflitos, e muitas outras vezes de papos intermináveis e risadas. Você é o irmão que pedi quando tinha 6 anos.

Aos meus pais, dona Helen e seu Renato, *aka mom and dad*, pelo sustento emocional e por não me julgarem em minhas fraquezas. Espero um dia poder compreender o amor que vocês sentem por mim.

Às minhas, agora, duplamente irmãs de sangue e de espírito. À Carol pelo exemplo de vigor na fé mesmo contra as circunstâncias. À Rê e ao Evandro pelo exemplo da simplicidade da vida.

Aos membros e ex-membros da república Mixtério do Retété. Ao Roberto pela objetividade, ao Abraão pela sinceridade e ao Jônatas pela tranquilidade. Ao Adaílson pelas discussões filosóficas e teológicas, e por ter nos agraciado com o nome da república. Ao Pedrão pelos duetos de violão e sanfona, e por nos introduzir ao universo vegano vivido sem extremismo. Ao Ênio pelo resgate do verdadeiro espírito sertanejo e por compartilhar o sofrimento no que diz respeito ao sexo oposto. Ao Saulo pela erudição e pelos alertas políticos algumas vezes necessários.

À minha segunda família, os membros da União de Mocidade Presbiteriana de Pinheiros: Paty, Carliane e Thomas Barker, Raquel e Júlio Britto, Rafa e Diogo Dourado, Rafa e Diego Rodrigues, Dani e Leo Campanha, Cecília e Eduardo Teruiya, Casimiro, Túllio, Bob, Rita, Caroll, Taty, Manoela, Jemima, Gislaine, Dal, Andressa, Paolla, Isabelle, Matias, Ângela, Bruna, Natiely, Tinho, Lucas, Vitor, Naty, Ale, JJ, Flávio, Bueno, Daniel, Caru, Michelle Heller, Carioca, Fernando, Rodrigo Rosolen, Chun, João Pedro, Émerson, Cris, Gabi, Rafa Galvão, Raquel e Ruth Madruga, Débora, Diógenes, Marcelo, Neuso, Filiphe, Jéssica, Aline, Marquinhos, Rô, Rodrigo Scavassin, Carol, Vinícius, Leo Branco, Danilo, Sueli e se esqueci de mais alguém, me desculpem. A todos vocês, muitíssimo obrigado pela comunhão.

À minha orientadora, a Profa. Dra Nadja Cristhina de Souza-Pinto por ter aberto as portas de seu laboratório bem no comecinho de 2009. Levarei sempre comigo a procura em manter o foco e a paciência nas repetições experimentais. Agradeço pela contínua tolerância nos meus frequentes esquecimentos e por sempre tentar me ajudar com a minha personalidade desligada. Acima de tudo, agradeço pelo exemplo de excelência na divulgação e na promoção das Ciências para as futuras gerações. Torço por você e pelo Michaelzinho.

À Rute A. P. Costa por ter dividido o tema e a fé comigo. Agradeço pela compreensão nos momentos de crise, como a descoberta de uma linhagem celular alienígena, pelos puxões de orelha em momento oportuno, mas, acima de tudo, pela gentileza e humildade em Cristo.

Aos membros e ex-membros do Laboratório de Genética Mitocondrial por esses extensos e intensos anos de convivência. À Carol Romagna pela recepção, inclusão, amizade e paranoia nos experimentos com azul de metileno. Ao Paulo Tonolli pelas corridas, choradeiras com os sabores e dessabores amorosos e pela camaradagem dentro e fora do laboratório. À Dani Soltys pela leveza, pelo raciocínio crítico e por "viver e não ter vergonha de ser feliz". À Carolzinha Parga, ao Gustavo e ao Felipe Godoy pelo ambiente constante de festa. À Valquíria e ao Felipe Ravagnani pela excelência e pelo profissionalismo. À Andressa Costa, à Adriana Wenzel, à Marlene Fortunato e à Juliana Raveli por fazerem as coisas funcionarem e estarem sempre atentas aos mínimos detalhes. Aos ICs Gabi, Marquinho, Dani, Renata e Mariana; e a nova leva de pós-graduandos Carol Berra, Aline Paiva, Thiago, Caio, e Pedro. Que o LGM cresça e avance sempre com paciência.

À Profa. Profa. Dra Alicia Kowaltowski pelo exemplo constante na busca em atender o interesse dos pós-graduandos, pela excelência na organização e gestão laboratorial, e pela parceria em projetos que financiam o nosso laboratório.

Aos membros do Laboratório de Metabolismo Energético por dividir e abrilhantar as Ciências. Ao Bruno Chaussè (vulgo Chaussô) pelo exemplo de hombridade, por ter me encaminhado a Igreja Presbiteriana de Pinheiros e por me aturar nas chatices. Ao Erich Tahara pelas corridas e altos papos teológicos. Ao Bruno Queliconi e ao Ariel Cardoso pela camaradagem, pelas discussões científicas de alto nível e pela genialidade. À Fernanda e à Camille por me darem uma chance e confiarem em mim contra as evidências. À Nanda por me ajudar no desenho experimental das qPCR e pela doçura de caráter. Aos demais membros e ex-membros Nicole, Felipe, Wilson, Marcel, Pamela, Fabiana, João Victor, Graciele, Talita, Luis e Ignácio; me perdoem se, por ventura, atrapalhei algum experimento de vocês.

À Profa. Dra Lisiane Meira pela colaboração, pela recepção calorosa na University of Surrey e pela compreensão em um momento muito difícil da minha vida. À Dra Izabel pelo auxílio nos experimentos com células *Aag null* e pelos coffee-break no Starbucks.

Aos membros do laboratório do Prof. Dr Carlos Frederico Menck pela colaboração, apoio, doação de linhagens celulares e de camundongos. Em especial, à Carol Quayle pela prontidão em doar e viabilizar a doação dos camundongos *Xpc*. À Letícia Lerner e a Clarissa

Ribeiro por estarem sempre dispostas a doar uma linhagem caso houvesse necessidade. Ao Prof. Dr Carlos Frederico Menck que, sem saber, me motivou a trabalhar com reparo de DNA em uma palestra no 52 º Congresso Brasileiro de Genética em 2006.

Aos membros do laboratório da Profa. Dra Bettina Malnic, em especial, à Maíra Nagai e ao Artur Guazzelli Silva por me ajudarem na tentativa de sequenciar a região promotora de *PPARGC1A* e por disponibilizarem a incubadora *shaker* para cultura de bactérias.

Aos membros do laboratório dos professores Dr Ricardo Giordano, Dra Maria Júlia Manso Alves e Dra Déborah Schechtman por disponibilizarem o termociclador para qPCR.

Aos membros do laboratório da Profa. Dra Glaucia Mendes Souza por disponibilizarem o transluminador para as análises de ECID e XL-PCR.

Ao Prof. Dr Eduardo Reis pelas dicas de controle positivo no experimento de desmetilação de DNA através do tratamento com 5-aza-dC.

À Profa. Dra Flávia Meotti pela crítica ao uso de DPI como inibidor de NADPH oxidase.

À Rowena Gee, ao Terry Seares, à Lamide "Vyk" Akinlabi, ao Charlie Kang e ao Nyerhovwo Ifie por me fazerem sentir incluídos a mais de 9.000 km de casa.

Aos colegas de pós-graduação do IQ/USP. Em especial, à Luiza Grecco e Marques pela proatividade em prol do verdadeiro movimento estudantil e pelo humor irônico. À Caterina pelos intervalos de café, pelas corridas, pelos encontros e desencontros. Ao José Pedro Angeli por ter me aliciado a fazer pós-graduação no Departamento de Bioquímica do IQ.

À Jemima Alves por ter se oferecido para as revisões da gramática e das referências dessa tese, além da amizade, das conversas de análises textuais e por me ensinar a ter personalidade.

À família Mori aqui em São Paulo pelo acolhimento. À minha tia Inês Takiko que me acolheu por 2 anos em sua casa, pelo carinho, preocupação e cuidado. Ao meu primo Maurício Higashino e sua esposa Fernanda por sempre me convidarem para espairecer a cabeça. À tia Lúcia e ao tio Jorge por acolherem meus pais sempre que eles vinham me visitar.

Aos funcionários da secretaria de pós-graduação e do departamento de Bioquímica. Ao Milton pela objetividade, tranquilidade e prontidão no atendimento. Ao Paulo Monteiro pelas corridas de 10 K.

Ao CNPq, à CAPES e ao Banco Santander pelas bolsas de estudos de mestrado, doutorado e de responsabilidade social. À FAPESP e ao INCT em Processos Redox em Biomedicina pelo apoio financeiro sem o qual essa tese jamais poderia ser desenvolvida.

Aos membros da banca examinadora pela disposição na análise dessa tese. Muito obrigado!

Ἐν ἀρχῇ ἦν ὁ Λόγος, καὶ ὁ Λόγος ἦν πρὸς τὸν Θεόν, καὶ Θεὸς ἦν ὁ Λόγος.

Evangelho de Jesus Cristo segundo o relato do apóstolo João (90 a 100 d.C)

in principio erat Verbum et Verbum erat apud Deum et Deus erat Verbum.

Biblia Sacra Vulgata. Tradução para o latim de Jerônimo (405 d.C)

בראשית היה הדבר והדבר היה את האלהים
ואלהים היה הדבר:

Bíblia Hebraica. Tradução para o hebraico

في بدء الكلمة كان والكلمة كان عند الله
وكان الكلمة الله .

Tradução para o árabe de Smith & Van Dyke

In the beginning was the Word, and the Word was with God, and the Word was God.

Biblia King James. Tradução para o inglês (1611)

En el principio existía el Verbo, y el Verbo estaba con Dios, y el Verbo era Dios.

La Biblia de las Americas. Tradução para o espanhol (1986)

No princípio era o Verbo (Logos), e o Verbo estava com Deus, e o Verbo era Deus.

Bíblia Sagrada. Tradução para o português de João Ferreira de Almeida revista e atualizada

RESUMO

MORI, M. P. **Novo papel da proteína XPC na regulação dos complexos da cadeia de transporte de elétrons e desequilíbrio redox**. 2015. 173 f. Tese (Doutorado) – Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

Espécies reativas de oxigênio (EROs) são normalmente e continuamente geradas em mitocôndrias, majoritariamente na cadeia de transporte de elétrons (CTE). Harman (1956, 1972 e 1992) teorizou que os radicais livres gerados nas mitocôndrias seriam a principal causa do envelhecimento. De fato, durante o envelhecimento é observado um desequilíbrio entre formação e remoção de EROs, que resulta em estresse redox. Essa condição favorece a formação de lesões oxidadas no DNA, acarretando em mutagênese ou morte celular. Diversos mecanismos moleculares cooperam para o reparo de DNA. Duas vias de reparo de DNA lidam com a maioria das lesões: o reparo por excisão de base (BER) e o reparo por excisão de nucleotídeos (NER). A via BER corrige pequenas modificações de bases que surgem de reações de desaminação, alquilação e oxidação. A via NER é mais versátil, reconhecendo lesões que distorcem a dupla hélice de DNA, como danos induzidos por luz UV e adutos volumos. Pacientes xeroderma pigmentoso (XP-A a XP-G) herdam mutações em um de sete genes que codificam proteínas envolvidas na via NER, ou em um gene que codifica uma polimerase translesão (XP-V). A doença é caracterizada por fotosensibilidade e incidência elevada de neoplasias cutâneas. A proteína XPC atua na etapa de reconhecimento da lesão de DNA na subvia de reparo global do genoma (GG-NER), e sua mutação dá origem aos sintomas clássicos de XP. Novas funções de XPC foram recentemente descritas: i) atuando como cofator na via BER auxiliando as DNA glicosilases OGG1, TDG e SMUG; ii) atuando como cofator transcricional de elementos responsivos a Oct4/Sox2, RXR e PPARα; e iii) na adaptação metabólica na transformação de queratinócitos. Então, propusemo-nos a investigar as relações entre XPC e a manutenção da integridade do DNA mitocondrial, a sensibilidade celular a estresse redox mitocondrial e possíveis alterações bioenergéticas e redox. Para tal, padronizamos um ensaio *in vitro* de cinética de incisão em DNA plasmidial a fim de investigarmos o possível papel de XPC no reparo de lesões oxidadas em mtDNA. Porém, nossos dados revelaram que XPC não se encontra em mitocôndrias. Apesar disso, células XP-C são mais sensíveis ao tratamento com azul de metileno (AM), antimicina A (AA) e rotenona (ROT), que geram estresse redox mitocondrial. A sensibilidade à AA foi completamente revertida em células corrigidas. Células XP-C apresentaram alterações quanto ao uso dos complexos mitocondriais, com diminuição da taxa de consumo de oxigênio (OCR) via complexo I e um aumento da OCR via complexo II, dependente da presença de XPC. Ademais, a linhagem XP-C apresentou um desequilíbrio redox mitocondrial com maior produção de EROs e menor atividade de GPx. O DNA mitocondrial de células XP-C apresentou níveis elevados de lesão e deleção, que no entanto não retornaram aos níveis encontrados em células selvagens na linhagem XP-C corrigida. Observamos uma acentuada diminuição da expressão de *PPARGC1A*, um importante regulador de biogênese mitocondrial. Contudo, não foi possível determinar o mecanismo de supressão da expressão de *PPARGC1A*. Por fim, identificamos que o tipo de mutação em *XPC* pode estar associado a expressão de *PPARGC1A*. Esse estudo abre novas possibilidade na investigação do papel de proteína XPC, à parte da instabilidade genômica, na adaptação metabólica e desequilíbrio redox em direção da progressão tumoral.

Palavras-chave: XPC, regulação, complexos da cadeia de transporte de elétrons, desequilíbrio redox, PPARGC1A

ABSTRACT

MORI, M. P. **New role of XPC protein in regulating the electron transport chain complexes and redox unbalance**. 2015. 173 f. Tese (Doutorado) – Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

Mitochondria continuously produce reactive oxygen species (ROS), mainly at the electron transport chain. Harman (1956, 1972 e 1992) proposed that normal aging is driven by increased mitochondrially generated free radicals. Indeed, during the course of aging there is an increased imbalance between formation and removal of ROS, leading to redox stress. This condition favours the formation of oxidized DNA lesions, given rise to mutations and cell death. Several molecular mechanisms cooperates to repair the DNA. Two DNA repair pathways deal with the majority of lesions: base excision repair (BER) and nucleotide excision repair (NER). The BER pathway corrects small base modifications that arise from deamination, alkylation and oxidation reactions. The NER pathway is more versitile, recognizing helix-distorting lesions, such as UV-induced damage and bulky adducts. Xeroderma pigmentosum (XP-A to XP-G) patients inherit mutations in one of seven protein-coding genes involved in NER pathway, or in a gene coding a translesion DNA polymerase (XP-V). Photosensitivity and a thousand-fold increased in the risk of developing cutaneous neoplasms are the main clinical features of XP. XPC protein functions in the recognition step of global genome NER (GG-NER) sub-pathway, and mutations in this gene lead to classical XP symptoms. Recently, it has been described that XPC acts: i) as a cofactor in BER pathway through functional interaction with DNA glycosylases OGG1, TDG and SMUG1; ii) as coactivator in transcription at Oct4/Sox2, RXR and PPARα responsive elements; iii) in metabolic shift during keratinocytes transformation. Thus, we sought to investigate a possible role for XPC in the maintenance of mtDNA integrity, cellular sensitivity to mitochondrial redox stress and eventual bioenergetic and redox changes. For this purpose, we established an *in vitro* plasmid incision assay to investigate the possible role of XPC in the repair of oxidized lesions in mitochondrial DNA. However, our data revealed that XPC did not localized in mitochondria. Nonetheless, XP-C cells are more sensitive to methylene blue, antimycin A (AA) and rotenone treatment, which induce mitochondrial redox stress. The XP-C sensitivity to AA was completely reverted in XPC-corrected cells. XP-C cells presented altered usage of mitochondrial complexes, with decreased oxygen consumption rate (OCR) via complex I and increased OCR through complex II, an XPC-dependent phenomenon. Furthermore, the XP-C cell line showed mitochondrial redox imbalance with increased ROS production and decrease GPx activity. MtDNA from XP-C cells accumulate lesions and deletions, which, however, were found at similar levels in the corrected cell line. We identified a sharp decrease in the expression of *PPARGC1A*, a master regulator of mitochondrial biogenesis. Nevertheless, it was not possible to determine the mechanism of suppression of *PPARGC1A* expression. Finally, our results suggest a possible link between the type of *XPC* mutation and *PPARGC1A* expression. This study unfolds new possible roles for XPC, aside from its established roles in genomic instability, in metabolic adaptation and redox imbalance towards tumour progression.

Keywords: XPC, regulation, electron transport chain complexes, redox imbalance, PPARGC1A

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

1-8

2-OH-Ade	2-hidroxiadenina
2′-dR	2′-desoxirribose
3′-PO_4^{2-}	3′-fosfato
5-aza-dC	5-aza-2′-desoxicitidina
5′-dRP	2′-desoxirribo-5′-fosfato
5′-PO_4^{2-}	5′-fosfato
6-4PP	6-4-pirimidina-pirimidona
8,5′-cdP	(*5′-R*)- ou (*5′-S*)-8-ciclo-2′-desoxirribopurina
8-oxoAde	8-oxo-7,8-diidroadenina
8-oxoGua	8-oxo-7,8-diidroguanina

A

AA	antimicina A
ACTB	β-actina
ADP	adenosina difosfato
AM	azul de metileno
AMP	adenosina monofosfato
AMPK	*AMP-activated protein kinase*
AP	apurínico/apirimídico
APE1	AP endonuclease 1
APS	persulfato de amônio
ATM	*ataxia-telangiectasia mutated*
ATP	adenosina trifosfato

B

BER	reparo por excisão de bases
BGG	γ-globulina bovina
BHD	domínio *β-hairpin*
BSA	soro albumina bovina

C

CAK	*cyclin-activated kinase*
CAT	carboxiatractilosídeo
CASRN	*Chemical Abstract Service Registration Number*
CCCP	carbonil cianeto de 3-clorofenilahidrazona
cDNA	DNA complementar ao mRNA
CDK	*cyclin-dependent kinase*
CO	citocromo c oxidase
COFS	síndrome cérebro-óculo-fácio-esquelética
COX	ciclooxigenase
CPD	dímero de pirimidina ciclobutano
CS	síndrome de Cockayne
CSA (CS-A)	*Cockayne syndrome complementation group A*
CSB (CS-B)	*Cockayne syndrome complementation group B*
Ct	*cycle threshold*
CTE	cadeia de transporte de elétrons

D

Δψ	potencial elétrico de membrana mitocondrial
DDB1	*damage-specific DNA binding protein 1*
DDB2	*damage-specific DNA binding protein 2*
DDR	sinalização de dano no DNA
DMEM	*Dulbecco's modified eagle medium*
DNA	ácido desoxirribonucleico
DNA-PK	*protein kinase, DNA-activated*
DPI	difeniliodônio
DRR	reparo por reversão direta
DSB	quebra de fita dupla
DSRB	reparo de quebra de fita dupla
DTNB	ácido 5,5′-ditiobis(2-nitrobenzóico)
DTT	ditiotreitol

E

ECID	ensaio *in vitro* de cinética de incisão em DNA plasmidial
EDTA	ácido etilenodiaminotetraacético
EGTA	ácido etileno glicol-bis(2-aminoetiléter)-*N,N,N′,N′*-tetraacético
EndoIII	endonuclease III de *E. coli* (*nth*)
e.p.m.	erro padrão da média
EPM	extrato proteico mitocondrial
ERCC1	*excision repair cross complementation 1*
ERCC2	*excision repair cross complementation 2*
ERCC3	*excision repair cross complementation 3*
ERCC4	*excision repair cross complementation 4*
ERCC5	*excision repair cross complementation 5*
ERCC6	*excision repair cross complementation 6*
ERCC8	*excision repair cross complementation 8*
EROs	espécies reativas de oxigênio

F

FA	anemia Fanconi
FEN1	*Flap endonuclease 1*
FAD	flavina adenina dinucleotídeo, forma oxidada
$FADH_2$	flavina adenina dinucleotídeo, forma reduzida
FapiAde	4,6-diamino-5-formamidopirimidina
FapiGua	2,6-diamino-4-hidroxi-5-formamidopirimidina
Fe-S	ferro-enxofre
FMN	flavina mononucleotídeo
Fpg	formamidopirimidina DNA glicosilase de *E. coli* (*mutm*)

G

GG-NER	reparo global do genoma por excisão de nucleotídeos
GPx	glutationa peroxidase
GR	glutationa redutase
GSH	glutationa, forma reduzida
GSSG	glutationa, forma oxidada

H

HEPES	ácido 4-(2-hidroxietil)piperazina-1-etanosulfônico
HPRT	*hypoxanthine phosphoribosyltransferase*
HR	recombinação homóloga

HRP	peroxidase de rabanete

I

%ISC	índice de sobrevivência celular

K

KRT8	*keratin 8, type II*

L

LIG1	DNA ligase 1
LIG3	DNA ligase 3
LOX	lipooxigenase
LP-BER	BER de fragmento longo

M

M1Gua	pirimido[1,2α]purina-10(3H)ona
MDA	malondialdeído
MDB4	*methyl-CpG binding domain protein 4*
MDFs	*murine dermal fibroblasts*
MEFs	*murine embryonic fibroblasts*
MMR	reparo de pareamento errôneo
MPG	*N-methylpurine-DNA glycosylase*
mRNA	RNA mensageiro
MSHE	manitol-sacarose-HEPES-EDTA-EGTA
mtDNA	DNA mitocondrial
MT-ND1	*mitochondrially encoded NADH 1 dehydrogenase*
MT-ND4L	*mitochondrially encoded NADH 4L dehydrogenase*
MTT	brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazólio
MUTYH	*mutY homolog*

N

NAD^+	nicotinamida adenina dinucleotídeo, forma oxidada
NADH	nicotinamida adenina dinucleotídeo, forma reduzida
$NADP^+$	nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato, forma oxidada
NADPH	nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato, forma reduzida
nDNA	DNA nuclear
NDPC	número de duplicações da população celular
NEIL1	*nei endonuclease VIII-like 1*
NEIL2	*nei endonuclease VIII-like 2*
NEIL3	*nei endonuclease VIII-like 3*
NER	reparo por excisão de nucleotídeos
NFE2L1	*nuclear factor, erythroid 2-like 1*
NHEJ	junção de extremidades não-homólogas
NOS	óxido nítrico sintase
NOX	NADPH oxidase
NRF1	*nuclear respiratory factor 1*
NTH1	*nth endonuclease III-like 1 (E. coli)*

O

OCR	taxa de consumo de O_2

OGG1	*8-oxoguanine DNA glycosylase*
Oligo	oligomicina A

P

PAR	poli(ADP-ribose)
PARP1	*poly (ADP-ribose) polymerase*
PBS	solução salina tamponada com fosfato
PCNA	*proliferation activated nuclear antigen*
PCR	reação em cadeia da polimerase
PNKP1	*polynucleotide kinase/phosphatase protein 1*
Pol	DNA polimerase
POLH	DNA polimerase η
PPARA ou α	*peroxisome proliferator-activated receptor alpha*
PPARGC1A	*peroxisome proliferator-activated receptor gamma, coativator 1 alpha*
PPARGC1B	*peroxisome proliferator-activated receptor gamma, coactivator 1 beta*
PPRC1	*peroxisome proliferator-activated receptor gamma, coactivator related 1*
Prx	peroxiredoxina reduzida
Prx-S–S-Prx	peroxiredoxina oxidada

R

RFC	*replication factor C*
RNA	ácido ribonucléico
RNA Pol	RNA polimerase
ROT	rotenona
RPA	*replication protein A*
rRNA	RNA ribossômico
RT-qPCR	PCR quantitativa após reação de transcriptase reversa

S

SBF	soro bovino fetal
SCAN1	ataxia espinocerebelar com neuropatia axonal
SDH	succinato desidrogenase
SDHA	*succinate dehydrogenase complex, subunit A, flavoprotein (Fp)*
SDS	dodecil sulfato de sódio
SIRT1	*sirtuin 1*
SIRT3	*sirtuin 3*
SMUG1	*single-strand-selective monofunctional uracil-DNA glycosylase*
SOD	superóxido dismutase
SP-BER	BER de fragmento curto
SSB	quebra de fita simples
SSBR	reparo de quebra de fita simples

T

TAE	solução tampão Tris-acetato-EDTA
TBP	*TATA box binding protein*
TBS	solução tampão Tris-salina
TBST	solução tampão Tris-salina-Tween
TC-NER	*reparo acoplado à transcrição por excisão de nucleotídeos*
TDG	*thymine-DNA glycosylase*
TDP1	*tyrosyl-DNA phosphodiesterase 1*
TDPC	tempo de duplicação da população celular
TFAM	*transcription factor A, mitochondrial*
TFIIH	*transcription factor IIH*
Tg	timina glicol

TLS	síntese de DNA translesão
TMPD	*N,N,N′,N′*-tetrametil-1,4-fenilenodiamino
tRNA	RNA transportador
Trx	tioredoxina
TrxR	tioredoxina redutase
TTD	tricotiodistrofia
TUBB	β-tubulina

U

UbQ	ubiquinona
$UbQ^{\bullet}$	semiubiquinona
$UbQH_2$	ubiquinol
UNG	*uracil-DNA glycosylase*
UV_SS	síndrome de sensibilidade a UV

X

XL-PCR	reação em cadeia da polimerase de fragmento longo
XP	xeroderma pigmentoso
XPA (XP-A)	*xeroderma pigmentosum complementation group A*
XPB	*xeroderma pigmentosum complementation group B*
XPC (XP-C)	*xeroderma pigmentosum complementation group C*
XPD	*xeroderma pigmentosum complementation group D*
XPE (XP-E)	*xeroderma pigmentosum complementation group E*
XPF (XP-F)	*xeroderma pigmentosum complementation group F*
XPG	*xeroderma pigmentosum complementation group G*
XPV (XP-V)	*xeroderma pigmentosum complementation group V*
XRCC1	*X-ray Chinese hamster complementation group 1*

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Sequência referência dos esiRNAs utilizados nos experimentos de silenciamento de XPC em células MRC-5..... 79

Tabela 2 – Relação dos genes investigados e sequência dos iniciadores utilizados nas reações de RT-qPCR. 81

Tabela 3 – Relação dos genes mitocondriais e nucleares e sequência dos iniciadores utilizados nas reações de qPCR...... 83

Tabela 4 – Relação dos iniciadores baseado na região genômica amplificada e sequência dos iniciadores utilizados nas reações de XL-PCR...... 84

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Processos moleculares mitocondriais que produzem e consomem as EROs. 26

Figura 2 – Diversidade química de modificações de DNA induzidas por oxidantes..... 30

Figura 3 – DNA mitocondrial (mtDNA) e a cadeia transportadora de elétrons (CTE) . 33

Figura 4 – Reparo por excisão de base de fragmento curto (SP-BER)..... 39

Figura 5 – Reparo por excisão de base de fragmento longo (LP-BER) 41

Figura 6 – Reparo por excisão de nucleotídeos (NER) 48

Figura 7 – Mutações em genes de NER e manifestações clínicas..... 51

Figura 8 – Ilustração esquemática do experimento de indução de danos em DNA plasmidial 62

Figura 9 - Desenho esquemático da distribuição das células em *XF24 V7 Cell Culture Microplates*..... 74

Figura 10 – Exemplo representativo de determinação de lesões de DNA induzida por fotossensibilização de AM 86

Figura 11 – Indução de lesões em DNA plasmidial pela fotossensibilização do AM..... 87

Figura 12 – Pureza de frações mitocondriais após isolamento por centrifugação diferencial em gradiente de densidade 88

Figura 13 – Experimento piloto dos ensaios *in vitro* de cinética de incisão em DNA plasmidial 89

Figura 14 – Padronização do ensaio *in vitro* de Cinética de Incisão em DNA plasmidial 90

Figura 15 – Localização subcelular da proteína XPC 92

Figura 16 – Ensaio de sobrevivência clonogênica em tratamento com AM 94

Figura 17 – Ensaio de sobrevivência clonogênica em tratamento com inibidores dos complexos I e III 96

Figura 18 – Índice de sobrevivência celular medido pela redução do MTT em MDFs após o tratamento com AM fotossensilibizado 97

Figura 19 – Número de duplicações da população celular (NDPC) 98

Figura 20 – OCR ligada a substratos de NADH em células MRC-5, XP4PA-SV e XP4PA-XPC 99

Figura 21 – OCR via complexos II e IV em células MRC-5, XP4PA-SV e XP4PA-XPC 100

Figura 22 – Medida da OCR em células aderidas..... 102

Figura 23 – Medida da produção de H_2O_2 por Amplex® UltraRed 104
Figura 24 – Medida da produção de $O_2^{\bullet -}$ por MitoSOX™ 105
Figura 25 – Atividade de enzimas antioxidantes..... 106
Figura 26 – Análise de danos no mtDNA pela técnica de XL-PCR 107
Figura 27 – Análise de número de cópias de mtDNA e frequência de deleção por qPCR 108
Figura 28 – Atividade de citrato sintase 109
Figura 29 – Expressão de genes da CTE, de reguladores de biogênese mitocondrial e de moduladores de metabolismo mitocondrial 111
Figura 30 – Expressão de XPC, PPARGC1 e KRT em células tratadas com 5-aza-dC 113
Figura 31 – Expressão de XPC, PPARGC1 e KRT na linhagem XP-C corrigida..... 114
Figura 32 – Expressão de TFAM e PPRC1..... 115
Figura 33 – Expressão de TBP, XPC e PPARGC1A em experimento de silenciamento de XPC 116
Figura 34 – Expressão de XPC e PPARGC1A em linhagens primárias com mutações distintas em XPC 117

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 22

1.1 MITOCÔNDRIAS COMO FONTE DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO 23
1.1.1 Sistema Mitocondrial de Defesa Antioxidante 25
1.2 OXIDAÇÃO DO DNA E MUTAGÊNESE 26
1.3 MUTAÇÕES EM MTDNA E GERAÇÃO DE EROS: CICLO VICIOSO 32
1.4 REPARO DE DNA 35
1.5 REPARO POR EXCISÃO DE BASE (BER) 37
1.5.1 BER de Fragmento Curto (SP-BER) 38
1.5.2 BER de Fragmento Longo (LP-BER) 40
1.5.3 BER Mitocondrial (mtBER) 43
1.6 REPARO POR EXCISÃO DE NUCLEOTÍDEOS (NER) 44
1.6.1 Reparo Acoplado à Transcrição (TC-NER) 45
1.6.2 Reparo Global do Genoma (GG-NER) 46
1.7 XERODERMA PIGMENTOSO GRUPO DE COMPLEMENTAÇÃO C (XPC) 49
1.7.1 Sintomas de Pacientes XP-C e do Modelo Murino 49
1.7.2 Estrutura da Proteína XPC 52
1.7.3 Interações Proteína-Proteína de XPC 53
1.7.4 Outras Funções de XPC 53
1.8 INSTABILIDADE GENÔMICA, REPARO DE DNA E METABOLISMO MITOCONDRIAL 55

2 OBJETIVOS 57

2.1 OBJETIVOS GERAIS 57
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS 57

3 MATERIAIS E MÉTODOS 58

3.1 REAGENTES 58
3.2 PREPARAÇÃO DE BACTÉRIAS QUIMIOCOMPETENTES 60
3.3 TRANSFORMAÇÃO BACTERIANA POR CHOQUE TÉRMICO 60

3.4 EXTRAÇÃO DE DNA PLASMIDIAL EM PEQUENA ESCALA (MINI-PREP) 61
3.5 DETECÇÃO *IN VITRO* DE DANOS INDUZIDOS EM DNA PLASMIDIAL 62
3.6 LINHAGENS CELULARES 63
3.6.1 Fibroblastos Humanos Imortalizados 64
3.6.2 Fibroblastos Humanos Primários 64
3.6.3 Fibroblastos Murinos Primários 65
3.7 ISOLAMENTE DE MITOCÔNDRIAS DE CÉLULAS EM CULTURA 65
3.8 SDS-PAGE/WESTERN BLOT 66
3.9 PREPARAÇÃO DE EXTRATOS PROTEICOS MITOCONDRIAIS 67
3.10 MICROSCOPIA DE IMUNOFLUORESCÊNCIA 68
3.11 ENSAIO *IN VITRO* DE CINÉTICA DE INCISÃO EM DNA PLASMIDIAL 69
3.12 ENSAIOS DE SOBREVIVÊNCIA E PROLIFERAÇÃO CELULAR 70
3.12.1 Ensaio Clonogênico 70
3.12.2 Teste de Redução de MTT 71
3.12.3 Número e Tempo de Duplicação da População Celular 72
3.13 MEDIDA DA TAXA DE CONSUMO DE OXIGÊNIO (OCR) 72
3.13.1 OCR de Complexo Individuais da CTE em Células Permeabilizadas 72
3.13.2 OCR em Células Aderidas 73
3.14 MEDIDA INDIRETA DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO 75
3.14.1 Análise da Produção de $O_2^{\bullet-}$ com MitoSOX™ 75
3.14.2 Análise da Produção de H_2O_2 com Amplex® UltraRed 75
3.15 MEDIDA DE ATIVIDADES ENZIMÁTICAS 76
3.15.1 Atividade de Citrato Sintase 76
3.15.2 Atividade de Superóxido Dismutase (SOD) 76
3.15.3 Atividade de Glutationa Peroxidas (GPx) 77
3.16 ENSAIO DE REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE QUANTITATIVO (QPCR) .. 78
3.16.1 Análise da Expressão Gênica (RT-qPCR) 78
3.16.2 Análise do Número de Cópias e Frequência de Deleção de mtDNA 82
3.16.3 PCR de Fragmento Longo (XL-PCR) 83

4 RESULTADOS 85

4.1 ENSAIO *IN VITRO* DE CINÉTICA DE INCISÃO EM DNA PLASMIDIAL (ECID) 85
4.1.1 Caracterização dos Danos Induzidos em DNA Plasmidial 85

4.1.2 Confirmação da Pureza das Frações Mitocondriais 87
4.1.3 Padronização do ECID 89
4.2 ANÁLISE DA LOCALIZAÇÃO SUBCELULAR DE XPC 91
4.3 ANÁLISE DA SENSIBILIDADE DE CÉLULAS XP-C A ESTRESSE REDOX MITOCONDRIAL 93
4.3.1 Ensaios de Sobrevivência Celular Clonogênica 93
4.3.2 Teste de Redução do MTT 96
4.3.3 Número e Tempo de Duplicação da População Celular 97
4.4 MEDIDA DA TAXA DE CONSUMO DE OXIGÊNIO 99
4.5 ANÁLISE DA PRODUÇÃO E REMOÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO 103
4.5.1 Análise Indireta de Espécies Reativas de Oxigênio 103
4.5.2 Análise da Atividade de Enzimas Antioxidantes 105
4.6 ANÁLISE DE DANOS, NÚMERO DE CÓPIAS E DELEÇÃO DO MTDNA 106
4.7 ANÁLISE DA ATIVIDADE DE CITRATO SINTASE 109
4.8 ANÁLISE DE EXPRESSÃO GÊNICA 110
4.8.1 Triagem de Genes Diferencialmente Expressos em XP-C 110
4.8.2 Análise do Papel de XPC na Metilação do Promotor de *PPARGC1A* 112
4.8.3 Análise da Expressão de Genes da Família PGC1 e TFAM como Gene-Alvo 114
4.8.4 Análise do Efeito do Silenciamento de XPC na Expressão de *PPARGC1A* 115
4.8.5 Análise da Influência do Tipo de Mutação no Gene *XPC* na Expressão de *PPARGC1A* 116
5 DISCUSSÃO 118
6 CONCLUSÕES 128
REFERÊNCIAS 129
APÊNDICE 156

1 INTRODUÇÃO

Com o desenvolvimento das diversas áreas do conhecimento nos últimos dois séculos, em especial das Ciências da Saúde e Biológicas, observou-se um aumento significativo na expectativa e na qualidade de vida da população humana. Com a descoberta de antimicrobianos, soros e vacinas, e com os avanços tecnológicos na medicina diagnóstica, preventiva e na terapêutica, várias doenças infecciosas virais, bacterianas ou causadas por outros organismos tiveram sua incidência sobremodo diminuída. No entanto, em paralelo ao aumento global da expectativa de vida ocorreu um aumento expressivo na incidência e prevalência de cânceres, doenças cardiovasculares, neurodegenerativas e imunológicas (Castillo-Salgado, 2000; Buchalla et al., 2003; Mathers & Loncar, 2006).

O fator de risco comum e principal a essas doenças é a idade. Um dos questionamentos na pós-modernidade ocidental é: podemos evitar essas condições fisiopatológicas associadas ao envelhecimento? Na tentativa de responder isso, muitos cientistas se propuseram a estudar o fator ou os fatores causais por trás do processo de envelhecimento. Quase 60 anos desde que Harman (1956) propôs a "teoria do radical livre" como causa do envelhecimento, a mitocôndria continua sendo a estrela principal no estudo da relação entre radicais livres e outras espécies reativas e envelhecimento. De fato, o custo associado ao uso do oxigênio molecular (O_2) como aceptor final de elétrons da cadeia respiratória é a potencial formação do radical ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$) (Turrens, 2003) que, por sua vez, pode dar origem a outras espécies reativas de oxigênio (EROs), como peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e radical hidroxila ($^{\bullet}OH$). Embora novas vias moleculares de geração de oxidantes e nitrosantes tenham sido descritas em células, como NADPH oxidases (NOX), óxido nítrico sintases (NOS), ciclooxigenases (COX), lipoxigenases (LOX), xantina oxidase, monooxigenases da família de citocromo P450, estima-se que as mitocôndrias ainda são responsáveis por 90% da geração celular de EROs (Balaban, Nemoto & Finkel, 2005). Mesmo com o entendimento mais apropriado do papel fisiológico de segundos mensageiros exibido por oxidantes como H_2O_2 e $O_2^{\bullet-}$ e nitrosante como $NO^{\bullet}$, reações inespecíficas destas espécies reativas com biomoléculas, como lipídeos, proteínas e DNA, exercem um papel chave no desenvolvimento de diversos processos fisiopatológicos (Holmström & Finkel, 2014).

1.1 Mitocôndria como Fonte de Espécies Reativas de Oxigênio

Acredita-se que na mitocôndria os complexos I e III da cadeia de transporte de elétrons (CTE) sejam os principais responsáveis pela produção colateral ou até mesmo regulatória de $O_2^{\bullet-}$ (Fig. 1). Resumidamente, a CTE é constituída por complexos proteicos de alto peso molecular que possuem em suas estruturas carreadores de elétrons, capazes de transportar os equivalentes redutores gerados nas reações de catabolismo (fontes oxidáveis de carbono) sucessivamente até o O_2, gerando água e um gradiente de prótons (H^+) através da membrana mitocondrial interna (ΔpH). Devido à carga positiva do próton um gradiente elétrico potencial é formado através da membrana mitocondrial interna (potencial elétrico de membrana mitocondrial – ΔΨ). Juntos, o ΔpH e o ΔΨ contribuem para a formação da força próton-motriz (FPM ou Δp), que é a energia potencial desses gradientes utilizada principalmente para síntese de ATP, transporte de metabólitos e homeostase iônica (Figueira et al., 2013).

Os elétrons iniciam seu fluxo através da cadeia respiratória via complexo I, quando o doador de elétrons é NADH, ou via complexo II, que utiliza $FADH_2$ como cofator. O complexo I (NADH:ubiquinona oxidoredutase) é um complexo multiproteico, em formato de L, composto por pelo menos 45 diferentes subunidades (Vinothkumar, Zhu & Hirst, 2014). No sítio de oxidação de NADH, o primeiro grupo a receber elétrons é a flavina mononucleotídeo (FMN) que rapidamente os transfere via centros de ferro-enxofre (*Fe-S cluster*) até a ubiquinona (UbQ). Caso o sítio de ligação a NADH (NADH desidrogenase – módulo N) esteja desocupado e FMN totalmente reduzido, existe a possibilidade de O_2 ser reduzido a $O_2^{\bullet-}$ (Kussmaul & Hirst, 2006). De fato, não existem subunidades extras (ou supérfluas) ao redor do sítio de ligação de NADH, o que reforça a hipótese de formação de oxidantes nesse local (Vinothkumar, Zhu & Hirst, 2014). Outro local em que se acredita gerar $O_2^{\bullet-}$ é o sítio de ligação a UbQ (módulo Q) (Herrero & Barja, 2000) mesmo local onde a rotenona se liga inibindo o complexo I (Figueira et al, 2013). Independentemente do mecanismo, ambos os sítios de produção de $O_2^{\bullet-}$ o liberam na matriz mitocondrial.

Por sua vez, o complexo II (succinato desidrogenase – SDH) é menos suscetível a produção de oxidantes devido ao modo como seus centros redox estão arranjados (Yankovskaya et al., 2003). Porém, a redução do montante (*pool*) de UbQ pela SDH, glicerol-3-fosfato desidrogenase e acil-CoA desidrogenases a fim de abastecer os complexos III e IV, pode resultar em um fluxo reverso de elétrons para o complexo I, pelo menos em mitocôndrias

isoladas; e esse fenômeno está associado à produção de $O_2^{\bullet-}$ no sítio de ligação da UbQ (Figueira et al., 2013).

No complexo III (citocromo bc_1), durante o mecanismo de transferência de elétrons denominado ciclo Q (Mitchell, 1976; Trumpower et al., 1990), a geração do radical semiubiquinona ($UbQ^{\bullet}$) potencializa o escape de elétrons para o O_2 (Yu et al., 1978; Ohnishi & Trumpower, 1980). Isso porque no ciclo Q, o ubiquinol ($UbQH_2$ – produto da redução da UbQ) é oxidado no sítio Q_o, com a ejeção de dois H^+ da matriz mitocondrial para o espaço intermembranas transferindo um elétron para o centro Fe-S desse complexo. Esse elétron é sucessivamente transportado ao citocromo c_1 e, em seguida, ao citocromo c (este último não faz parte do complexo III). O outro elétron do $UbQH_2$ é transferido para o citocromo b_L, depois ao citocromo b_H. O elétron no citocromo b_H retorna a UbQ no sítio Q_i, regenerando citocromo b_H na forma oxidada e formando o radical $UbQ^{\bullet}$. Enquanto isso, um segundo $UbQH_2$ chega ao complexo do citocromo bc_1 e seus elétrons seguem as mesmas vias. O elétron do segundo $UbQH_2$ que seguiu a via de oxidoredução dos citocromos b_L e b_H retorna ao radical $UbQ^{\bullet}$ formado no primeiro ciclo no sítio Q_i gerando $UbQH_2$ (mesmo sítio de ligação da antimicina A, um inibidor do complexo III); o citocromo b_H e UbQ são regenerados (oxidados) liberando-os para outro ciclo de transporte de elétrons (Xia et al., 1997). A geração de EROs mediada pelo radical $UbQ^{\bullet}$ ocorre, principalmente, no sítio Q_o (Figueira et al., 2013). No sítio Q_o, a transferência de um elétron da $UbQH_2$ para o centro de Fe-S e do outro para o citocromo b não ocorre simultaneamente, havendo a formação transiente de $UbQ^{\bullet}$. Qualquer situação que permita a sobrevivência prolongada de $UbQ^{\bullet}$ no sítio Q_o favorece a formação $O_2^{\bullet-}$ (Jezek et al., 2005). Apesar do mecanismo não ser bem definido, sabe-se que o $O_2^{\bullet-}$ produzido no complexo III pode ser liberado tanto na matriz mitocondrial quanto no espaço intermembranas (Muller et al., 2004).

Outras fontes contribuem para a geração mitocondrial de EROs, como glicerol-3-fosfato desidrogenase, α-cetoglutarato desidrogenase, diidrolipoil desidrogenase do complexo da piruvato desidrogenase e monoaminoxidase (Drahota et al., 2002; Starkov et al., 2004, Tretter et al., 2004; Tahara et al., 2007; Zang & Misra, 1993). Entretanto, a contribuição dessas para o fluxo total de EROs mitocondrial, bem como seu papel em condições fisiológicas e patológicas, ainda não são bem estabelecidas.

1.1.1 Sistema Mitocondrial de Defesa Antioxidante

A "teoria do radical livre" de Harman encontrou um forte aliado após a descoberta de uma enzima intracelular, cuja função principal é sequestrar e reduzir o $O_2^{\bullet-}$ formado ao H_2O_2, a superóxido dismutase (SOD) (McCord & Fridovich, 1969). Hoje sabemos que múltiplas vias enzimáticas cooperam para a detoxificação das EROs, assim como para regular o papel de EROs na sinalização.

A EROs mais comumente formada na mitocôndria, o $O_2^{\bullet-}$ é rapidamente dismutado pelas duas SODs mitocondriais, a MnSOD (SOD2), situada na matriz mitocondrial, e a Cu/ZnSOD (SOD1), no espaço intermembranas. Devido à alta concentração da enzima somada a elevada cinética enzimática ($k \approx 2 \times 10^9$ $M^{-1}s^{-1}$), virtualmente, todo o $O_2^{\bullet-}$ formado dá origem ao H_2O_2.

Por sua vez, o H_2O_2 é menos reativo e mais difusível, sendo considerado a principal ERO na sinalização celular (Lindahl et al., 2011). Em mitocôndrias, dois sistemas enzimáticos são responsáveis pela remoção eficiente de H_2O_2: o sistema glutationa (GSH)/glutationa peroxidase (GPx)/glutationa redutase (GR) e o sistema tioredoxina (Trx)/peroxiredoxina (Prx)/tioredoxina redutase (TrxR). A enzima GPx utiliza duas moléculas do antioxidante GSH para reduzir uma molécula de H_2O_2 a duas moléculas de H_2O e uma de O_2. Em seguida, as duas glutationas oxidadas (GSSG) são reduzidas de volta à GSH pela enzima GR ao custo de NADPH. Já a Prx reduz o H_2O_2 através da oxidação de um resíduo de cisteína (Cys–SH) ao ácido sulfênico (Cys–SOH), que se condensa com a Cys–SH de uma outra molécula de Prx, formando uma ponte de dissulfeto intermolecular (Prx-S–S-Prx). Subsequentemente, a Trx reduz a ponte de dissulfeto da Prx-S–S-Prx ao custo da autoxidação intramolecular de duas Cys–SH (Trx_{oxi}), regenerando duas moléculas de Prx. Por fim, a Trx oxidada retorna ao estado reduzido através da enzima TrxR com o gasto de NADPH (Mailloux et al., 2013).

Um esquema geral dos processos moleculares que produzem e consomem as EROs em mitocôndrias é representada na **figura 1**.

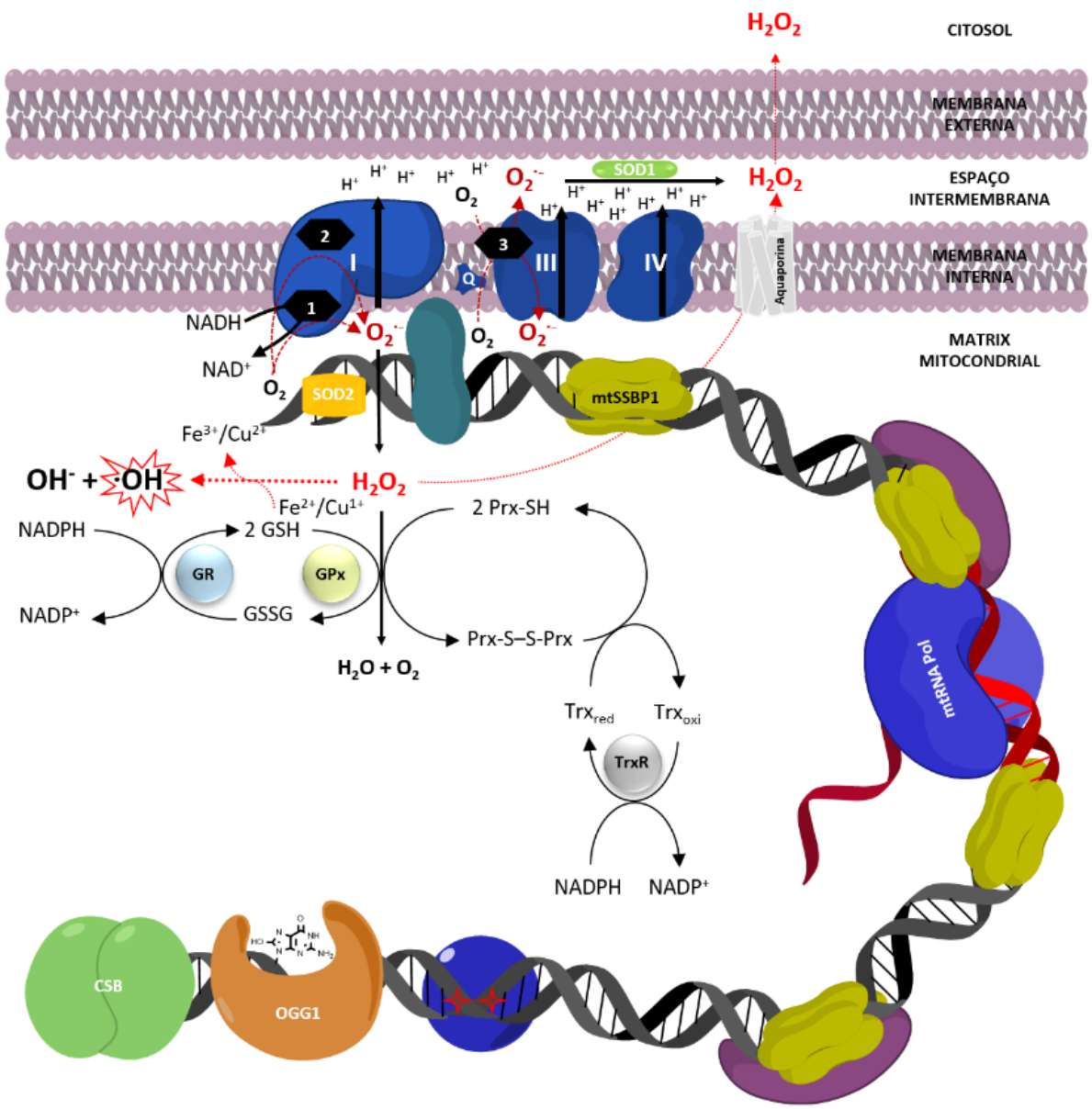


Figura 1 – Processos moleculares mitocondriais que produzem e consomem as EROs. Os principais sítios de geração de $O_2^{\bullet-}$ na CTE são: **1)** o sítio de oxidação de NADH no C-I através do grupo prostético FMN; **2)** o sítio de ligação a UbQ no C-I; e **3)** sítio Q_o de oxidação da $UbQH_2$. O radical $O_2^{\bullet-}$ formado é dismutado a H_2O_2 pela SOD2 na matriz mitocondrial, e pela SOD1 no espaço intermembranas. Por sua vez, o H_2O_2 é reduzido à água pela ação de dois sistemas enzimáticos: i) o GSH/GPx/GR e ii) Trx/Prx/TrxR. Ambos os sistemas, após uma cascata de reações de oxirredução, acabam utilizando o potencial redutor de NADPH, gerando $NADP^+$. Caso o H_2O_2 não seja metabolizado, ele pode passar da matriz mitocondrial para o espaço intermembranas através de aquaporinas. Além disso, o H_2O_2 pode se difundir através das membranas ao citosol e ao meio extracelular. Apesar do H_2O_2 ser relativamente inócuo, essa ERO pode reagir com Fe^{2+}/Cu^{1+} via reação de Fenton gerando o ânion OH^- e o altamente reativo radical $^{\bullet}OH$. Esse radical pode reagir com proteínas, lipídeos, RNA e DNA. A reação de $^{\bullet}OH$ com DNA será tratada na seção a seguir. *Adaptado de Muftuoglu, M.; Mori, M. P.; Souza-Pinto, N. C. Formation and repair of oxidative damage in the mitochondrial DNA, Mitochondrion, 2014.*

1.2 Oxidação do DNA e Mutagênese

O papel da molécula de DNA como armazenador da informação genética resulta em um problema intrínseco a essa função. No caso da molécula de DNA sofrer uma modificação

química, ao contrário de uma modificação em proteínas, lipídeos ou RNAs, a célula, via de regra, não pode degradar a molécula danificada e sintetizar uma nova. Isso porque a informação para sintetizar uma molécula nova está armazenada nela mesma. Contudo, duas características da molécula de DNA conferem-lhe vantagens para suplantar esse problema: a dupla fita e a complementariedade de bases entre as mesmas.

Apesar dessa aparente vantagem química, ainda assim, inúmeras reações químicas podem alterar sua estrutura, resultando em mudanças no conteúdo da informação genética, as mutações. Ao nível do organismo, mutações podem resultar em efeitos deletérios, e tanto mutações germinativas quanto mutações somáticas são associadas com várias doenças humanas (Evans et al., 2004).

Mesmo em condições fisiológicas, o DNA pode perder bases nitrogenadas espontaneamente, pela hidrólise da ligação *N*-β-glicosídica entre a base e o açúcar. Considerando somente a taxa de depurinação espontânea, o DNA pode perder de 2.000 a 10.000 purinas por dia em uma única célula de mamíferos (Lindahl & Nyberg, 1972). De modo semelhante, a deaminação espontânea da citosina em uracila ocorre em média de 100 a 500 vezes por dia em cada célula do nosso corpo (Lindahl & Nyberg, 1974; Duncan & Miller, 1980).

Como conhecemos hoje, a complexidade necessária à vida, como compartimentalização, metabolismo e replicação, acarreta tanto em um aumento da probabilidade quanto em um aumento da diversidade química de modificações no DNA. Levando em consideração somente as bases nitrogenadas do DNA, as possíveis modificações a que elas estão sujeitas são: i) reações de oxidação, alquilação e desaminação; ii) formação de fotoprodutos de UV [dímeros de pirimidina ciclobutano (CPD) e 6-4-pirimidina-pirimidona (6-4PP)]; iii) formação de adutos covalentes com nitrosaminas, epóxidos de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, aldeídos, cetoaldeídos e peróxidos de lipídeo; iv) ligação cruzada intercadeia, intracadeia e DNA-proteína. Ademais, ampliando os possíveis alvos de danos no DNA, reações de diversos compostos com a 2′-desoxirribose (2′-dR) podem gerar: i) sítios abásicos, ii) quebra de fita simples (SSB, do inglês *single strand break*) e iii) quebra de fita dupla (DSB, do inglês *double strand break*). Por fim, os próprios mecanismos de replicação de DNA apresentam falhas intrínsecas, de modo que podem ser gerados: i) pareamentos errôneos (não-canônico) e ii) alças de DNA fita simples devido a pequenas adições ou deleções, iii) além de quebras resultantes da desmontagem precoce da forquilha de replicação (Sancar et al., 2004; Branzei & Foiane, 2008).

Mesmo em eucariotos, onde a maioria das reações de oxirredução se encontram compartimentalizadas, o genoma se encontra continuamente vulnerável ao ataque de produtos colaterais de processos redox. Em células aeróbicas, as lesões oxidadas de DNA – ou seja, aquelas que foram induzidas por agentes oxidantes – representam o tipo de estresse genotóxico endógeno mais comum em organismos aeróbicos (Cooke et al., 2003).

Dentre os oxidantes mais frequentemente formados em sistemas biológicos, apenas o $^{\bullet}OH$ e $^{1}O_2$ reagem eficientemente com DNA. O ataque do grupo fosfodiéster do DNA é desprezível devido à alta densidade eletrônica. Já a 2′-dRP pode ser atacada pelo $^{\bullet}OH$ através da abstração de hidrogênio de qualquer um dos cinco carbonos do açúcar. A preferência de remoção de hidrogênio correlaciona-se à acessibilidade do carbono da pentose ao solvente na seguinte ordem: C5′>C4′>C3′>C2′>C1′ (Aydogan et al., 2002; Balasubramanian et al., 1998; Miller et al., 1994). Após o ataque mediado por $^{\bullet}OH$, ocorre a formação de um radical centrado no carbono atacado, que segue rearranjos intramoleculares culminando, na maioria das vezes, na quebra de fita de DNA (Breen & Murphy, 1995; Pogozelski & Tullius, 1998).

Quando o C5′ é atacado, na ausência de oxigênio molecular (O_2), o radical centrado nesse carbono ($^{\bullet}$C5′) pode atacar a dupla ligação N7–C8 da sua própria purina, formando um composto cíclico denominado (5′-*R*)- ou (5′-*S*)-8-ciclo-2′-desoxirribopurina (8,5′-cdP) (Keck, 1968; Raleigh et al., 1976; Dizdaroglu, 1986). A formação de 8,5′-cdP é fortemente inibida sob condições aeróbicas porque O_2 reage com $^{\bullet}$C5′ a uma velocidade igual a da taxa de difusão (Dizdaroglu et al., 1975, 1977; Isildar et al., 1981).

Contudo, as nucleobases são de longe o principal alvo de oxidação no DNA. O $^{\bullet}OH$ adiciona em duplas ligações das bases nitrogenadas com constantes de velocidade comparáveis à taxa controlada de difusão (k= 3 a 10 × 10^9 $M^{-1}s^{-1}$) (von Sonntag, 1987). Em pirimidinas, os principais alvos de ataques de $^{\bullet}OH$ são os carbonos C5 e C6; e os carbonos C4, C5 e C8, em purinas. Os produtos finais de oxidação em timina são os quatro diestereoisômeros *cis* e *trans* de 5,6-dihidroxi-5,6-diidrotimina (timina glicol) e a 5-hidroxi-5-metilhidantoina (Evans et al., 2004). Já a citosina possui um grupo amino lábil e seus produtos de oxidação principais são a 5,6-dihidroxi-5,6-diidrouracila (uracila glicol), 5-hidroxiuracila, 5-hidroxicitosina e 5-hidroxihidantoina (Samson-Thibault et al., 2012). Porém, a guanina é o composto mais amplamente estudado quanto a seus produtos de oxidação. O radical hidroxila ataca as duplas ligações entre os carbonos C4–C5 e N7–C8, mas também é capaz de abstrair hidrogênio do grupo 2-amino (Candeias & Steenken, 2000; Chatgilialoglu et al., 2009). O radical centrado em N7 exibe ambivalência redox (Steenken et al., 2001). Seguindo a via redutora, o radical C8-

OH-N7-il-guanina dará origem a 2,6-diamino-4-hidroxi-5-formamidopirimidina (FapiGua); e seguindo a via oxidante, o radical C8-OH-C4-il-guanina resulta na formação de 8-oxo-7,8-diidroguanina (8-oxoGua). Além disso, a guanina é capaz de reagir com $^{1}O_2$ que se adiciona ao anel imidazol da guanina formando um endoperóxido intermediário, que segue rearranjos intramoleculares para formar 8-oxoGua (Ravanat et al., 2001). As mesmas reações de adição do $^{\bullet}OH$ também ocorrem na adenina, com menor eficiência, gerando 4,6-diamino-5-formamidopirimidina (FapiAde), 8-oxo-7,8-diidroadenina (8-oxoAde) e, em menor grau, 2-hidroxiadenina (2-OH-Ade). A figura 2 identifica os principais alvos de espécies oxidantes em DNA, destacando alguns dos principais produtos resultantes desse ataque.

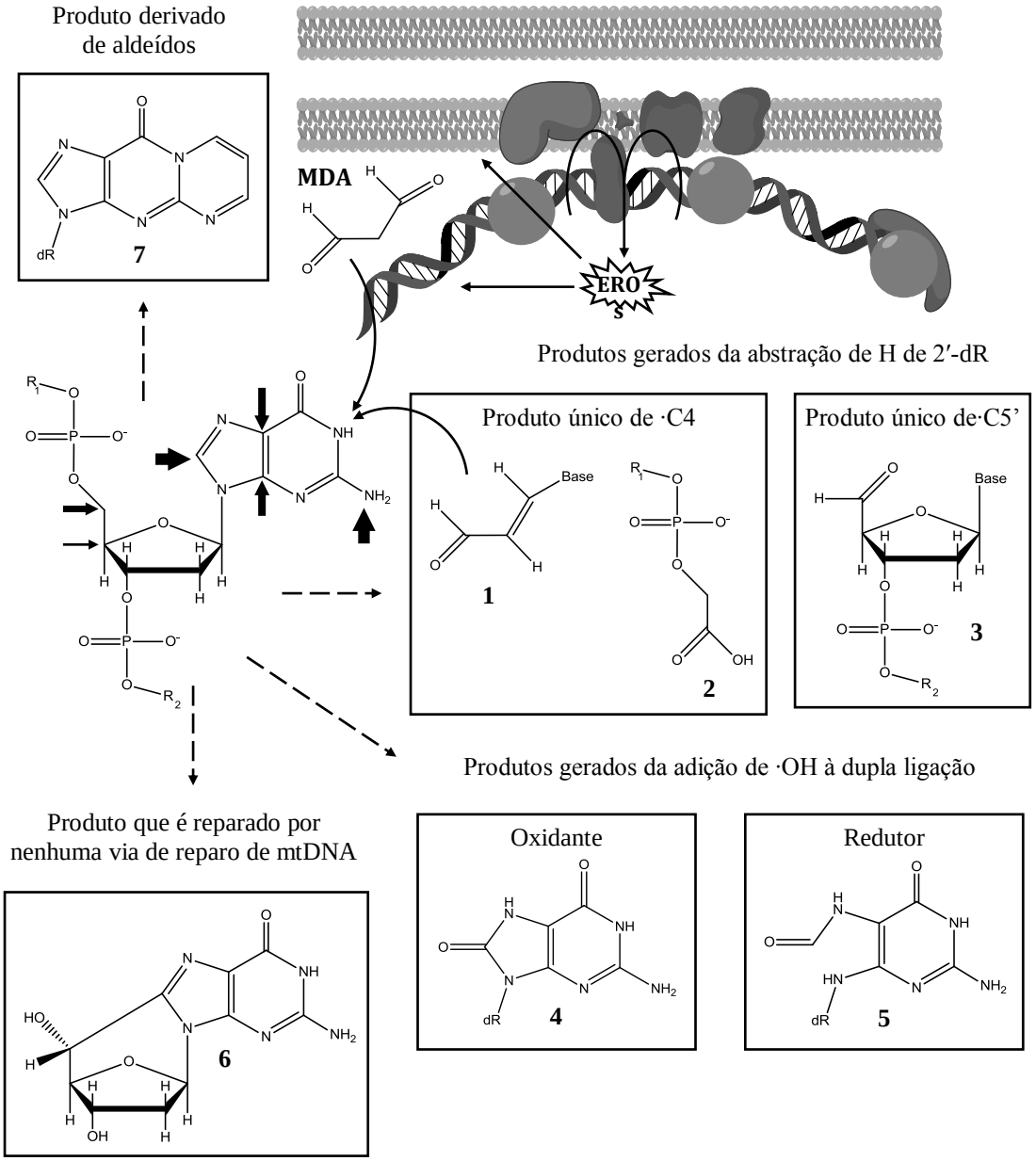


Figura 2 – Diversidade química de modificações de DNA induzidas por oxidantes. ·OH e $^1O_2$ são as principais EROs que reagem com DNA. ·OH prontamente se adiciona nas duplas ligações das bases nitrogenadas ou abstrai hidrogênio com menor eficiência. **1)** propenal base, **2)** 3′-fosfoglicolato e **3)** 5′-aldeído representam produtos únicos que são gerados da abstração de H da 2′-dR, que na maioria das vezes leva a quebra de fita de DNA. **4)** 8-oxoGua e **5)** FapiGua representam dois produtos de oxidação da guanina. Ambos se originam da adição de na dupla N7–C8, porém o ambiente redox determina qual via o radical C8-OH vai seguir. **6)** 8,5′-cdP representa um produto do radical centrado no C5′ que se adiciona a dupla ligação N7–C8 da purina adjacente. Não se conhece uma via de reparo de mtDNA que lide com esse tipo de lesão. Por isso, especula-se que essa lsesão seja extremamente tóxica para o mtDNA. **7)** M1G representa uma modificação indiretas advindo de subprodutos reativos formados no estresse redox, como MDA e propenal base. Apesar de M1G ser considerado um aduto volumoso foi demonstrado que ele é capaz de ser reparado por MPG (AAG). *Adaptado de Muftuoglu, M.; Mori, M. P.; Souza-Pinto, N. C. Formation and repair of oxidative damage in the mitochondrial DNA, Mitochondrion, 2014.*

Um resultado importante do estresse redox celular é que todas as biomoléculas são atingidas por diferentes EROs e subprodutos dessas reações podem interagir com DNA, gerando modificações distintas. Produtos de peroxidação lipídica como hidroperóxidos de lipídeos, derivados cetônicos e aldeídos reativos podem interagir com o DNA gerando uma vasta diversidade de adutos (Hecht et al., 2011). Um dos principais subprodutos da peroxidação

lipídica é o malondialdeído (MDA). Esse aldeído reativo ataca o grupo 2-amino da guanina seguido da ciclização em N1 e desidratação, dando origem ao pirimido[1,2α]purina-10(3H)ona (M1Gua). Outros aldeídos reativos, como o crotonaldeído, a acroleína e até mesmo o acetaldeído – comumente formado durante o metabolismo do etanol – reagem com DNA originando adutos covalentes nas nucleobase (Chung et al., 1989; Zhang et al., 2006 e 2007; Garcia et al., 2011).

Entretanto, do ponto de vista biológico, a introdução de modificações químicas e/ou estruturais no DNA só terá relevância se essas interferirem com a "função" primária dessa molécula em armazenar e transmitir informação. Essa interferência decorre do fato de que algumas dessas modificações podem ser refratárias à atividade de DNA e RNA polimerases, parando a progressão da replicação ou da transcrição, que são eventos geralmente citotóxicos. Além disso, outras modificações podem resultar na incorporação, pela DNA polimerase, de outro nucleotídeo, diferente daquele que seria o par canônico do nucleotídeo não modificado, resultando em um evento mutagênico. É importante salientar que nem toda vez que uma DNA polimerase (Pol) "passa por cima" de uma lesão (*lesion bypass*) ocorre um evento mutagênico; e que nem toda modificação é mutagênica.

Por exemplo, a 8-oxoGua pareia normalmente com citosina na orientação tridimensional *anti*. Porém, em conformação *syn* a 8-oxoGua pareia com adenina e, caso não seja reparada, origina a transversão G:C→T:A (Kuchino et al., 1987). Já a desaminação de citosina em uracila sempre levará a fixação da mutação de transição C:G→T:A, se não for corrigida. Modificações raras no DNA podem ter consequências severas em células replicativas, como é o caso da 2-OH-Ade. Dependendo da DNA polimerase e do contexto da sequência de DNA em que essa lesão se encontra, 2-OH-Ade pode parear com qualquer uma das quatro bases, gerando um espectro mutacional diverso (Barone et al., 2007; Amoroso et al., 2008).

Já a timina glicol (Tg), um produto de oxidação da timina, é capaz de bloquear a extensão das DNA polimerases α, β, δ e λ (Clark & Beardsley, 1989; Belousova et al., 2010). As modificações (5′*S*)-8,5′-ciclo-2′-desoxiadenina (8,5′-cdA) e (5′*S*)-8,5′-ciclo-2′-desoxiguanina (8,5′-cdG) são capazes de inibir a transcrição de RNA Pol II tanto *in vitro* quanto *in vivo* (You et al., 2012). Outro grupo, porém, reportou que 8,5′-cdPs não bloqueiam a transcrição, mas geram mutação transcricional (Marietta & Brooks, 2007). Além do mais, não obstante várias DNA polimerases de síntese translesão serem capazes de lidar com 8,5′-cdP,

ainda assim essas Pol η, ι, κ e ζ passam com dificuldade através da lesão, além de incorporarem o nucleotídeo errado através da lesão *in vivo*, particularmente, Pol η (You et al., 2013).

1.3 Mutações em mtDNA e Geração de EROs: Ciclo Vicioso

O genoma mitocondrial (mtDNA) possui uma altíssima densidade de informação. Em humanos, aproximadamente 96% dos 16.569 pares de bases do mtDNA compreendem os 37 genes que codificam para 13 polipeptídeos, 22 RNAs transportadores (tRNA) e 2 RNAs ribossômicos (rRNA) (Muftuoglu et al., 2014). Dos complexos da CTE, o mtDNA codifica sete subunidades do complexo I (*MT-ND1*, *-2*, *-3*, *-4*, *-4L*, *-5* e *-6*); uma do complexo III (citocromo B – *MT-CYB*); três do complexo IV (*MT-CO1*, *-2* e *-3*); e duas da ATP sintase (*MT-ATP6* e *-8*). Além disso, em cada uma das duas fitas do mtDNA (H e L, do inglês *heavy* e *light*, em referência ao conteúdo diferenciado de purinas nas duas fitas, que resulta em massa molar distinta) os genes são transcritos em um único transcrito policistrônico, a partir do promotor de cada fita (P_H o promotor da fita H e P_L o promotor da fita L) (Bonawitz et al., 2006) (Fig. 3). Consequentemente, uma lesão no mtDNA tem uma maior chance de acontecer em uma região codificadora, aumentando a probabilidade de consequência fenotípica da mutação, caso o mtDNA esteja sendo replicado, ou de parada da RNA polimerase mitocondrial, caso o mtDNA esteja sendo transcrito. De fato, calcula-se que mutações no mtDNA ocorram 10 vezes mais frequentemente do que no DNA nuclear (Brown et al., 1979), apesar de a razão para essa discrepância ainda não estar clara.

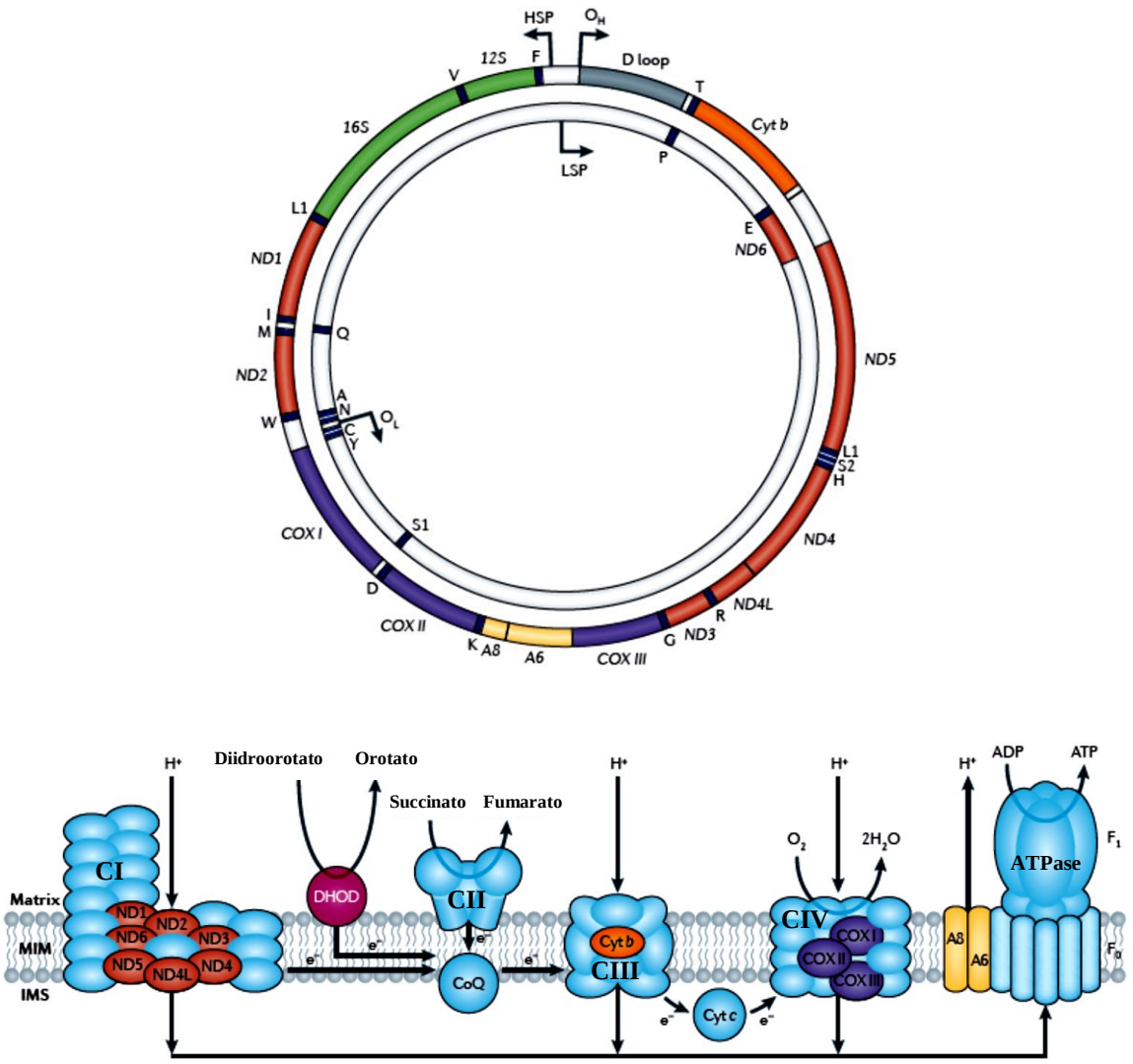


Figura 3 – DNA mitocondrial (mtDNA) e a cadeia de transporte de elétrons (CTE). Os 37 genes codificados no mtDNA incluem sete subunidades do CI (ND1, 2, 3, 4, 4L, 5 e 6), uma subunidade do CIII (citocromo b – Cyt b), três do CIV (CO1, 2 e 3) e duas da ATPase (A6 e 8), 22 tRNAs (código de uma letra) e 2 rRNAs (16S e 12S). (*Obs.: Esses não são os símbolos oficiais. Os símbolos oficiais são encontrados no texto*). A CTE e a distribuição dos polipeptídeos codificados no mtDNA. *Fonte: Schon, E. A.; DiMauro, S.; Hirano, M. Human mitochondrial DNA: roles of inherited and somatic mutations. Nat Rev Genet, v. 13, n. 12, p. 881, 2012*

Mutações em mtDNA estão no centro do conceito moderno da teoria mitocondrial do envelhecimento. Essa teoria, propõe que as EROs geradas normalmente na mitocôndria são as responsáveis por causar mutações no mtDNA (Harman, 1972 e 1992; Linnane et al., 1989). Postula ainda que o acúmulo progressivo de mutações no genoma mitocondrial durante a vida do organismo leva a disfunção mitocondrial, e esse declínio na função mitocondrial resultaria em um estresse redox, aumentando ainda mais os danos e as mutações causados por oxidantes no mtDNA, gerando um ciclo vicioso (Taylor & Turnbull, 2005).

Contudo, pouco se sabe a respeito da regulação *in vivo* da geração de oxidantes nos complexos mitocondriais. Porém, há uma clara correlação positiva entre a intensidade da força próton-motriz e a produção de $O_2^{\bullet -}$, enquanto uma diminuição nesse potencial através da

membrana diminui a geração de $O_2^{\bullet-}$ (Korshunov et al., 1997). Especula-se que um elevado potencial de membrana acarreta na diminuição do fluxo de elétrons através da cadeia respiratória, aumentando a probabilidade de ocorrer a redução monoeletrônica do O_2 em $O_2^{\bullet-}$. Igualmente, poder-se-ia esperar que mutações no mtDNA que afetem a velocidade do fluxo de elétrons através da CTE causariam também um desequilíbrio no estado redox mitocondrial em direção a mais oxidativo.

É claro que, porque uma única célula pode conter de poucas centenas a alguns milhares de genomas mitocondriais, é comum existir uma variação na sequência das várias moléculas de mtDNA em uma mesma célula, fenômeno denominado heteroplasmia (Brandon et al., 2006). O contrário, a homoplasmia, é quando todas as moléculas da população de mtDNA são iguais. De acordo com os dados experimentais existentes até o momento, para que uma mutação patogênica no mtDNA possa se manifestar funcionalmente, ela deve exceder um determinado limiar do total de genomas mitocondriais na célula, que é de 60 a 90% dependendo: i) do tipo da mutação, ii) e o tipo celular onde ela se manifesta (Krishnan et al., 2007).

À parte da dificuldade em investigar a validade do conceito do “ciclo vicioso”, alguns estudos se propuseram a analisar somente um dos lados do ciclo, começando com a investigação do efeito de algumas mutações no mtDNA na bioenergética e no estado redox mitocondrial. De fato, células de indivíduos com a mutação patogênica 8993T>G em mtDNA (que gera a substituição L156R na subunidade ATP6 do complexo V) apresentam uma maior produção de EROs (Trounce et al., 1994; Mattiazi et al., 2004; Petros et a, 2005). Em experimentos de *transmitochondrial cybrids* que consiste na fusão celular de células enucleadas com células depletada de mtDNA (células ρ^0) Ishikawa et al. (2008) demonstraram que o mtDNA carregando duas mutações em *ND6* (G13997A e 13885insC) é capaz de aumentar a geração EROs e a capacidade metastática de células tumorais. Do outro lado do ciclo, também há bons argumentos mostrando que a oxidação lenta e continua que ocorre nos tecidos aumentam a carga de mutações no mtDNA. Corroborando essa hipótese, células negativas para citocromo *c* oxidase (CO-negativo) em análise imunohistoquímica, característica encontrada em tecidos de algumas doenças mitocondriais, também são encontradas em tecidos pós-mitóticos envelhecidos comparados com tecidos jovens (Muller-Hocker et al., 1989). Inesperadamente, com a idade, essas células CO-negativas acumulam mutações clonais no mtDNA ao invés de várias mutações típicas de instabilidade genômica (Muller-Hocker et al., 1993; Brierley et al., 1998). Em outro estudo, a transversão T414G no mtDNA foi detectada exclusivamente em indivíduos com mais de 65 anos de idade (Michikawa et al., 1999). Deleções no mtDNA

também foram detectadas mais frequentemente em células de tecidos envelhecidos, como neurônios de várias regiões do cérebro e fibras musculares (Corral-Debrinski et al., 1992; Bender et al., 2006; Bua et al., 2006). Ademais, as células que continham essas deleções apresentaram disfunção na cadeia respiratória (Kraytsberg et al., 2006; Bua et al., 2006).

Contudo, há indícios de que o acúmulo de mutações em mtDNA com a idade não é dirigido por oxidação do mtDNA. Em um trabalho recente, Itsara et al. (2014) demonstraram que a maioria das mutações pontuais em mtDNA em *Drosophila* não são do tipo G:C→T:A – que é considerado uma assinatura de mutações induzidas oxidativamente. Igualmente, Waganat et al. (2015) estudando camundongos knockout para Cu-Zn superóxido dismutase (*Sod1*) não encontraram aumento significativo de deleções no mtDNA, embora as células desses camundongos produzam o dobro de H_2O_2 e apresentem o dobro de marcação para 8-oxoGua (Elchuri et al., 2005; Muller et al., 2006 e 2007; Waganat et al., 2015). Esses resultados abrem a possibilidade de que outros mecanismos ainda não profundamente explorados estejam envolvidos com a perda da estabilidade do mtDNA com a idade, entre eles os mecanismos de reparo de DNA.

1.4 Reparo de DNA

Em uma perspectiva pessoal da descoberta da dupla hélice, Francis Crick admite que "Nós deixamos escapar totalmente o papel de enzimas no reparo (de DNA) ... Eu percebi que o DNA é tão precioso que muitos mecanismos distintos de reparo de DNA devem existir" (Crick, 1974, tradução do autor). O grau de importância que o reparo de DNA representa para a biologia e a origem da vida pode ser compreendida claramente no fato de que todos os seres vivos, incluindo alguns vírus, possuem genes que codificam enzimas de reparo de DNA. A comunidade científica, em geral, aceita a hipótese de que mecanismos de reparo de DNA devam ter surgido muito no começo da vida. Isoladamente, a informação genética não sobreviveria às condições adversas que compunham a atmosfera primordial, independente da condição atmosférica imaginada ser redutora ou oxidante. Dessa forma, não seria fantasioso especular que o reparo de informações genéticas possa ter precedido ou acompanhado o aparecimento de moléculas autoreplicantes.

Historicamente, os primeiros pesquisadores a terem observado o fenômeno de reparo de DNA foram Albert Kelner e Renato Dulbecco, em observações independentes e em modelos distintos. Entretanto, o fenômeno, denominado fotorreativação, foi descrito apenas nos termos

da habilidade da luz visível em reverter os efeitos tóxicos de radiação ultravioleta (Kelner, 1949; Dulbecco, 1949). Isso porque, muito antes de conhecer o mecanismo molecular pelo qual a luz visível ativa a clivagem dos dímeros de pirimidina pela ação da enzima fotoliase, era necessário conhecer os alvos moleculares e a própria natureza química das modificações induzidas pela luz UV, que só foi determinada claramente em 1960 (Beukers & Berends, 1960). Posteriormente, as consequências biológicas dessas lesões foram extensivamente investigadas por Richard Setlow (Setlow et al., 1966). Um avanço significativo na compreensão da relevância biológica do reparo de DNA foi fornecido pelo Dr James E. Cleaver (1968) que relatou pela primeira vez a associação de um defeito no reparo de DNA com xeroderma pigmentoso (XP), uma doença hereditária rara cuja principal característica fenotípica é suscetibilidade aumentada a neoplasias cutâneas em áreas expostas à luz solar.

Os seres vivos são dotados de múltiplas vias de reparo que reconhecem e removem os diferentes tipos de modificações possíveis à molécula de DNA, cada uma com especificidade mais ou menos bem definida, havendo, em algumas ocasiões, sobreposição de substrato. Em mamíferos, há oito vias molecularmente definidas envolvidas em reparo e resposta aos diferentes tipos de lesões no DNA: i) reparo por reversão direta (DRR, do inglês *direct reversal repair*), ii) reparo por excisão de base (BER, do inglês *base excision repair*), iii) reparo por excisão de nucleotídeo (NER, do inglês *nucleotide excision repair*), iv) reparo de pareamento errôneo (MMR, do inglês *mismatch repair*), reparo de quebra de fita dupla v) por recombinação homóloga (HR, do inglês *homologous recombination*) e vi) por junção de extremidades não-homólogas (NHEJ, do inglês *non-homologous end joining*), vii) sinalização de dano ao DNA (DDS, do inglês *DNA damage response*) e viii) síntese de DNA translesão (TLS, do inglês *translesion synthesis*) (Milanowska et al., 2011).

Ainda, no contexto de reparo de DNA em mamíferos suas células possuem dois compartimentos onde a informação genética está armazenada na forma de DNA: o núcleo e a mitocôndria, onde se encontram os genomas nuclear (nDNA) e mitocondrial (mtDNA), respectivamente. Por muito tempo se imaginou que as mitocôndrias de mamíferos não possuíam um sistema de reparo de DNA. Isso se deveu, em grande parte, a experimentos conduzidos por Clayton et al. (1974), onde ficou demonstrado não haver remoção de dímeros de pirimidina do mtDNA de células humanas e de camundongos irradiadas com UV. Esses dados poderiam parecer contraditórios às observações feitas por Shima et al. (1973), que abordou a questão de reparo de mtDNA utilizando raios X. Nesses experimentos, Shima et al. demonstraram a incorporação de precursores de DNA em mitocôndrias isoladas de fígado de rato após a

irradiação. Porém, os autores do estudo demonstraram apenas que a incorporação era dependente de Pol γ, a DNA polimerase mitocondrial replicativa, não sendo possível identificar se a incorporação era associada à replicação ou ao reparo, devido à limitação técnico-científica da época. Finalmente o trabalho que identificou, de forma definitiva, a atividade de uma enzima específica de reparo de DNA em mitocôndrias de mamíferos foi realizado por Anderson e Friedberg, em 1980. Nesse trabalho, ficou claro que mitocôndrias altamente purificadas de células de mamífero apresentavam atividade específica de uracil DNA glicosilase, uma enzima de reparo descrita em 1974 por Tomas Lindahl.

Sabemos hoje que, do mesmo modo pelo qual o genoma nuclear é reparado, o mtDNA também é sujeito a diversas vias de reparo. Porém, nem todas as vias de reparo que se encontram no núcleo foram identificadas em mitocôndrias até o momento. Além disso, tanto a identidade molecular de vários componentes dessas vias quanto os mecanismos de regulação das diferentes vias ainda não estão claros.

Das oito vias de reparo identificadas em mamíferos, as vias BER e NER são as mais bem caracterizadas. Inclusive, nos primeiros estudos dos mecanismos moleculares de reparo de DNA, as duas vias eram conjuntamente denominadas de via de reparo por excisão (Setlow & Carrier, 1964; Boyce & Howard-Flanders, 1964; Aoki et al., 1966; Ganesan & Smith, 1969; Lindahl, 1982, Cleaver, 2003). As diferenças começaram a emergir principalmente através de pesquisas conduzidas por Lindahl no começo da década de 70, caracterizando as DNA glicosilases envolvidas na via de BER (Lindahl, 1982). Ainda no começo da década de 70, de Weerd-Kastelein e colaboradores (1972) fizeram uso da técnica de fusão nuclear para estabelecer os ensaios de complementação que culminariam na caracterização de sete genes que codificam para proteínas da via NER, e que estão mutados em pacientes XP. Por fim, nos anos 80, dois pesquisadores independentemente cunharam o termo Reparo por Excisão de Base (BER) diferenciando essa via da via NER (Hayakawa & Sekigushi, 1979; Lindahl 1979).

1.5 Reparo por Excisão de Base (BER)

A via de reparo por excisão de base constitui a principal via de vigilância do genoma, uma vez que as lesões reparadas por essa via são as que mais comumente acometem o DNA. A prova desse conceito é demonstrada experimentalmente em camundongos *knockout* de genes que codificam para algumas proteínas da via BER (Maynard et al., 2009). Com exceção às DNA glicosilases, que participam da primeira etapa da via, a ausência de qualquer uma das

proteínas da via BER resulta em letalidade embrionária (Xanthoudakis et al., 1996; Tebbs et al., 1999; Sugo et al., 2000; Puebla-Osorio et al., 2006). A via BER é ubíqua e altamente conservada desde bactérias até humanos, onde atua tanto no genoma nuclear quanto no genoma mitocondrial (Rao, 2007; Zharkov, 2008). Até mesmo o bacteriófago T4 possui um gene que codifica para uma das enzimas que participam da via BER. É uma via molecularmente muito simples, consistindo de cinco reações sequenciais, e pode ser reconstituída *in vitro* utilizando-se apenas quatro enzimas (Dianov & Lindahl, 1994).

1.5.1 BER de Fragmento Curto (SP-BER)

Detalhadamente, a via se inicia com o reconhecimento da modificação química na base nitrogenada do DNA por uma classe de enzimas denominadas DNA glicosilases. Uma característica catalítica comum das enzimas pertencentes a esta classe é o mecanismo de *flipping-out*, que consiste no reposicionamento da base nitrogenada do interior da dupla hélice para fora, no bolsão catalítico da enzima (Fromme, Banerjee & Verdine, 2004). No caso da modificação na nucleobase fazer contatos com aminoácidos críticos no sítio catalítico, segue-se então a clivagem ([1] da Fig. 4) da ligação *N*-β-glicosídica entre a base e o açúcar, resultando em um sítio apurínico/apirimídico (AP ou sítio abásico). Essa estrutura é, subsequentemente, alvo de clivagem hidrolítica pela ação da enzima AP endonuclease (APE1) a montante do sítio AP (i.e. na extremidade 5′) ([2] da Fig. 4). Isso gera um terminal 3′-OH livre e um 2′-desoxirribo-5′-fosfato (5′-dRP) no outro terminal. Em seguida, a DNA polimerase β (Pol β), no núcleo (Wiebauer & Jiricny, 1990; Dianov et al., 1992; Singhal et al., 1995), ou a DNA polimerase γ, na mitocôndria (Longley et al., 1998), remove a 5′-dRP e adiciona um nucleotídeo complementar ao da fita oposta ao terminal 3′-OH compatível com a síntese de DNA. Por fim, a descontinuidade da fita danificada é resolvida pela ação da DNA ligase 3 (LIG3) em complexo da proteína XRCC1 (*X-ray Chinese hamster complementation group 1*) ([3] da Fig. 4) (Weissman et al., 2007).

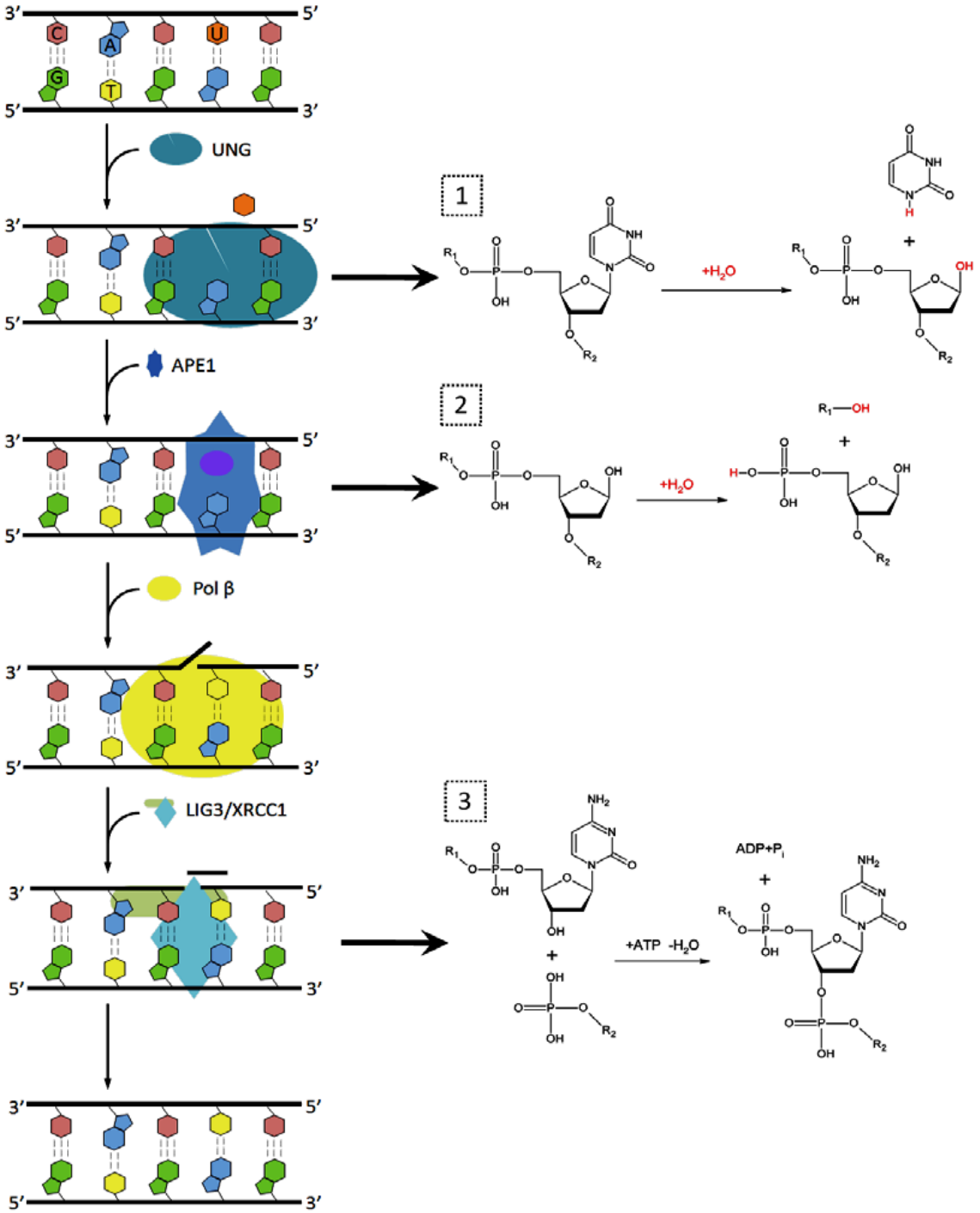


Figura 4 – Reparo por excisão de base de fragmento curto (SP-BER). Uma Ura, produto de deaminação da Cyt, pareada com Gua é alvo da DNA glicosilase UNG. [1] Clivagem hidrolítica da ligação *N*-β-glicosídica entre a base nitrogenada e a 2′-desoxirribose. [2] APE1 reconhece e executa a clivagem hidrolítica do sítio AP formado após a retirada da nucleobase. Pol β remove dRP e insere um novo nucleotídeo a partir do terminal 3′-OH livre a montante da lesão. O complexo XRCC1/LIG3 sela as pontas 3′-OH e 5′-PO_4^{2-} consumindo um ATP. *Fonte: Romagna, Mori e Souza-Pinto. Lesões oxidativas em DNA: detecção, formação, reparo e envolvimento em carcinogênese. In. Tratado de Oncologia Médica, Paulo Marcelo Gehm Hoff (Ed.). São Paulo: Editora. Atheneu, 2014.*

1.5.2 BER de Fragmento Longo (LP-BER)

A via BER, conforme foi descrita acima, é denominada de subvia de fragmento curto (SP-BER, do inglês *short patch*), em referência ao fato de que apenas um novo nucleotídeo é incorporado durante o processo de reparo (Dianov et al., 1992). Em contrapartida, existe outra subvia de BER, a de fragmento longo (LP-BER, do inglês *long patch*) (Klungland & Lindahl, 1997). Há três diferenças fundamentais na subvia LP-BER (Fig. 5). A primeira reside no tamanho do fragmento de DNA sintetizado durante o reparo, onde são incorporados de 2-11 nucleotídeos, pela Pol β, podendo essa DNA polimerase ser substituída pelas DNA polimerases replicativas, Pol δ e ε, com o auxílio das proteínas RPA (*replication protein A*) e PCNA (*proliferation activated nuclear antigen*) (DeMott et al., 1998). A segunda diferença se refere ao processamento da fita de DNA deslocada com a síntese do trecho mais longo que acaba se apresentando na forma de uma alça de DNA fita simples (ssDNA). Essa estrutura é incompatível com a atividade de dRP liase das DNA polimerases, sendo necessária à resolução a ação da endonuclease estrutura-específica FEN1 (*Flap endonuclease 1*). Por fim, a DNA ligase 1 (LIG1) é recrutada nessa subvia e catalisa a ligação das pontas estimulada especialmente por PCNA (Levin et al., 2000).

Existem duas classes de DNA glicosilases: i) as monofuncionais, que executam apenas a função de DNA glicosilases; ii) as bifuncionais, que apresentam uma atividade de AP liase associada. Em células humanas, as DNA glicosilases monofuncionais são: UNG (*uracil-DNA glycosylase*), MPG (*N-methylpurine-DNA glycosylase* ou *alkyladenine DNA glycosylase*), SMUG1 (*single-strand-selective monofunctional uracil-DNA glycosylase 1*), TDG (*thymine-DNA glycosylase*), MDB4 (*methyl-CpG binding domain protein 4*) e MUTYH (*mutY homolog*). Entre as DNA glicosilases bifuncionais temos: NTH1 [*nth endonuclease III-like 1 (E. coli)*], OGG1 (*8-oxoguanine DNA glycosylase*) e três DNA glicosilases da família da endonuclease VIII de *E. coli*, NEIL1, 2 e 3 (*nei endonuclease VIII-like 1, 2 e 3*).

As duas classes de DNA glicosilases efetuam a catálise através do ataque nucleofílico no carbono-1' do açúcar (Fromme, Banerjee & Verdine, 2004). Enquanto nas DNA glicosilases monofuncionais uma molécula de água ativada por um aspartato é utilizada para a catálise, nas bifuncionais o mesmo princípio catalítico via aspartato ativa um resíduo de lisina, que forma uma base de Schiff intermediária (Dodson et al., 2002). Além disso, nas DNA glicosilases bifuncionais, a atividade de AP liase resulta em uma quebra de fita via β-eliminação gerando um aldeído 3'-α,β-insaturado (NTH1 e OGG1) ou via β,δ-eliminação produzindo um terminal

3’-fosfato (família *nei endonuclease VIII-like*). Essas duas estruturas são refratárias à atividade de dRP liase das DNA polimerase, sendo necessário o processamento subsequente para a etapa síntese. O terminal de aldeído 3’-α,β-insaturado é removido pela APE1. Por sua vez, o terminal 3’-fosfato (3’-PO_4^{2-}) é processado pela PNKP1 (*polynucleotide kinase/phosphatase protein 1*).

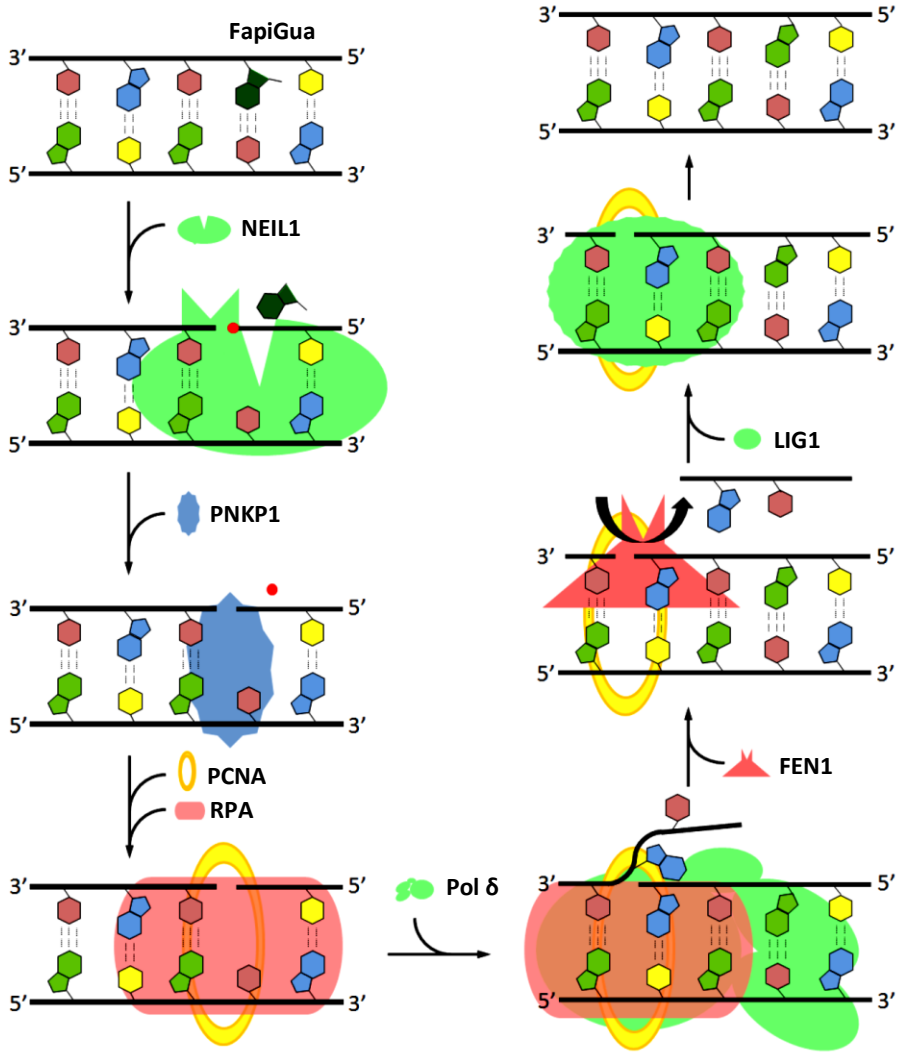


Figura 5 – Reparo por excisão de base de fragmento longo (LP-BER). Uma 2,6-diamino-4-hidroxi-5-formamidopirimidina (FapiGua), produto de oxidação da gunaina, é alvo da DNA glicosilase NEIL1. Essa DNA glicosilase bifuncional, remove a base modificada e cliva a fita de DNA por meio da sua atividade de AP liase. O terminal gerado 3′-PO_4^{2-} é refratário à atividade de Pol β e PNKP é recrutado para remoção dessa estrutura. PCNA e RPA recrutam Pol δ, uma DNA polimerase mais processiva. A síntese de DNA por Pol δ desloca a fita a jusante formando uma estrutura em forma de alça que é removida por FEN1. Por fim, LIG1 sela as pontas 3′-OH e 5′-PO_4^{2-} consumindo um ATP. *Fonte: Romagna, Mori e Souza-Pinto. Lesões oxidativas em DNA: detecção, formação, reparo e envolvimento em carcinogênese. In. Tratado de Oncologia Médica, Paulo Marcelo Gehm Hoff (Ed.). São Paulo: Editora. Atheneu, 2014.*

A abstração de hidrogênio da 2′-desoxirribose do DNA, particularmente pelo radical hidroxila, em geral, resulta na quebra de fita com extremidades que necessitam ser processadas antes que a descontinuidade na fita seja resolvida. Porque a via central de BER apresenta uma etapa onde é gerada uma quebra de fita, o reparo de quebra de fita simples (SSBR, do inglês *single strand break repair*) procede pela mesma via molecular, e é considerado como uma subvia de BER. De fato, os intermediários de BER, como sítios AP e quebra de fita simples são altamente citotóxicos e isso é demonstrado pelo fato de que em camundongos, a perda (via gene *knockout*) de APE1, XRCC1, Pol β e LIG3 é incompatível com a vida (Xanthoudakis et al., 1996; Tebbs et al., 1999; Sugo et al., 2000; Puebla-Osorio et al., 2006).

Conforme supramencionado, extremidade contendo 3′-PO_4^{2-}, 3′-fosfoglicolato e 5′-aldeído são refratárias ao processamento por Pol β. O reparo da primeira já fora explicado acima. Por sua vez, o reparo de 3′-fosfoglicolato parece depender da proteína APE1 e de TDP1 (*tyrosyl-DNA phosphodiesterase 1*) (Parsons et al., 2004 e Inamdar et al., 2002). Essa última proteína também participa do reparo de ligação cruzada entre a proteína topoisomerase I e o DNA, e se encontra mutada em pacientes com ataxia espinocerebelar com neuropatia axonal (SCAN1) (Takashima et al., 2002). Por último, o terminal 5′-aldeído geralmente é deslocado pela ação da Pol β, ao invés de ser processado, seguindo a via de LP-BER auxiliada por FEN1 (Jung et al., 2011).

Ainda na via BER, a proteína PARP [*poly (ADP-ribose) polymerase*] é um dos principais componentes a exercer um papel fundamental para regulação *in vivo* de reparo de DNA. PARP catalisa a polimerização de poli(ADP-ribose) (PAR) a partir de NAD^+ (Chambon et al., 1963; Sugimura, 1973), tendo sua atividade especialmente – mas, não exclusivamente – estimulada na presença de quebra de fita simples (SSB) de DNA (Gradwohl et al., 1990). PARP1 possui arquitetura estrutural de “colar de contas” formada por múltiplos domínios: i) um domínio N-terminal de ligação ao DNA contendo três domínios *zinc-finger*; ii) um domínio de automodificação que é PARilado [poli(ADP-ribosil)ado] pela própria enzima; iii) e um domínio catalítico (Langelier & Pascal, 2013; Li & Yu, 2014). Essa característica modular explica a dualidade funcional que PARP1 apresenta em SSBR; se por um lado a proteína é capaz de inibir SSBR na ausência de NAD^+, devido à sua ligação em SSB de DNA, por outro ela é capaz de estimular o reparo na presença de NAD^+ após auto-poli(ADP-ribosil)ação *in vitro* (Satoh & Lindahl, 1992).

Várias proteínas da via BER, particularmente as que participam ativamente na etapa de reparo de SSB, interagem com PAR tanto *in vitro* quanto *in vivo*. XRCC1 interage fortemente

com PAR *in vitro* e co-localiza com PAR *in vivo* logo após a indução da SSB (Pleschke et al., 2000; Okano et al., 2003; El-Khamisy et al., 2003). O rápido acúmulo de PAR após a indução de SSB, período de 2 min, e sua rápida degradação, no curto período de 10 min, estão de acordo com a proposta de funções regulatória e sinalizadora de PARP1 (Jacobson et al., 1983; Alvarez-Gonzalez et al., 1989). Outras proteínas que interagem com PAR e são fundamentais no reparo de diferentes tipos de SSB são PNKP e APTX (*aprataxin*) – a última é uma enzima que remove AMP ligado ao DNA devido a reações abortivas de DNA ligase (diadenosina polifosfato hidrolase) (Harris et al., 2009; Li et al., 2013). A etapa final em SSBR catalisada por LIG3 também é estimulada por PAR ou PARP1 poli(ADP-ribosil)ado (Leppard et al., 2003). Fica evidente que PARP tem um papel fundamental na regulação fina das etapas da via BER que requer o recrutamento temporal e especial coordenado dos diversos componentes a fim de se evitar um acúmulo de intermediários tóxicos de reparo.

1.5.3 BER Mitocondrial (mtBER)

A via BER foi a primeira via de reparo de DNA identificada em mitocôndrias de células de mamífero (Anderson & Friedberg, 1980). No contexto da etapa de reconhecimento de BER, todas as DNA glicosilases localizadas no núcleo, exceto SMUG1, TDG e MBD4, foram também identificadas em mitocôndrias (Akbari et al., 2007). Porém, algumas DNA glicosilases mitocondriais podem existir em isoformas distintas das nucleares. Esse é o caso de UDG, cujas isoformas mitocondrial, UNG1, e nuclear, UNG2, diferem quanto ao sítio de iniciação de transcrição (Nilsen et al., 1997). Em células humanas também foram identificadas duas isoformas de OGG1, OGG1α e OGG1β (Nishioka et al., 1999; Takao et al., 1998). Apesar de OGG1α possuir uma sequência peptídica C-terminal que sinaliza fortemente para localização nuclear, essa isoforma pode ser encontrada tanto em núcleo quanto em mitocôndria – contudo, em menor concentração na última. Já OGG1β é exclusivamente mitocondrial e, apesar de apresentar o sítio catalítico conservado com a isoforma α, não apresenta atividade de DNA glicosilase *in vitro* (Hashigushi et al., 2004). MUTYH, por sua vez, possui 10 isoformas geradas por meio de *splicing* alternativo dos três transcritos principais: α, β e γ. Supõe-se que a isoforma mitocondrial seja originada do transcrito α1 e as isoformas nucleares dos transcritos β1, β3 ou γ2. Igualmente, MPG possui três isoformas transcricionais: A, B e C, das quais ao menos duas (A e B) apresentam sequência peptídica sinalizadora de localização mitocondrial putativa (Van Loon & Samson, 2013). Quanto às DNA glicosilases, NTH1, NEIL1 e NEIL2, foram

demonstradas a localização mitocondrial e a atividade dessas enzimas em extratos mitocôndrias, no entanto as isoformas mitocondriais ainda não foram devidamente caracterizadas (Takao et al., 1998; Hu et al., 2005; Mandal et al., 2012).

Ambas as vias SP- e LP-BER ocorrem em mitocôndria (Stierum et al., 1999; Liu et al., 2008). A etapa subsequente de BER é igualmente catalisada por APE1 tanto no núcleo quanto na mitocôndria (Tell et al., 2005). Outras enzimas que atuam no núcleo a fim de metabolizar terminais 3'ou 5' refratários à atividade da DNA polimerase e AP endonuclease também estão presentes na mitocôndria, como PNKP1 e TDP1 (Mandal et al., 2012; Das et al., 2010). Para a atividade de dRP liase e polimerase de DNA o mtBER depende exclusivamente da Pol γ, a única DNA polimerase mitocondrial que atua tanto em SP-BER quanto em LP-BER. Por fim, a etapa de ligação dos terminais 3′-OH do nucleotídeo incorporado e 5′-PO_4^{2-} do nucleotídeo a jusante é efetuada pela LIG3, sem o auxílio da proteína XRCC1 (Lakshmipathy & Campbell, 2000), uma vez que esta não foi localizada em mitocôndrias de mamíferos até o momento.

1.6 Reparo por Excisão de Nucleotídeos (NER)

A via de reparo de DNA por excisão de nucleotídeos é reconhecidamente a que apresenta maior plasticidade de substrato (Schärer, 2013). Isso se deve, em grande parte, ao mecanismo molecular de reconhecimento das lesões no DNA, que se baseia principalmente no reconhecimento da distorção na estrutura da dupla hélice introduzida por modificações nas bases e na fita. A lista de lesões de DNA que servem de substrato para a via NER é quimicamente diversa e não-relacionada, como: i) produtos induzidos por UV (CPD e 6-4PP); ii) adutos formados a partir de produtos da ativação de hidrocarboneto aromáticos policíclicos; iii) alguns tipos de lesões geradas oxidativamente, como ciclopurinas; e iv) adutos formados por agentes quimioterápicos, como cisplatina (Gillet & Schärer, 2006).

Didaticamente, a via pode ser entendida em quatro etapas: i) reconhecimento da lesão, ii) abertura da dupla hélice e verificação da lesão, iii) montagem do complexo de pré-incisão e iv) incisão dupla e síntese de reparo. Não obstante a via NER ser didaticamente simples, a reconstituição *in vitro* dessa reação requer entre 25 e 30 polipeptídeos (Aboussekhra et al., 1995; Araújo et al., 2000). Mecanisticamente, a via é dividida em duas subvias, conforme o mecanismo de reconhecimento da lesão: i) a subvia de reparo acoplado à transcrição (TC-NER) que repara preferencialmente lesões presentes na fita molde de genes transcritos ativamente,

resultando em uma maior rapidez no reparo; e ii) a subvia de reparo global do genoma (GG-NER), que remove lesões presentes em qualquer local do genoma. Essas subvias divergem apenas quanto à etapa de reconhecimento das lesões, convergindo para eventos comuns a partir desta. Abaixo, apresentamos as duas subvias quanto à etapa de reconhecimento.

1.6.1 Reparo Acoplado à Transcrição (TC-NER)

Quando uma RNA polimerase I ou II (RNA Pol) encontra uma lesão na fita molde do DNA de modo que bloqueie a progressão da transcrição, um dos possíveis destinos moleculares é o reparo acoplado à transcrição. A proteína CSB (*Cockayne syndrome complementation group B*) é a primeira a responder a RNA Pol parada na lesão. Pouco se sabe, porém, como CSB é capaz de reconhecer a RNA Pol (Lagerwerf et al., 2011; Edenberg et al., 2014). Sabe-se que essa proteína não possui o papel molecular de reconhecer o dano no DNA em si. É mais provável que CSB participe do mecanismo molecular que é capaz de identificar uma RNA Pol bloqueada durante o alongamento (*elongation*) da transcrição. Corroborando essa hipótese, CSB se associa transientemente com o complexo ternário RNA Pol-DNA-mRNA (van Gool et al., 1997, Tantin et al., 1997) e é capaz de estimular o alongamento de RNA Pol *in vitro* (Selby & Sancar, 1997). Dessa forma, os dados sugerem que a parada no alongamento de RNA Pol permite uma associação mais estável de CSB com o complexo de transcrição (van den Boom et al., 2004). Resultados recentes sugerem que tanto CSA (*Cockayne syndrome complementation group A*) quanto CSB também participam da regulação de TC-NER por ubiquitinação, que é molecularmente mais associado com sinalização do que com reconhecimento de lesão (Nardo et al., 2009; Menoni et al., 2012). CSA possui cinco WD-40 *repeats* e forma um complexo E3 ubiquitina ligase que contém CUL4A (*Cullin 4A*), ROC1 (*regulator of cullins 1*), DDB1 (*damage-specific DNA binding protein 1*) e COP9 sinalossomo (Groissman et al., 2003). CSA possui atividade de E3 ubiquitina ligase e ubiquitina CSB no domínio de ligação à ubiquitina (UBD) (Anindya et al., 2010). Apesar do domínio UBD não ser essencial para o recrutamento sequencial dos fatores de NER, a ubiquitinação de CSB é essencial para TC-NER, uma vez que uma CSB quimérica contendo um domínio não-relacionado de ligação à ubiquitina (UBA de RAD23) é capaz de recuperar os defeitos moleculares em células CS-B (Anindya et al., 2010).

1.6.2 Reparo Global do Genoma (GG-NER)

Quando um dano que distorce a dupla hélice ocorre em regiões não-transcritas do genoma ou na fita complementar à fita codificadora do gene, o reparo de DNA segue pela via GG-NER. Dois complexos proteicos participam diretamente da etapa de reconhecimento de dano: i) UV-DDB, um heterodímero formado por DDB1 e DDB2; e ii) o heterotrímero XPC-RAD23B-centrin2.

Apesar de ter sido inicialmente sugerido que XPA era a primeira proteína a se associar a lesão na via NER (Evans et al., 1997; Wakasugi & Sancar, 1998 e 1999), foi demonstrado *in vitro* que o complexo XPC-RAD23B é o primeiro componente da via a se associar ao sítio contendo a modificação (Sugasawa et al., 1998; Volker et al., 2001). A proteína XPC é a responsável pelo reconhecimento da lesão de DNA no heterotrímero. O mecanismo pelo qual XPC discrimina regiões contendo lesões no DNA de regiões não lesionadas foi elucidado através da análise estrutural de RAD4, o homólogo de XPC em *Saccharomyces cerevisiae*. Os resultados sugerem que a proteína não interage fisicamente com a lesão de DNA; ao invés disso, o mecanismo utilizado baseia-se em flutuações termodinâmicas que ocorrem devido ao enfraquecimento das ligações de hidrogênio quando o pareamento canônico está comprometido pela presença da lesão, e que são reconhecidos pela proteína. De fato, XPC também se liga de forma inespecifica em DNA com considerável afinidade. Porém, se liga com mais afinidade em DNA contendo modificações que afetam a estabilidade das ligações de hidrogênio (Min & Pavletich, 2007). Uma vez encontrado esse tipo de dano, XPC insere dois domínios β-hairpin (BHD2/BHD3) rodeando dois nucleotídeos na fita oposta ao dano. Em outras palavras, XPC sempre interage com a fita não-danificada. É exatamente essa característica que promove XPC como um fator de reconhecimento de dano no DNA com alta versatilidade e flexibilidade (Schärer, 2007).

Por sua vez, apesar do complexo UV-DDB ter sido dispensável na reconstituição de NER *in vitro* (Aboussekhra et al., 1995; Araujo et al., 2000) a sua presença em células diminui consideravelmente o tempo de reparo de CPDs e 6-4PPs, demonstrando sua importância na cinética de GG-NER (Wakasugi et al., 2001). Inclusive, UV-DDB possui alta afinidade a esse tipo de lesão, especialmente em relação a 6-4PP (Reardon et al., 1993). Apesar disso, células deficientes em DDB2 – derivadas de pacientes XP do grupo de complementação E (XP-E) – apresentam taxas normais de reparo 6-4PPs, contudo, é observado uma diminuição severa no reparo de CPDs (Hwang et al., 1999; Tang et al., 2000). Isso se deve, provavelmente, ao fato

de que XPC inicia o reparo de 6-4PPs, atuando como um sistema de backup. No entanto, XPC se liga mais fracamente a CPDs, o que explica a importância de DDB2 para o reparo dessas lesões em específico e o fenótipo de pacientes XP-E.

Abertura da dupla hélice e verificação da lesão

Após o reconhecimento da lesão, TFIIH (*transcription factor II Human*) é recrutado para o local da lesão. Esse complexo multiproteico, que é um fator de transcrição canônico e também um componente essencial da via NER, é composto por 10 subunidades: i) um cerne contendo XPB, p52, p8, p62, p34, p44; ii) um complexo CAK (*cyclin-activated kinase*) contendo CDK7, cyclin H e MAT1; e iii) a proteína XPD que faz uma ponte entre o cerne e o complexo CAK (Compe & Egly, 2012). Ambas proteínas XPB e XPD são DNA helicases dependentes de ATP, que desenrolam a dupla fita em polaridades opostas. Porém, a atividade ATPase de XPB, e não de helicase, parece ser mais relevante para a montagem de TFIIH na lesão (Coin et al., 2007; Oksenych et al., 2009). Por sua vez, a atividade de DNA helicase 5'–3' de XPD é essencial para o correto funcionamento do reparo. Por outro lado, a análise estrutural de um homólogo de XPD de Archea revelou que, conforme a proteína desenrola a fita de DNA, um domínio estrutural na forma de arco envolve a fita simples contendo a lesão formando um túnel pelo qual a fita transloca. Essa característica faz com que XPD seja uma candidata a fator de verificação de dano, uma vez que o túnel é estreito o bastante para não permitir que lesões volumosas passem por ele, impedindo a progressão da helicase (Fan et al., 2008; Sugasawa et al., 2009).

Montagem do complexo de pré-incisão

Após o recrutamento de TFIIH e a verificação do dano mediado por XPD, ocorre a montagem do complexo de pré-incisão, com a ligação de XPA, RPA e XPG, e o desligamento de XPC-RAD23B. XPA é um componente central da via, interagindo com várias proteínas de NER, como subunidades do complexo TFIIH, RPA, XPC-RAD23B, DDB2, ERCC1-XPF e PCNA. Acredita-se que XPA também participa da etapa de verificação de danos, uma vez que a proteína possui alta afinidade por torções em ssDNA (Camenisch et al., 2006). XPA se liga na extremidade 5' da fita lesionada, próxima a XPD (do lado oposto a XPB). O heterotrímero RPA se liga então na fita não lesionada, cobrindo aproximadamente 30 nucleotídeos, deslocando XPC que deixa o complexo de reparo (Fig. 6). Além disso, RPA auxilia o correto posicionamento das duas endonucleases, XPG e ERCC1-XPF, que irão retirar o

oligonucleotídeo contendo a lesão (de Laat et al., 1998). A endonuclease XPG também é essencial para a montagem de complexo de pré-incisão, e seu papel inicial é estrutural, permitindo a montagem correta do complexo de incisão, uma vez que mutações que comprometem a atividade catalítica de XPG não afetam o correto recrutamento do complexo (Wakasugi et al., 1997; Constantinou et al., 1999).

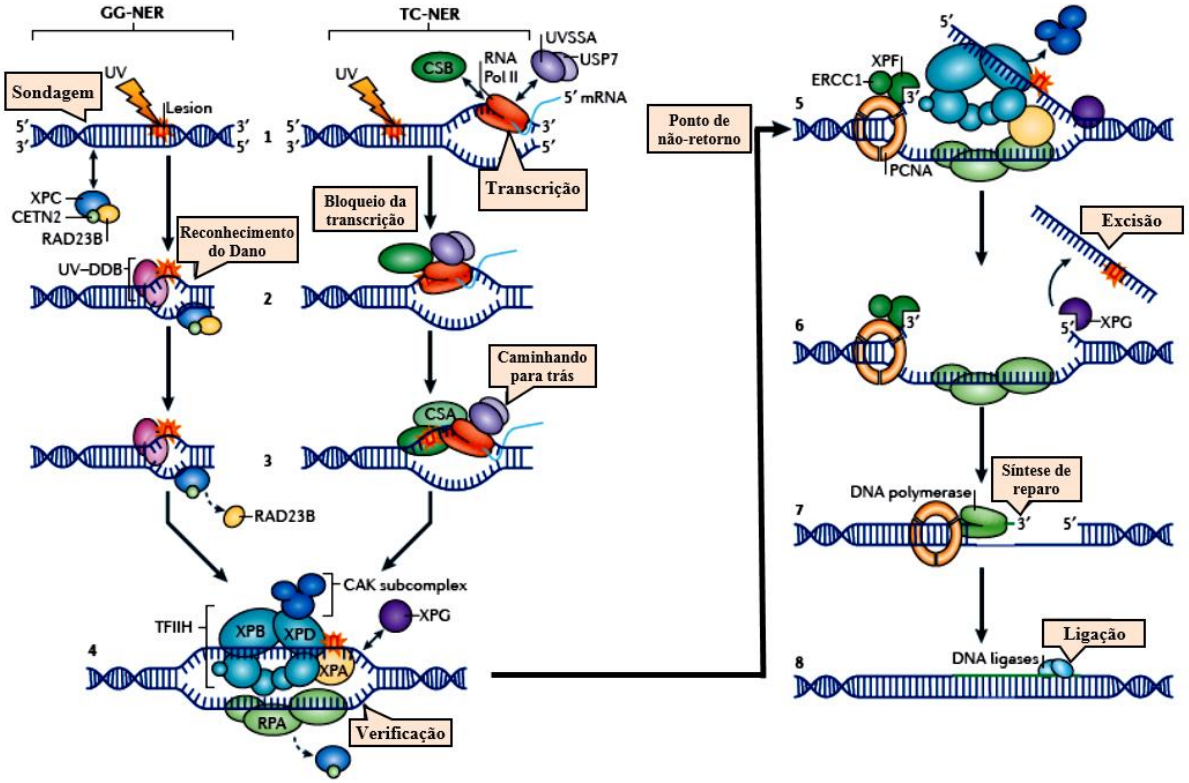


Figura 6 – Reparo por excisão de nucleotídeos (NER). GG-NER) À esquerda, na subvia de reparo global do genoma, a proteína XPC, em complexo com RAD23B e centrin 2 (CETN2), sonda o DNA a fim de encontrar lesões que distorcem a dupla hélice (etapa 1), que são reconhecidas com o auxílio do complexo UV-DDB (etapa 2). Após a ligação do complexo XPC, RAD23B se dissocia do complexo (etapa 3). **TC-NER)** À direita, na subvia de reparo acoplado à transcrição, o dano é indiretamente reconhecido durante o alongamento do transcrito pela parada da RNA Pol II na lesão. Durante o alongamento da transcrição, as proteínas UVSSA (*UV-stimulated scaffold protein A*), USP7 (*ubiquitin-specific-processing protease 7*) e CSB interagem transientemente com RNA Pol II (etapa 1). Após a parada na lesão, a afinidade de CSB por RNA Pol II aumenta (etapa 2) e o complexo CSA-CSB é formado, o que provavelmente resulta na translocação reversa (caminhando para trás) da RNA Pol II (etapa 3) tornando a lesão no DNA acessível para o reparo. Após o reconhecimento do dano, o complexo TFIIH é recrutado para a lesão em ambos GG-NER e TC-NER (etapa 4). XPG pode se associar a TFIIH ou se ligar ao complexo de incisão separadamente (etapa 4). Após a ligação de TFIIH, o subcomplexo CAK se dissocia do cerne do complexo TFIIH. A atividade de helicase de TFIIH abre a dupla hélice ao redor da lesão, e o desenovelamento 5′→3′ do DNA por XPD verifica a existência da lesão com o auxílio da atividade de ATPase de XPB e XPA, que se liga em nucleotídeos quimicamente modificados em DNA fita simples (etapa 4). Nessa etapa, a proteína RPA também é recrutada e cobre a fita não-danificada. XPA recruta o heterodímero XPF-ERCC1 que é direcionado à fita danificada por RPA criando uma incisão a montante (5′) da lesão (etapa 5). Uma vez atingido esse 'ponto de não-retorno', XPG é ativado e corta a fita danificada a jusante (3′) da lesão, que excisa a lesão dentro de uma fita de 22-30 nucleotídeos de tamanho (etapa 6). PCNA que é recrutado após a incisão 5′ feita por XPF-ERCC1, recruta DNA Pol δ, ε ou κ para a síntese de reparo (etapa 7). A reação de NER é completada pela junção do corte remanescente por DNA ligase 1 ou 3 (etapa 8). *Fonte: Marteijn, J. A; Lans, H.; Vermeulen, W.; Hoeijmakers, J. H. J. Understanding nucleotide excision repair and its roles in cancer and ageing. Nat Rev Mol Cell Biol, v. 15, p. 467.*

Dupla incisão e síntese de reparo

A incisão do oligonucleotídeo contendo a lesão não ocorre até a chegada de ERCC1-XPF. De fato, apesar de XPG se associar ao complexo de pré-incisão antes, e ser necessário para o recrutamento de ERCC1-XPF, é a segunda que realiza a primeira incisão na fita

danificada. A clivagem na direção 3′ em relação ao oligonucleotídeo danificado gera um terminal 3′-OH livre que pode ser usado para a subsequente síntese de reparo. Em seguida, XPG cliva a extremidade 5′ a uma distância de 22-30 nucleotídeos da primeira incisão (Marteijn e Lans et al., 2014). O oligonucleotídeo é liberado associado ao TFIIH, e as proteínas do complexo de incisão se dissociam do sítio de reparo. Por fim, para a etapa de síntese, são necessários fatores canônicos de replicação como Pol δ, ε ou κ, PCNA, RFC, RPA e DNA ligase (Shivji et al., 1995; Araujo et al., 2000). De modo geral, RFC e PCNA são necessárias para o recrutamento da DNA polimerase. Porém, conforme o estado proliferativo da célula, diferentes formas de RFC recrutam DNA polimerases distintas. Pol ε é recrutada principalmente em células replicativas e, aparentemente, uma forma alternativa de RFC contendo Ctf18 [*chromosome transmission fidelity factor 18 homolog (S. cerevisiae)*] promove essa especificidade. Por sua vez, Pol δ e κ participam de NER em células não-proliferativas. Finda a síntese, o mesmo se aplica para o recrutamento de DNA ligases, onde LIG1 é preferencialmente recrutada em células replicativas enquanto XRCC1-LIG3 sela o corte remanescente da fita de DNA em células não-replicativas (Moser et al., 2007; Schärer, 2013).

1.7 Xeroderma Pigmentoso Grupo de Complementação C (XPC)

Grande parte do esforço para o esclarecimento dos mecanismos que regem a via NER originou-se do estudo de células de pacientes XP. Conforme mencionado no item 1.3, Cleaver propôs que essa doença tivesse relação com defeitos no reparo de lesões UV, conforme ficou demonstrado experimentalmente. Graças aos experimentos de fusão celular aplicado em células de pacientes XP, conhecemos hoje os oito grupos de complementação: XP-A a XP-G, que apresentam defeitos em genes que codificam proteínas da via NER e XP variante (XP-V), cujo defeito molecular é no gene *POLH* que codifica para uma DNA polimerase translesão, Pol η (Cleaver et al., 2009).

1.7.1 Sintomas de Pacientes XP-C e do Modelo Murino

XP é uma doença hereditária autossômica recessiva caracterizada, principalmente, por uma suscetibilidade de 1.000 até 10.000 vezes maior no desenvolvimento de neoplasias em áreas expostas a UV, fotossensibilidade, ceratose actínica (escamação e endurecimento da pele

lesionada) e, em alguns grupos de complementação, degeneração neurológica progressiva (DiGiovanna & Kraemer, 2012).

Algo que tem intrigado os cientistas nas últimas duas décadas é a diversidade fenotípica de desordens de NER. Além de XP, há pelo menos outras três síndromes hereditárias bem definidas e distintas, cujos fenótipos moleculares incluem defeitos em NER: síndrome de Cockayne (CS), tricotiodistrofia (TTD) e síndrome de sensibilidade a UV (UV_SS) (Cleaver et al., 2009). Não bastasse os diferentes sintomas entre essas doenças genéticas, dependendo ainda da natureza da mutação, i.e. *missense* ou *nonsense*, alguns pacientes podem manifestar espectros mais severos de uma dessas doenças ou até a combinação de duas. A figura 7 organiza esquematicamente os genes mutados e as manifestações clínicas possíveis. Por exemplo, XP sem manifestações neurológicas ocorre nos oito grupos de complementação XP (XP-A a XP-V), porém, mutações em *XPC*, *DDB2* (XPE) e *POLH* (XPV), independentemente do tipo de mutação, dão origem somente ao fenótipo XP. Alguns pacientes que apresentam mutações em *ERCC3* (XPB), *ERCC2* (XPD) e *ERCC5* (XPG) apresentam sintomas combinados de ambos XP e CS, e são classificados como XP/CS. Mutações em *ERCC2* (XPD) podem dar origem a até oito manifestações clínicas distintas. Já algumas mutações em proteínas que participam do complexo transcricional canônico TFIIH, como XPB, XPD e TTDA, dão origem a TTD, uma doença em que o fenótipo está mais intimamente relacionado a defeitos transcricionais. Mutações distintas em *ERCC8* (CSA) e *ERCC6* (CSB), por sua vez, podem levar ao desenvolvimento de CS, uma doença com fenótipo severo de neurodegeneração, caquexia e envelhecimento precoce relacionado à disfunção mitocondrial, ou UV_SS, uma síndrome de sensibilidade moderada a irradiação UV. Como se pode observar (Fig. 7), a intrincada rede de interações moleculares e as múltiplas funções dessas proteínas, muito além da via NER, aumentam a gama de consequências celulares e sistêmicas advindas de mutações nesses genes (Cleaver et al., 2009; DiGiovanna & Kraemer, 2012; Marteijn e Lans et al., 2014).

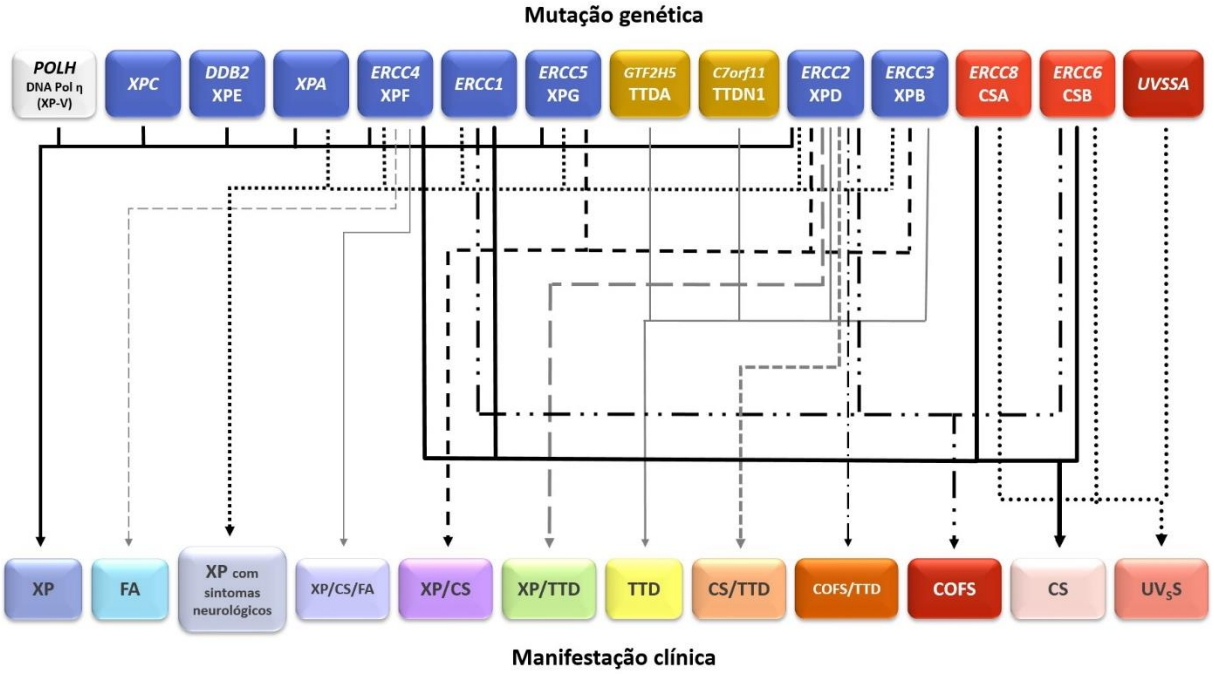


Figura 7 – Mutações em genes de NER e manifestações clínicas. Um total de 13 genes de NER, mais 1 que codifica para a DNA polimerase η (*POLH*), dão origem a 12 manifestações clínicas. As caixas na parte superior representam os genes (nomenclatura oficial em itálico) e as respectivas proteínas codificadas por cada um. As caixas situadas na parte inferior representam as diversas manifestações clínicas reportadas até o presente momento. XP – Xeroderma Pigmentoso, FA – anemia Fanconi, TTD – tricotiodistrofia, COFS – síndrome cérebro-óculo-fácio-esquelética, CS – síndrome de Cockayne, US_SS – síndrome de sensibilidade a UV. Por vezes, o indivíduo pode manifestar a mistura de duas síndromes, como: XP/CS, XP/CS/FA, XP/TTD, CS/TTD e COFS/TTD. Pacientes XP-A com sintomas neurológicos apresentam síndrome de Sanctis-Cacchione. Pacientes FA com mutação em *ERCC4* (Bogliolo et al., 2013). Pacientes CS e XP/CS/FA com mutações em *ERCC1* e *ERCC4*, respectivamente (Kashiyama et al., 2013). *Adaptado de DiGiovanna & Kraemer (2012). J Invest Dermatol, v. 132, p. 790*.

Porém, esse não é o caso da proteína XPC. Pacientes que herdam mutações no gene *XPC* manifestam apenas os sintomas clássicos de XP. Na infância, os pacientes XP-C apresentam queimaduras solares mesmo após pouca exposição solar, característica típica de XP. O sintoma mais comum é a ocorrência de eritema (vermelhidão cutânea) após exposição à luz UV. Porém, esse grupo de pacientes não experimenta sintomas mais severos de queimaduras solares como formação de bolhas. Com o tempo, eles desenvolvem poiquilodermia, que consiste em pigmentação difusa (hiper e hipopigmentação), o surgimento progressivo de telangiectasias (vasodilatação de veias superficiais) e atrofia. O surgimento da primeira neoplasia cutânea ocorre, em média, antes dos 10 anos de idade (DiGiovanna & Kraemer, 2012).

Em nível celular, células derivadas de pacientes XP-C são hipersensíveis a UV. Também, por se tratar de um defeito específico no reconhecimento de danos global no genoma, a TC-NER ocorre normalmente (Venema et al., 1991). Isso é evidente uma vez que células XP-C não apresentam atraso na recuperação de síntese de RNA após irradiação UV, uma característica de células com defeitos em TC-NER (Mayne & Lehmann, 1982). O modelo

murino da doença reproduz fielmente os sintomas dos pacientes humanos (Cheo et al., 1997; Berg et al., 1998). Porém, camundongos *knockout* em *Xpc* apresentam um quadro clínico curioso: um aumento significativo na incidência de tumores pulmonares após o primeiro ano de vida (Hollander et al., 2005; Melis et al., 2008). Isso não é surpreendente, uma vez que pacientes com XP apresentam um aumento de 50 vezes na suscetibilidade ao desenvolvimento de câncer no cérebro e outros órgãos do sistema nervoso central (Kraemer, 1994). Também não é surpreendente a observação de que camundongos *Xpc*$^{-/-}$ tratados com os carcinógenos 2-acetoaminofluoreno ou N-hidroxi-2-acetoaminofluoreno são mais suscetíveis ao desenvolvimento de lesões pré-maligna e malignas no fígado e no pulmão (Cheo et al., 1999), uma vez que lesões causadas por esses agentes são removidas, principalmente pela via NER.

1.7.2 Estrutura da Proteína XPC

O gene *XPC* se localiza no braço curto do cromossomo 3 (3p25.1) [gene ID: 7508] e foi clonado por Legerski & Peterson (1992). O principal transcrito contém 16 éxons e codifica para uma proteína contendo 940 resíduos de aminoácidos com massa predita de 125 kDa que foi purificada pela primeira vez por Masutani et al. (1994). *In vivo* a proteína XPC se apresenta na forma de um heterotrímero associada a RAD23B e centrin 2. A proteína RAD23B, um homólogo de Rad23 de *S. cerevisiae*, interage fortemente com XPC e parece promover a sua estabilidade, uma vez que células *knockout* para ambos *Rad23a* e *Rad23b* apresentam níveis reduzidos da proteína XPC, que é, nessas condições, degradada pelo sistema ubiquitina-proteassomo (Ng et al., 2003). O reflexo dessa forte interação é que RAD23B é essencial para o funcionamento da via GG-NER. Centrin 2, por sua vez, é dispensável para GG-NER tanto *in vitro* como *in vivo*, no entanto, o reparo é substancialmente aumentado com essa interação (Nishi et al., 2005).

Boa parte do conhecimento da estrutura de XPC foi extrapolada da análise de sua homóloga em *S. cerevisiae*, Rad4 (Min & Pavletich, 2007). XPC possui quatro domínios principais: i) um domínio homólogo a transglutaminase (TGD) e ii) três domínios *β-hairpin* (BHD1, -2 e -3). TGD e BHD1 se ligam de forma inespecífica em DNA dupla fita não-modificado, cobrindo 11 nucleotídeos no DNA. A maioria dos contatos realizados por TDG-BHD1 com o DNA – tanto das cadeias laterais dos aminoácidos quanto das ligações peptídicas – tem como alvo grupos fosfodiéster e açúcar nas duas fitas do DNA, o que explica a afinidade de XPC por DNA dupla fita. Os domínios BHD2 e BHD3 são os responsáveis por fazer de XPC

uma proteína de reconhecimento de lesão. Na realidade, os dois domínios não chegam a interagir diretamente com a lesão no DNA. Ao invés disso, BHD2 e BHD3 envolvem a fita não-danificada do DNA e fazem contato com dois nucleotídeos que são forçados a virar para fora (*flipping-out*) devido à inserção de BHD3 na hélice de DNA. O domínio BHD3 é significativamente mais longo que os outros e sua inserção parece depender do enfraquecimento ou do rompimento de ligações de hidrogênio que alteram a força de anelamento local. Inclusive, o segmento BHD3 não é essencial para a função inicial de sensor de dano no DNA, sendo necessário para a formação de um complexo estável DNA-proteína (Maillard et al., 2007). De fato, através da inserção desse domínio na hélice do DNA o esqueleto de açúcar-fosfato é torcido em 42° (*kink*) e a hélice é aberta. Em seguida, dois nucleotídeos são virados para fora da hélice e estabilizados, principalmente, pelo empilhamento das nucleobases com cadeias laterais de fenilalanina de BHD2 e BHD3 (Min & Pavletich, 2007). Esse mecanismo parece corroborar o modelo no qual XPC atua como um sensor inicial e posteriormente estabiliza o "complexo aberto" para o recrutamento sequencial dos componentes de NER.

1.7.3 Interações Proteína-Proteína de XPC

Após a abertura do complexo, o domínio carboxi-terminal de XPC realiza interações cruciais com TFIIH para estabilização do complexo no dano (Uchida et al., 2002). Como mencionado acima, a helicase XPD, um componente de TFIIH, é uma forte candidata a participar da verificação de danos. XPA também pode participar dessa etapa, especialmente devido à sua afinidade de ligação em DNA torcido (Missura et al., 2001; Camenisch et al., 2006). XPC ainda interage com XPA na região amino-terminal (156-325) antes da chegada de XPG no complexo de NER. (XPC deixa o complexo após a chegada de XPG) (Riedl et al., 2003).

1.7.4 Outras Funções de XPC

Proteína auxiliar em outras vias de reparo de DNA: cross-talk entre vias

Quando se pensa em sistemas biológicos, as proteínas de reparo de DNA não agem em suas respectivas vias como agiria um automóvel em uma autoestrada de apenas um sentido. Usando essa analogia, as vias, por vezes, apresentam dois sentidos, são sinalizadas e reguladas,

e estradas vicinais podem permitir o tráfego de proteínas entre duas ou mais vias. De acordo com essa linha de raciocínio não seria inesperado observar interações entre proteínas da via NER e BER.

O primeiro relato na literatura científica de um componente da via NER atuando em BER foi feito por Klungland et al. (1999) demonstrando que XPG é capaz de estimular a atividade de NTH1 *in vitro*. No ano seguinte, Miao et al. (2000) demonstraram que RAD23A e RAD23B estimulam tanto a atividade quanto a capacidade de ligação de MPG em duplex de DNA contendo hipoxantina, uma base nitrogenada formada pela deaminação da Ade.

Porém, foi o estudo conduzido por D'Errico et al. (2006) que demonstrou pela primeira vez consequências biológicas advindas da ausência de uma proteína de NER no reparo de lesões de DNA induzidas oxidativamente, que são classicamente atribuídas a via BER. Para a surpresa dos autores, evidências experimentais indicaram que células de pacientes XP-C são mais sensíveis a danos induzidos por agentes oxidantes, como raios-X e bromato de potássio. Esse aumento na citoxicidade correlacionou bem, não só com o atraso no reparo de ciclopurinas – que é substrato de NER – mas, também, de 8-oxo-7,8-diidroxiguanine (8-oxoGua) – substrato de OGG1 da via BER. Por fim, ficou demonstrado que XPC estimula a atividade de OGG1 tanto em extrato celular de pacientes XP-C quanto em reações com a proteína recombinante isolada. Em outro estudo, Bernardes de Jesus et al. (2008) identificaram qual região da proteína XPC interagia com OGG1. Eles demonstraram que a mutação P334H compromete a capacidade de XPC em estimular a atividade de OGG1. Porque a prolina é um aminoácido cíclico – onde o grupo lateral está ligado tanto ao carbono α quanto ao grupo amino – ela exerce um papel fundamental na estrutura de proteínas, geralmente introduzindo dobras na direção da cadeia polipeptídica. Essa mutação pode ter afetado a estrutura do domínio de XPC que interage com OGG1. Além disso, a região N-terminal é capaz de se ligar a OGG1, mas, aparentemente, é a região C-terminal a responsável por estimular a atividade de OGG1 (Bernardes de Jesus et al., 2008).

XPC também interage com outras duas DNA glicosilases *in vitro*: TDG e SMUG1 (Shimizu et al., 2003; Shimizu et al., 2010). No total, o complexo XPC-RAD23B pode interagir com três DNA glicosilases.

Cofator transcricional

A proteína XPC possui pelo menos mais uma função biológica bem definida além de reparo de DNA. Le May et al. (2010) demonstraram que vários fatores de NER, principalmente

XPC, são recrutados aos promotores de genes após tratamento com seus respectivos ativadores transcricionais. XPC não apenas interage fisicamente com essas regiões promotoras, como também promove a expressão do gene onde está localizado, uma vez que o silenciamento de XPC resulta na diminuição quantitativa do transcrito. Por fim, em um estudo conduzido por Fong et al. (2011), ficou mais claramente demonstrada a participação de XPC como um coativador transcricional. XPC-RAD23B participam ativamente da reprogramação transcricional induzida por Oct4 e Sox2, particularmente na região promotora de *Nanog*. De fato, o sequenciamento profundo após imunoprecipitação da cromatina (ChIP-seq) revelou uma sobreposição de 70% na ocupância de regiões contendo RAD23B em relação àquelas ocupadas por Oct4 e Sox2. A importância funcional do complexo XPC-RAD23B-centrin 2 é demonstrada pela incapacidade de reaquisição de pluripotência durante a reprogramação de células somáticas na ausência do complexo, tornando-se evidente o papel fundamental de XPC na transcrição de alguns genes.

1.8 Instabilidade Genômica, Reparo de DNA e Metabolismo Mitocondrial

Recentemente, Rezvani et al. (2011) relataram um fenômeno de adaptação metabólica em queratinócitos silenciados constitutivamente com shRNA para a proteína XPC. Nesse estudo ficou demonstrado que a ausência de XPC inicialmente leva a parada do ciclo celular através da ativação da ATR (*ataxia-telagiectasia related serine/threonine kinase*) e subsequente fosforilação de CHK1 (*check-point kinase 1*) e Cdc2 (*cyclin-dependent kinase 2*), aumento de proteínas de parada de ciclo celular p16 (*cyclin-dependent kinase inhibitor 2A*) e p21 (*cyclin-dependent kinase inhibitor 1A, p21, Cip1*) e diminuição da proteína de ciclo celular ciclina D2 e E. Por fim, ficou demonstrado em queratinócitos *knockdown* para XPC a ativação da proteína quinase AKT1/PKB (*v-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1*) através da atividade de proteína sensora de danos DNA-PK (*protein kinase, DNA-activated*), uma fosfatidilinositol-3-quinase. Os autores concluíram que na ausência de XPC, DNA-PK torna-se hiperativada aumentando a participação da via NHEJ no reparo de DNA, que acarreta em instabilidade genômica devido à propensão a erro dessa via. Além disso, o eixo DNA-PK/AKT1/NOX1 leva a uma adaptação metabólica com aumento na dependência da via glicolítica sobre a fosforilação oxidativa para geração de ATP (Rezvani et al., 2011).

Mesmo com anos de pesquisa que evidenciam o papel das mutações no desenvolvimento de doenças, em especial, nas neoplasias, não sabemos ainda como essas mutações se acumulam: se através do aumento na taxa de mutação e/ou através do aumento do número de replicações em células cancerosas altamente proliferativas. Não sabemos também, se o acúmulo de mutações acelera o surgimento de câncer ou é um produto colateral do descontrole no crescimento anterior à aquisição do fenótipo mutador (Loeb, Springgate & Battula, 1974; Fox, Prindle & Loeb, 2013; Roberts & Gordenin, 2014).

A descoberta de doenças hereditárias nas quais proteínas de reparo de DNA se encontram disfuncionais tem sido uma ferramenta útil para compreensão do papel das mutações no desenvolvimento de doenças. Em pacientes XP a relação entre mutagênese induzida por UV e o desenvolvimento de neoplasias cutâneas tem sido extensivamente descrita e bem estabelecida (Cleaver & Crowley, 2002). Porém, pouca atenção tem sido dada para o papel do metabolismo mitocondrial e sua contribuição no desenvolvimento de doenças relacionadas a processos mutacionais. Em vista disso, resolvemos investigar o estado metabólico mitocondrial no modelo de instabilidade genômica, linhagens celulares isoladas de pacientes XP-C e do modelo murino da doença.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVOS GERAIS

A literatura tem relatado ao menos três novas funções moleculares de XPC: i) cofator de OGG1 (TDG e SMUG1) na via BER no reparo de lesão oxidadas de DNA; ii) cofator transcricional em elementos responsivos de Oct4/Sox2, RXR e PPARα; e iii) na regulação do metabolismo energético. Devido a esses novos papéis da proteína XPC, propusemo-nos a investigar as relações entre a XPC e a manutenção da integridade do DNA mitocondrial, a sensibilidade celular a estresse redox mitocondrial e as possíveis alterações bioenergéticas e redox decorrentes da ausência dessa proteína sensora de danos no DNA.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Investigar a localização subcelular da proteína XPC e investigar seu possível papel no reparo de lesões oxidadas de DNA.
- Avaliar a sensibilidade ao estresse redox de fibroblasto XP-C humanos e Xpc murino XP-C.
- Investigar o papel funcional da cadeia respiratória na sensibilidade de células XP-C ao estresse redox, através da: i) taxa de consumo de O_2 dos complexos da CTE e em células intactas; ii) produção de $O_2^{\bullet -}$ e H_2O_2; e iii) da atividade das enzimas antioxidantes SOD e GPx.
- Avaliar os danos, número de cópias e frequência de deleção no mtDNA de células XP-C e seu papel na sensibilidade de células XP-C ao estresse redox.
- Procurar genes de biogênese e regulação metabólica mitocondrial diferencialmente expressos na ausência de XP-C e investigar o mecanismo molecular de supressão da expressão de PPARGC1A em células XP-C.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 REAGENTES

Agarose [CASRN] e solução salina tamponada com fosfato (PBS) da LGC Biotecnologia.

Ácido acético 100% [CASRN] da Quimex Produtos Químicos LTDA.

Acetato de amônio [NH_4CH_3COO – CASRN 631-61-8], ácido clorídrico 37% PA (CAS 7647-01-0), KCl [cloreto de potássio – CASRN 7447-40-7], NaCl [cloreto de sódio – CASRN 7647-14-5], etanol [CASRN 64-17-5], fosfato monobásico de potássio [KH_2PO_4 – CASRN 7778-77-0], fosfato monobásico de sódio [NaH_2PO_4 – CASRN 10049-21-5], fosfato dibásico de sódio [Na_2HPO_4 – CASRN 7558-79-4], KOH [hidróxido de potássio – CASRN 1310-58-3], NaOH [hidróxido de sódio – CASRN 1310-73-2], todos da Merck KGaA©.

Etanol [CASRN 64-17-5] e metanol [CASRN 67-56-1] da Synth®.

Acetil-CoA [acetil coenzima A, sal trilítio – CASRN 75520-41-1], acetato de potássio [KCH_3COO – CASRN 127-08-2], digitonina [CASRN 11024-24-1], DPI [cloreto de difeniliodônio – CASRN 1483-72-3], H_2O_2 [solução de peróxido de hidrogênio 30% (v/v) – CASRN 7722-84-1] e MTT [brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazólio – CASRN 298-93-1] todos da Calbiochem®.

Ágar [CASRN 9002-18-0] e β-mercaptoetanol [CASRN 60-24-2] da Fluka®.

Ácido oxalacético [CASRN 328-42-7], agarose de baixo ponto de fusão [CASRN 39346-81-1], albumina [CASRN 9048-46-8], α-cetoglutarato [ácido α-cetoglutárico de disódio diidratado – CASRN 305-72-6], ampicilina (sal de sódio) [CASRN 69-52-3], antimicina A [CASRN 1397-94-0], ascorbato [ácido L-ascórbico – CASRN 50-81-7], 5-aza-dC [5-aza-2′-desoxicitidina – CASRN 2353-33-5], azul de bromofenol [3′,3″,5′,5″-tetrabromofenolsulfoneftaleína – CASRN 115-39-9], azul de metileno [cloreto de 3,7-bis(dimetilamino)fenazatiônio – CASRN 7220-79-3], $NaHCO_3$ [bicarbonato de sódio – CASRN 144-55-8], bis/acrilamida (1:37,5) [solução 40% (m/v) – CASRN 110-26-9 / CASRN 79-06-1], brometo de etídio [CASRN 1239-45-8], CCCP [carbonil cianeto de 3-clorofenilahidrazona – CASRN 555-60-2], ciprofloxacina [CASRN 85721-33-1], $CaCl_2$ em solução 1,0 M [cloreto de cálcio – CASRN 10043-52-4], $MgCl_2$ em solução 1,0 M [cloreto de magnésio – CASRN 7786-30-3], $MnCl_2$ em solução 1,0 M [cloreto de manganês (II) – CASRN 7773-01-5], cristal violeta [CASRN 548-62-9], SDS [dodecil sulfato de sódio – CASRN 151-

21-3], DMSO [dimetilsulfóxido – CASRN 67-68-5], DTNB [ácido 5,5′-ditiobis(2-nitrobenzóico) – CASRN 69-78-3], DTT [ditiotreitol ou *treo*-1,4-dimercapto-2,3-butanodiol – CASRN 3483-12-3], EDTA [ácido etilenodiaminotetraacético – CASRN 60-00-4], EGTA [ácido etileno glicol-bis(2-aminoetiléter)-*N,N,N′,N′*-tetraacético – CASRN 67-42-5], espermina [*N,N′*-Bis(3-aminopropil)-1,4-diaminobutano – CASRN 71-44-3], espermidina [*N*-(3-aminopropil)-1,4-diaminobutano – CASRN 124-20-9], G418 (sal disulfato) [CASRN 108321-42-2], α-D-galactose [CASRN 3646-73-9], D-glicose [CASRN 50-99-7], glicerol [CASRN 56-81-5], glicogênio [tipo IX – CASRN 9005-79-5], glutamato [ácido L-glutâmico de sódio hidratado – CASRN 142-47-2], HEPES [ácido 4-(2-hidroxietil)piperazina-1-etanosulfônico – CASRN 7365-45-9], HPR [peroxidase de rabanete tipo VI-A – CASRN 9003-99-0], malato [ácido L-(-)-málico – CASRN 97-67-6], meio LB [meio bacteriano Luria-Bertani – triptona 1%, extrato de levedura 0,5% e NaCl 1%, pH 7,0], D-manitol [CASRN 69-65-8], MOPS-Na [ácido 3-(N-morfolino)propanosulfônico de sódio – CASRN 71119-22-7], NaN_3 [azida sódica – CASRN 26628-22-8], persulfato de amônio (APS) [$NH_4S_2O_8$ – CASRN 7727-54-0], piruvato [piruvato de sódio – CASRN 113-24-6], PMSF [fluoreto de fenilmetanosulfonila – CASRN 329-98-6], poli-(dI-dC) [ácido poli(desoxinosinico-desoxicitidilico) de sódio – CASRN 118578-37-3], poli-L-lisina [solução de poli-L-lisina 0,01% (m/v) – CASRN 25988-63-0], rotenona [CASRN 83-79-4], sacarose [CASRN 57-50-1], succinato [ácido succinico – CASRN 110-15-6], $MgSO_4$ em solução 1,0 M [sulfato de magnésio – CASRN 7487-88-9], Tergitol® NP-40 [CASRN 127087-87-0], Tween® 20 [CASRN 9005-64-5], Triton™ X-100 [4-(1,1,3,3-tetrametilbutil)fenil-polietileno glicol – CASRN 9002-93-1], Trizma® base [2-amino-2-(hidroximetil)-1,3-propanodiol – CASRN 77-86-1] e TMPD [*N,N,N′,N′*-tetrametil-1,4-fenilenodiamino – CASRN 100-22-1] todos Sigma-Aldrich®.

Triptona e extrato de levedura da Acumedia (Neogen® Corporation).

Reagente de Bradford, solução de γ-globulina bovina (BGG) 2 mg/mL e TEMED [*N,N,N′,N′*-tetrametiletilenodiamina – CASRN 110-18-9] da Bio-Rad Laboratories©.

Amplex® UltraRed, Lipofectamine® RNAiMAX, MitoSOX™ Red, PureLink™ RNase A, Proteinase K (CAS – 39450-01-6) todos Life Technologies™.

Garrafas de 25 e 75 cm², placas de cultura de 6, 24 e 96 poços e placas 22,1 e 60,1 cm² da TPP®. Placas de 150 cm² da Sarstedt AG & Co. Placas de 20,8 cm² para clonogênico da Nunc™. XF Assay Medium, XF Calibrant Solution e XF V7 Cell Culture Microplates todas Seahorse Bioscience©.

3.2. Preparação de Bactérias Quimiocompetentes

Uma placa de bactérias *Escherichia coli* DH5α™ [F- φ80*lac*ZΔM15 Δ(*lac*ZYA-*arg*F) U169 *rec*A1 *end*A1 *hsd*R17 (r_k-, m_k+) *pho*A *sup*E44 λ^- *thi*$^{-1}$ *gyr*A96 *rel*A1 (Invitrogen®)] foi gentilmente doada pelo Prof. Dr Sandro Roberto Marana do Departamento de Bioquímica do Instituto de Química da USP (IQ/USP).

O método de transformação foi feito de acordo com Hanahan com pequenas modificações (1983). O pré-inóculo foi preparado em Erlenmeyer de 250 mL contendo 5 mL de meio SOB (*super optimal broth* – triptona 2%, extrato de levedura 0,5%, NaCl 10 mM, KCl 2,5 mM e $MgCl_2$ 10 mM, pH 7,0) pré-aquecido a 37 °C e incubado durante 2 h sob agitação a 220 rpm. Logo após esse período, 45 mL de meio SOB pré-aquecido foi adicionado no Erlenmeyer, que foi incubado sob agitação por 2-3 h adicionais ou até que se obtivesse uma OD de 0,5-0,6 em 600 nm.

O frasco foi resfriado em gelo e adicionou-se 0,5 mL de $MgCl_2$ 1 M à suspensão celular. As bactérias foram então transferidas para um tubo cônico estéril de 50 mL a 4 °C, deixadas durante 15 min, em repouso e, em seguida, centrifugadas a 5.400 *g* durante 15 min a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspenso cuidadosamente em 10 mL de solução RFI (acetato de potássio 30 mM, pH 5,8, KCl 100 mM, $MnCl_2$ 50 mM, $CaCl_2$ 10 mM, glicerol 15%). A suspensão bacteriana foi deixada em repouso no gelo por 15 min, e centrifugada a 5.400 *g* durante 12 min a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado contendo as bactérias foi ressuspenso em 2 mL de solução RFII (MOPS-Na 10 mM, pH 6,8, KCl 10 mM, $CaCl_2$ 75 mM, glicerol 15%). Por fim, foram preparadas alíquotas de 50 μL das bactérias quimiocompetentes em microtubos estéreis, as quais foram armazenadas em freezer -80 °C.

3.3. Transformação Bacteriana por Choque Térmico

Para realização do protocolo de transformação das bactérias por choque térmico, inicialmente, elas foram descongeladas em banho de gelo por aproximadamente 15 min. Cerca de 100 ng de plasmídeo pBR322 (4.363 pares de base, Invitrogen®), gentilmente doados pelo Prof. Dr Paolo di Mascio (IQ/USP), foram misturados à suspensão de células quimiocompententes e a mistura incubada em gelo por 30 min. A mistura plasmídeo/bactérias

foi submetida a choque térmico sendo aquecida a 42 °C durante 2 min, e imediatamente resfriada em gelo durante 5 min.

Por fim, a mistura plasmídio/bactéria recebeu 450 μL de meio SOC (SOB com repreensão de catabólito – SOB contendo D-glicose 20 mM e $MgCl_2$ 20 mM, pH 7,0) e foi incubada a 37 °C sob agitação durante 1 h. As bactérias foram centrifugadas a 5.400 *g* por 15 min, plaqueadas em meio LB ágar contendo 100 μg/mL de ampicilina sódica para seleção das transformantes e incubadas a 37 °C até que colônias visíveis fossem obtidas.

3.4. Extração de DNA Plasmidial em Pequena Escala (Mini-prep)

A extração do DNA plasmidial de interesse foi realizada pelo método de lise alcalina, adaptada de Sambrook & Russel (2001). Resumidamente, uma colônia bacteriana foi inoculada em 3 mL de meio LB líquido acrescido de 100 μg/mL de ampicilina sódica, incubadas a 37 °C por 16-18 horas, sob agitação constante 200 rpm. Para a coleta das células, a suspensão foi centrifugada a 5.400 *g* por 10 min. O precipitado bacteriano foi, ressuspenso em 300 μL de solução P1 (Tris-HCl 25 mM pH 8,0, EDTA 10 mM, RNase 100 μg/mL, lisozima 5 mg/mL) e acrescido de 300 μL de solução P2 (NaOH 200 mM, SDS 1%). O conteúdo dos tubos foi gentilmente misturado através de inversão, e os tubos foram mantidos em repouso à temperatura ambiente (TA), por um período de 3 a 5 min. Posteriormente, 300 μL de solução P3 (acetato de potássio 3 M, pH 5,5 ajustado com ácido acético glacial) foram adicionados (*salting-out*) e os tubos foram homogenizados por inversão e centrifugados a 13.000 *g* por 10 min. O sobrenadante foi transferido para novos tubos, aos quais se adicionou 0,7 volumes de isopropanol. O conteúdo foi misturado cuidadosamente por inversão e centrifugado a 20.000 *g* durante 30 min. Em seguida, o sobrenadante foi removido e o DNA precipitado foi cuidadosamente lavado com 200 μL de etanol 70% e seco em banho-seco a 37 °C. Os plasmídeos foram ressuspensos em tampão TE (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, pH 7,8).

Alternativamente, o plasmídeo de interesse foi isolado utilizando-se kits comerciais (Qiagen®, Inc., EUA), seguindo-se as instruções recomendadas pelo fabricante.

A concentração do DNA plasmidial foi estimada por espectrofotometria em aparelho NanoDrop 1000 (Thermo Fisher Scientific Inc.). Por fim, a topologia superenovelada e relaxada do DNA plasmidial foi analisada por migração eletroforética em gel de agarose 0,8% em tampão TAE (Tris-Acetato 40 mM, EDTA 1 mM, pH 8,0).

3.5. Detecção *in vitro* de Danos Induzidos em DNA Plasmidial

Para estabelecimento de uma curva-padrão de danos em DNA plasmidial pBR322 foi preparado uma série de condições experimentais a fim de obter-se uma concentração ideal de azul de metileno (AM) e um tempo ideal de fotossensibilização. Duas concentrações (10 e 50 μM) e três tempos de fotossensibilização (10, 20 e 30 min) foram utilizados no experimento. A solução de DNA plasmidial foi preparada em uma concentração final de 100 ng/μL e 30 μL distribuídos na tampa de uma placa de 96 poços, conforme mostrado na figura 1. Às gotas foram adicionadas as soluções de azul de metileno 2X concentrada a fim de se obter a concentração final descrita acima (concentração final de DNA plasmidial = 50 ng/μL). Os controles não-expostos à luz permaneceram o tempo todo em microtubos âmbar. Todo o processo foi realizado em quarto escuro. A fonte emissora de luz consistia de uma placa contendo diodos emissores de luz (LED) de 2 W de potência emitindo na faixa do vermelho, estando situada a 10 cm das amostras (Fig. 8).

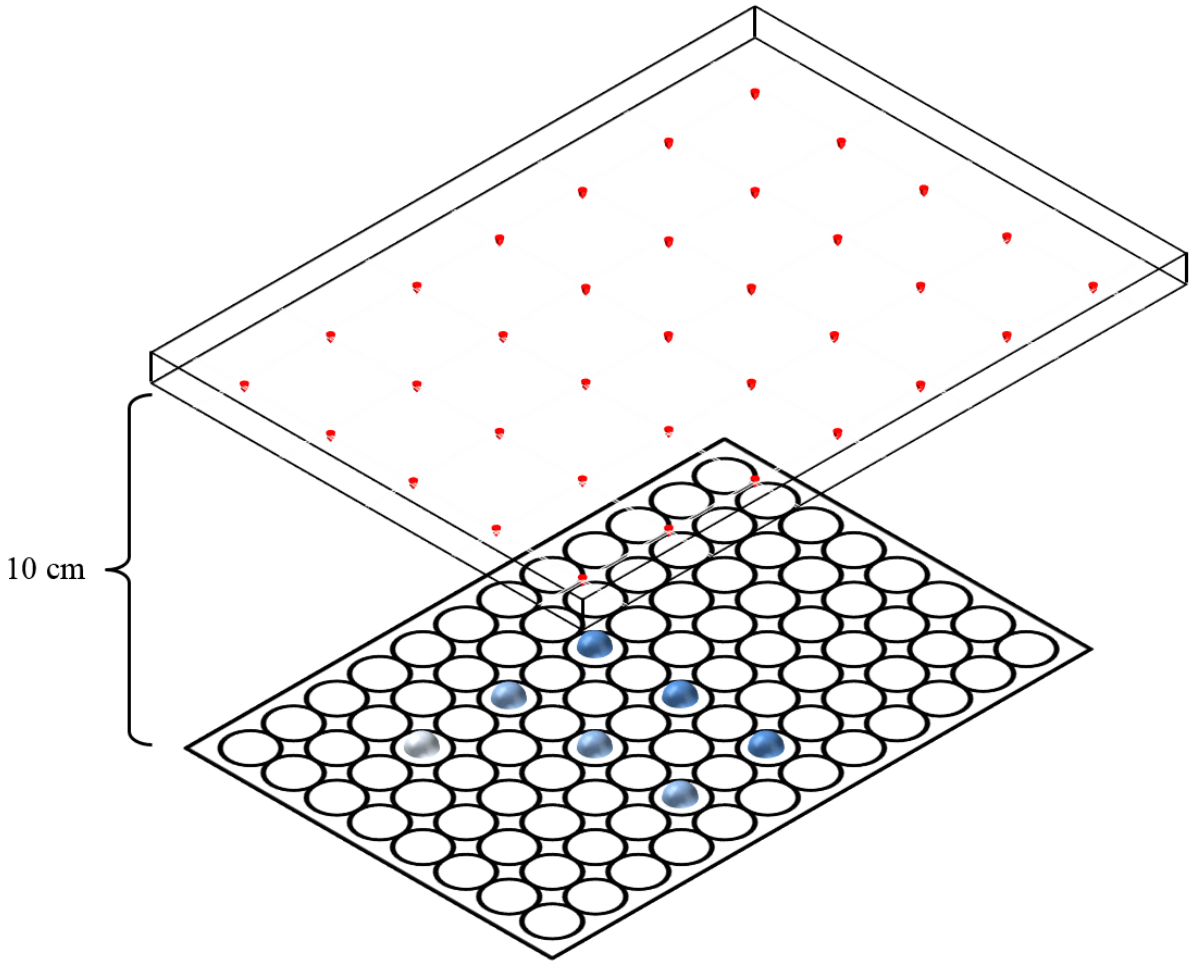


Figura 8 – Ilustração esquemática do experimento de indução de danos em DNA plasmidial. Após cada período de fotossensibilização, as gotas foram armazenadas em microtubos âmbar etiquetados para posterior tratamento com DNA glicosilases e análise eletroforética.

Em seguida, as amostras tratadas foram submetidas à análise de sítios sensíveis a formamidopirimidina DNA glicosilase (Fpg – gene mutm) e endonuclease III (EndoIII – gene nth) ambas proteínas de *E. coli*. À solução de reação de Fpg (Bis Tris Propano-HCl 10 mM, pH 7,0, $MgCl_2$ 10 mM, DTT 1 mM, BSA 0,1 mg/mL) ou de EndoIII (Tris-HCl 20 mM, pH 8,0, EDTA 1 mM, DTT 1 mM) foi adicionado 400 ng de pBR322 de cada tratamento (8 µL) e 1 U de cada enzima (Fpg ou EndoIII) em um novo microtubo âmbar totalizando um volume 20 µL de reação. As amostras foram incubadas em banho-seco a 37 °C por 1 h. A reação foi interrompida através da adição de 1 µL de SDS 10% e 0,5 µL de proteinase K 10 mg/mL (concentração final SDS 1%, proteinase K 1 mg/mL) e incubada por 30 min a 56 °C. Por fim, realizou-se a corrida eletroforética de 10 µL de cada amostra (~200 ng de DNA) em gel de agarose 0,8% em tampão TAE para analisar a proporção de plasmídeos com topologia superenovelada e relaxada. As intensidades das bandas foram analisadas através do programa ImageJ.

O número de sítios sensíveis à enzima por plasmídeo foi calculado assumindo a distribuição de Poisson adaptada para essa técnica de acordo com a seguinte equação (1):

$$X = -\ln\left[\frac{1{,}22\times \mathrm{FI}}{1{,}22\times(\mathrm{FI}+\mathrm{FII})}\right] \qquad (1)$$

no qual FI representa a intensidade de fluorescência medida na banda de DNA superenovelado, FII a intensidade na banda de DNA relaxado, e 1,22 é o fator empregado para correção do aumento da fluorescência do brometo de etídio quando ligado à topologia relaxada comparada com a superenovelada (Shubsda et al., 1997).

3.6 Linhagens Celulares

Todas as linhagens foram rotineiramente mantidas em meio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium* – Gibco®) contendo D-glicose 25 mM, L-glutamina 2 mM, $NaHCO_3$ 3,7 g/L (pH 7,38) suplementado com 10 ou 15% de SBF (soro bovino fetal – Gibco®) e 1% de solução de antibióticos (estreptomicina 0,1 mg/mL e penicilina 10 U/mL – Invitrogen®), a 37 °C em estufa umidificada com atmosfera de 5% de CO_2 (condição padrão de cultura).

3.6.1 Fibroblastos Humanos Imortalizados

A linhagem de fibroblastos selvagem utilizada como controle, MRC-5, derivadas de tecido pulmonar fetal normal imortalizado com *Simian virus* 40 (SV40), foi gentilmente doada pelo Prof. Dr Carlos Frederico Menck do Depto de Microbiologia, Instituto de Ciências Biomédicas (ICB/USP).

As células XP4PA são provenientes da derme de um paciente XP-C e também foram imortalizadas com SV40 (XP4PA-SV). Essa linhagem carrega uma mutação c.1643_1644delTG (n.1747_1748delTG considerando o transcrito mais atual NM_004628.4 – Mutalyzer 2.0.5, ©LUMC) em homozigose que introduz uma mudança no quadro de leitura gerando um códon precoce de terminação e uma proteína truncada de 571 aminoácidos (Val548AlafsX25) (Li et al., 1993; Chavanne et al., 2000). Porém, é mais provável que o mRNA sofra decaimento mediado pela mutação sem sentido (*nonsense-mediated message decay*) (Khan et al., 2006) e o fenótipo molecular seja a ausência da proteína.

A linhagem XP4PA corrigida (XP4PA-XPC) apresenta a reversão da mutação TG *in locus*, expressando a proteína selvagem (Dupuy et al., 2013). A correção cromossômica da mutação genética foi alcançada com o uso de meganucleases desenhadas para introduzir uma quebra de fita dupla (DSB – *double strand break*) sítio-específica e estimular HR no loco desejado (Daboussi et al., 2012; Dubuy et al., 2013). Ambas as linhagens também foram doadas pelo Prof. Menck.

3.6.2 Fibroblastos Humanos Primários

Quatro linhagens de fibroblastos primários também foram gentilmente cedidas pelo Prof. Menck. A linhagem XP17VI – estabelecida no laboratório do Prof. Dr Alain Sarasin do Institut de Recherches Scientifiques sur le Cancer (CNRS), Villejuif, França – apresenta a mesma deleção da linhagem XP4PA. A linhagem AS405 também estabelecida no laboratório do Prof. Sarasin é uma linhagem selvagem. As linhagens XP02SP e XP03SP foram ambas estabelecidas no Laboratório de Reparo de DNA, no ICB/USP. A linhagem XP03SP apresenta a mutação comum às células XP4PA e XP17VI. A linhagem XP02SP apresenta uma mutação c.1969G>T em homozigose (n.2073G>T considerando o transcrito mais atual NM_004628.4 –

Mutalyzer 2.0.5, ©LUMC) que é preditiva de gerar um códon precoce de terminação e uma proteína truncada de 657 aminoácidos (p.Glu657X) (Leite et al., 2009).

3.6.3 Fibroblastos Murinos Primários

Camundongos C57BL/6 selvagem (*Xpc*$^{+/+}$), heterozigoto (*Xpc*$^{+/-}$) e Xpc null (*Xpc*$^{-/-}$) foram gentilmente doados pela Dra Carolina Quayle durante o seu doutoramento no laboratório do Prof. Dr Menck, em colaboração com o Prof. Dr Jan H. J. Hoeijmakers, do Institute of Genetics da Erasmus University, Holanda. As linhagens de fibroblastos dermais primários de camundongos adultos (MDF – do inglês *murine dermal fibroblast*) (8-10 semanas de idade) foram estabelecidas conforme o descrito por Maynard et al. (2006).

Resumidamente, os camundongos foram sacrificados em câmara de CO_2, as caudas removidas e limpas através de lavagem serial em etanol 70%, PBS estéril e DMEM estéril. Após a higienização as caudas foram cortadas em pedaços pequenos com bisturi em placas de 22,1 cm2 (TPP®) contendo DMEM completo (10% de soro bovino fetal, 10 U/mL de penicilina, 10 µg/mL de estreptomicina e 0,25 µg/mL de anfotericina) e 1.000 U de colagenase, e incubadas por 24 h em estufa de 5% de CO_2 a 37 °C. Os pedaços mais grosseiros foram vigorosamente homogeneizados a fim de promover a dissociação de células ainda presas à matriz extracelular e de divulsionar qualquer grumo celular. O meio de cultura, contendo células não-aderidas, ossos e pedaços de pele, foi filtrado em sistema *cell strainer* de 100 µm acoplado a tubos cônicos de 50 mL (BD Falcon™) através de centrifugação a 200 *g* por 5 min. O precipitado resultante (contendo as células não-aderidas) foi transferido a placa original que já continha algumas células aderidas.

3.7 Isolamento de Mitocôndrias de Células em Cultura

As frações mitocondriais de todas as linhagens celulares foram isoladas como descrito em Maynard et al. (2010). As células foram cultivadas em 40-60 placas de Petri de 60 cm^2 (TPP®) ou em 15-24 placas de Petri de 150 cm² (Sarstead®) até atingirem confluência de 80-90% (fase log de crescimento). A partir da coleta das células, todas as etapas foram realizadas a 4 °C. As células foram lavadas com PBS gelado e desprendidas com auxílio de *cell scraper* (TPP®). As suspensões celulares foram centrifugadas a 5.400 *g* por 10 min e o sobrenadante

descartado. Os precipitados celulares foram lavados 2X com tampão MSHE 1X (manitol 210 mM, sacarose 70 mM, HEPES-KOH 10 mM, EGTA 1 mM, EDTA 2 mM, pH 7,4), e centrifugados utilizando-se as condições anteriores. Após as lavagens – que tiveram o intuito de remover os sais de fosfato remanescente do PBS – o precipitado celular foi ressuspenso em 1-2 volumes MSHE 1X suplementado com espermina 150 µM, espermidina 750 µM, DTT 5 mM e coquetel antiprotease 1X (*Complete* – Roche) e tratado com alíquotas 10 µL de digitonina 5% até que mais de 90% das células estivessem permeabilizadas ao corante azul de tripan 0,4% (diluído em PBS), analisado em câmera de Neubauer. As células foram homogeneizadas utilizando cerca de 30 passagens do pistilo em um homogenizador vidro-vidro do tipo Potter-Elvehjem; uma alíquota do homogenato foi armazenada correspondendo ao extrato celular total. O homogenato foi submetido à centrifugação a 700 *g* por 12 min. O precipitado, composto principalmente por núcleos, foi armazenado a -80 °C; enquanto o sobrenadante foi transferido para outro tubo e centrifugado a 9.000 *g* por 10 min. Alíquotas do sobrenadante, correspondendo à fração citosólica, foram armazenadas a -80 °C. Já o precipitado, correspondendo à fração mitocondrial bruta, foi ressuspenso em 500 µL de uma mistura contendo 50% de Percoll™ PLUS (GE Healthcare Life Sciences) e 50% MSHE 2X (Percoll/MSHE), cuidadosamente aplicado em cima do gradiente de Percoll/MSHE e centrifugado a 50.000 *g* por 1 h e 10 min em ultracentrífuga Beckman, rotor SW 40 Ti. A fração mitocondrial, a cerca de um terço de distância do topo do tubo de centrífuga foi cuidadosamente removida e lavada com MSHE 1X. A suspensão mitocondrial pura foi obtida por centrifugação a 5.000 *g* durante 10 min e o sobrenadante descartado. O precipitado contendo a fração mitocondrial purificada (FMP) foi ressuspenso em 1 volume (200-400 µL) de MSHE 1X e alíquotas de 50 µL foram armazenadas a -80 °C até o momento de uso.

3.8 SDS-PAGE/WESTERN BLOT

A fim de verificar a pureza das frações mitocondriais e o rendimento do processo de isolamento, as frações nucleares e mitocondriais foram analisadas através de Western blot. Ademais, após a confirmação da pureza das FMP, analisamos a presença de XPC nessa organela. Os anticorpos usados foram: anti-Lamin B2 (1:1000) [mouse monoclonal IgG2, X223, sc-56147], anti-PCNA (1:1000) [mouse monoclonal IgG2a, F-2, sc-25280], anti-Mfn1 (1:500) [rabbit polyclonal IgG, H-65, sc-50330] (todos Santa Cruz Biotechnology, Inc), anti-ATPB (1:500) [mouse monoclonal IgG1, 3D5, ab14730] e anti-XPC (1:400) [rabbit polyclonal

IgG, ab21078] (todos Abcam®). Os anticorpos secundários conjugado a enzima HRP (peroxidase de rabanete) foram todos utilizados na concentração de 1:5000 (todos Santa Cruz Biotechnology, Inc).

Para tanto, géis de 10-14% de poliacrilamida de 1,5 mm de espessura [10-14% bis/acrilamida (37,5/1), Tris-Cl 375 mM, pH 8,8, SDS 0,1%, APS 0,05% (m/v), TEMED 0,05% (v/v)] foram preparados no sistema Mini-protean da BioRad®. Sobre o gel de corrida foi adicionada a porção de empilhamento [6% bis/acrilamida (37,5/1), Tris-HCl 125 mM, pH 6,8, SDS 0,1%, APS 0,075%, TEMED 0,075%]. As amostras foram dissolvidas em tampão 5X Laemmli (Tris-Cl 300 mM, pH 6,8, SDS 10%, glicerol 50%, β-mercaptoetanol 25%, azul de bromofenol 0,1 % (m/v)), incubadas a 95°C por 10 min e aplicadas ao gel. A eletroforese foi feita com tampão de corrida Novex® Tris-Glicina SDS (Invitrogen®), em cuba Mini-Protean (BioRad®) a 125 V (~40 mA) por 1 h 15 min a 2 h a temperatura ambiente (TA). As proteínas foram transferidas para uma membrana de PVDF (fluoreto de polivinilideno) ativada com metanol e equilibrada em tampão de transferência Novex® Tris-Glicina (Invitrogen®) contendo 10-20% de metanol no módulo de transferência do Mini-Protean (BioRad®) a 120 V com corrente de ~250 mA durante 3-4 h a 4°C.

As membranas foram incubadas com solução 5% (m/v) de leite desnatado em pó em tampão Tris-Salina-Tween (Tris-Cl 20 mM, NaCl 150 mM, Tween® 20 0,05%, pH 7,4 – TBST) *overnight* a 4 °C ou por 2 h a TA. Em seguida as membranas foram lavadas duas vezes com TBST por 5 min a TA e incubadas de 1,5-2 h com o anticorpo primário diluído de 400-1000 vezes em 1% Leite/TBST a TA (o tempo de incubação e a diluição do anticorpo variaram de acordo com o anticorpo utilizado). Elas foram lavadas com TBST três vezes por 5 min a TA e então incubadas com o anticorpo secundário correspondente diluído 5.000 vezes em 1% Leite/TBST de 1,5-2 h a TA. Enfim, foram realizadas lavagens sequenciais de 5, 10 e 15 min com TBST a TA. As membranas foram reveladas com 400 μL por membrana da mistura reacional de ECL Plus Western Blotting Detection System (Amersham™) por 5 min, no escuro, a TA, e expostas a filme fotográfico por tempos diferentes.

3.9 Preparação de Extratos Proteicos Mitocondriais

Após a obtenção das frações mitocondriais purificadas, os extratos proteicos mitocondriais (EPM) foram preparados para o estabelecimento do ensaio *in vitro* de cinética de incisão em DNA plasmidial. Inicialmente, as frações foram centrifugados a 16.000 *g* a 4 °C por

15 min a fim de remover o tampão MSHE. O sobrenadante foi removido e ao precipitado mitocondrial foi adicionado o tampão de lise (Tris-HCl 10 mM, pH 7.8, KCl 400 mM, EDTA 1 mM, DTT 1 mM, glicerol 20% (v/v), NP-40 0,1% (v/v), PMSF 0,25 mM, 1X coquetel inibidor de protease), e incubado por 1 h e 30 min a 4 °C. O lisado foi sonicado cinco vezes em amplitude de 20% por 5 s em gelo, com intervalos de 30 s em processador ultrassônico VC505 Vibra-CellTM (Sonics®), e submetido à centrifugação a 16.000 *g* a 4 °C por 10 min para precipitar membranas e DNA contaminantes. O sobrenadante contendo as proteínas purificadas foi dialisado *overnight* em tampão de diálise (HEPES 25 mM, KCl 100 mM, EDTA 1 mM, glicerol 17%) em cassetes de diálise de 0,1-1,0 mL com membrana de exclusão de 3,5 kDa de tamanho (Slide-A-Lyzer Dialysis Cassettes, 3.5K – Pierce Biotechnology, Inc). Após a diálise, o lisado foi centrifugado novamente a 16.000 *g* a 4 °C por 10 min para remover a fração insolúvel restante. A concentração de proteínas foi analisada através de reagente de Bradford utilizando BGG (ambos BioRad®) para construção da curva-padrão.

3.10 MICROSCOPIA DE IMUNOFLUORESCÊNCIA

Células MRC-5 e XP4PA-SV foram semeadas numa concentração de $2,5 \times 10^5$ células por poço em uma lâmina de vidro circular (12 mm de diâmetro) em placas de 24 poços (Deckglaser, Knittel Glaser). Ao atingirem cerca de 80% de confluência, as células foram lavadas com PBS 1X contendo cálcio e magnésio e fixadas com metanol gelado (-20 °C) por 10 min a temperatura ambiente e posteriormente bloqueadas com tampão (PBS, BSA 2% e 0-0,05% Tween) por 1 h. Anticorpos monoclonal mouse anti-XPC e monoclonal rabbit anti-piruvato desidrogenase E1-alpha (Abcam®) foram diluídos 1:50 e 1:250 respectivamente, e incubados *overnight* a 4°C. Anticorpo secundário anti-mouse Alexa 594 e anti-rabbit Alexa 488 (Invitrogen®) foram diluídos 1:200 e aplicados por 1 h, a TA. Os slides foram montados com Vectashield® Mounting Medium com DAPI (Vector Laboratories, Inc). As imagens foram adquiridas em um microscópio Zeiss Axio Observer A1 Inverted (Zeiss©) sob magnitude de aumento de 630×.

3.11 Ensaio *in vitro* de Cinética de Incisão em DNA Plasmidial

Uma solução de DNA plasmidial pBR322 foi preparada na concentração final de 100 ng/µL e 48 µL distribuídos na tampa de uma placa 24 poços. Às gotas foi adicionada uma solução 20 µM de AM (2X concentrada) a fim de se obter a concentração final de 10 µM (concentração final de DNA plasmidial = 50 ng/µL). Os controles não-expostos à luz permaneceram o tempo todo em microtubos âmbar. Todo o processo foi realizado em câmara escura. A fonte emissora de luz consistia de uma placa contendo diodos emissores de luz (LED) de 2 W de potência emitindo na faixa do vermelho, estando situada a 12 cm das amostras. O substrato de DNA foi fotossensibilizado por 10 min.

Em seguida, cerca de 400 ng de DNA plasmidial foram misturados ao tampão de reação (HEPES-KOH 40 mM, pH 7,4, EDTA 10 mM, DTT 1 mM, KCl 75 mM, glicerol 10%) e 5 µg de proteína do extrato proteico mitocondrial (EPM) (quantidade de escolha após padronização da reação) e 1 µg poli(dI-dC) foi adicionado totalizando um volume de reação de 20 µL. As reações foram incubadas a 37 °C durante 15, 30, 60 e 120 min. A reação foi interrompida com a adição de 1 µL de SDS 10% e 0,5 µL de proteinase K 10 mg/mL e incubada por 30 min a 56 °C.

Por fim, 20 µL da reação foi misturada com 4 µL de 6X Orange DNA Loading Dye (Thermo Scientific Inc), aplicada em gel de agarose 1,0% diluído em tampão TAE e submetida a eletroforese a 5 V/cm por 4 h para analisar a proporção com topologia superenovelada e relaxada. Ao término da corrida eletroforética, o gel foi corado por 30 min em solução de 5 µM de brometo de etídeo e descorado por 10 min em água deionizada. As intensidades das bandas foram analisadas através do programa ImageJ. Cinco controles, divididos em dois grupos, foram usados no experimento, três controles-negativos de plasmídeo pBR322 não-fotossensibilizado: 1) não-tratado com Fpg, 2) tratado com Fpg, e 3) tratado com 5 µg de extrato proteico; e dois controles-positivos de pBR322 fotossensibilizado: 4) não-tratado com Fpg, e 5) tratado com Fpg.

O número de sítios sensíveis às enzimas Fpg e EndoIII por plasmídeo foi calculado assumindo a distribuição de Poisson adaptada para essa técnica conforme a equação (1) descrita na seção 3.5.

Aos valores encontrados nos grupos tratados foi subtraída a fluorescência observada no grupo controle número 3, devido à pronunciada atividade endonucleolítica inespecífica nesses extratos mitocondriais.

3.12 Ensaios de Sobrevivência e Proliferação Celular

3.12.1 Ensaio Clonogênico

Tratamento com azul de metileno (AM)

Para avaliar a sensibilidade ao estresse redox mitocondrial em linhagens imortalizadas foi utilizado o ensaio clonogênico. Cerca de 1×10^5 células por poço foram semeadas em placas de 6 poços (TPP®) e incubadas por 24 h. Para os tratamentos, os poços foram lavados com 2 mL de PBS e incubados durante 1 h em meio DMEM sem soro, acrescido de concentrações crescentes de AM (5, 10 e 20 μM). O meio foi removido, as células foram lavadas com 2 mL de PBS por 3 min e o PBS removido. O AM incorporado pelas células foi imediatamente fotossensibilizado em 2 mL de PBS com LED de 700 nm a uma distância de 12 cm da fonte emissora, durante 30 min, ou as células foram mantidas no escuro. Após a fotossensibilização, as células foram desprendidas com 200 μL de tripsina-EDTA e ressuspensas em 800 μL de meio DMEM suplementado com 10% de SBF e 1% de antibióticos. As suspensões celulares foram homogeneizadas e a concentração celular estimada em câmara de Neubauer. De cada tratamento, aproximadamente, 1.000 ou 5.000 células foram semeadas em placas de 20,8 cm^2 (Nunc™) em meio DMEM completo e incubadas a 37 °C por 8 a 10 dias, no escuro. No final desse período, as colônias foram fixadas com etanol absoluto por 5 min, coradas com cristal violeta 1% (m/v) e contadas.

Tratamento com rotenona (ROT) ou antimicina A (AA)

A fim de avaliar a sensibilidade ao estresse redox gerado pela inibição de complexos da CTE foram utilizadas rotenona, um inibidor do complexo I, e antimicina A, um inibidor do complexo III. Cerca de 500 células por poço foram semeadas em placas de 6 poços (TPP®) e incubadas por 24 h. Para os tratamentos, os poços foram lavados com 2 mL de PBS e incubados durante 4 h em meio DMEM sem soro, acrescido de concentrações crescentes de ROT (0,125; 0,25; 0,5; 0,75 e 1,0 μM) ou AA (0,25; 0,5; 1,0; 2,0 e 4,0 μM). Ao final da incubação, o meio foi removido, as células foram lavadas com 2 mL de PBS mantidas em meio DMEM completo a 37 °C de 6-7 dias. No final desse período, as colônias foram fixadas com etanol absoluto por 5 min, coradas com cristal violeta 1% (m/v) e contadas.

Foi considerado índice de sobrevivência celular (% ISC) a razão entre a frequência de colônias dos pontos experimentais sobre frequência de colônias do controle negativo multiplicado por 100 – i.e. considerou-se o controle negativo como referência de 100% de ISC (2).

$$\% \, ISC = (N_{Trat} / N_{Ctrl}) \times 100 \qquad (2)$$

Com essa normalização, não pudemos considerar o desvio-padrão como opção para a análise de dados, sendo essa substituída pelo erro-padrão da média.

O teste usado para comparar as médias de %ISC em concentrações crescentes de AM, fotossensibilizado ou não, foi ANOVA com regressão de Dunnett. A possível diferença de sensibilidade entre as duas linhagens foi acessada utilizando-se do teste *t* para observações não-pareadas. Foi estabelecido o valor de $p<0,05$ como suficiente para existir uma diferença estatística significativa.

3.12.2 Teste de Redução de MTT

Devido ao fato de linhagens primárias não possuírem a habilidade de crescer em baixa densidade, portanto, não serem capazes de formar colônias, a sensibilidade ao estresse redox no compartimento mitocondrial foi avaliada através do teste de MTT. Em placas de 96 poços, cerca de 2×10^4 células por poço foram semeadas em um volume final de 200 μL de meio DMEM completo e incubadas por 24 h. As células foram então tratadas como descrito na seção 3.12.1 nas seguintes concentrações de AM: 5, 10, 20, 30 e 50 μM. Ao término do tratamento, as células foram acrescidas de DMEM suplementado com 2% de soro albumina bovina (BSA) e incubadas por 18 h. Findo esse período, o meio foi removido, as células lavadas com PBS e incubadas por 3 h em meio DMEM sem soro contendo 0,5 mg/mL de MTT. Imediatamente após a incubação com o MTT, o meio foi removido, os cristais de formazan foram dissolvidos adicionando 200 μL por poço de DMSO e as absorbâncias lidas em comprimento de onda de 590 nm em leitor de microplaca SpectraMax 190 (Molecular Devices©). Foram realizados dois experimentos independentes em triplicata.

Foi considerado índice de sobrevivência celular (% ISC) a razão entre a absorbância dos pontos experimentais descontado o branco sobre frequência absorbância do controle negativo descontado o branco multiplicado por 100 – i.e. considerou-se o controle negativo como referência de 100% de ISC (3).

$$\% ISC = [(A_{Trat} - A_{Branco})/(A_{Ctrl} - A_{Branco})] \times 100 \quad (3)$$

3.12.3 Número e Tempo de Duplicação da População Celular

Para avaliar a importância da proteína Xpc na senescência em MDF, permitiu-se que essas células crescessem sob duas concentrações de O_2 até que a curva de crescimento atingisse um platô. Após o estabelecimento dos MDFs, foram plaqueadas 2-3×10^5 células em frascos de 25 cm^2 e incubadas sob duas condições: hiperóxia (em estufa de 5% de CO_2 e 20% de O_2) ou normóxia (em estufa de 5% de CO_2 e 3% de O_2). Permitiu-se que os MDFs crescessem por 3-4 dias. Após esse período, as células foram lavadas uma vez com PBS estéril a 37 °C, soltas com tripsina-EDTA 0,25% e o número total de células estimado em câmera de Neubauer. Do total de células, 2-3×10^5 foram semeadas em um novo frasco de 25 cm^2. O número de duplicação da população celular (NDPC) e o tempo de duplicação da população celular (TDPC) foram estimados de acordo com as seguintes equações (4) e (5):

$$NDPC = \ln(N_f / N_0)/\ln(2) \quad (4)$$

$$TDPC = (t_f - t_0) \times [\ln(2)/\ln(N_f / N_0)] \quad (5)$$

onde N_f é o número de células no término de período de crescimento, N_0 é o número de células inicialmente plaqueadas, t_f é o dia do término do período de crescimento e t_0 é o dia do início do período de crescimento (Rubio et al., 2002).

3.13 Medida da Taxa de Consumo de Oxigênio (OCR)

3.13.1 OCR de Complexos Individuais da CTE em Células Permeabilizadas

O consumo de O_2 em células permeabilizadas (2×10^6 células/mL) foi monitorado através de um eletrodo Hansatech (Hansatech Instruments Limitted, Norfolk, UK) ou em oxígrafo de alta resolução Oxygraph-2k, marca Oroboros (Oroboros Instruments, Innsbruck, Áustria) com o uso do programa ao software DataLab versão 4.2.0.73 (Oroboros Instruments, Innsbruck, Áustria). Parte desses experimentos foi feita em colaboração com a Dra Rute Alves Pereira e Costa durante seu doutoramento junto ao Programa de Pós-Graduação em Patologia da Faculdade de Medicina da Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP. As células foram permeabilizadas com 30 µM digitonina em 2 mL de meio de reação padrão (HEPES-

KOH 10 mM, pH 7,2, sacarose 125 mM, KCl 65 mM, K_2HPO_4 2 mM e $MgCl_2$ 2 mM) contendo 5 mM de substratos respiratórios ligados a NADH (glutamato, α-cetoglutarato, malato e piruvato), os quais em sua maioria doam elétrons para a CTE via complexo I. Foram feitas adições sequenciais de 100 µM ADP, 4 µM CAT ou 1 µM de oligomicina A e 1 µM FCCP ou 250 nM de CCCP. Este experimento foi realizado em eletrodo Hansatech. Para analisar os complexos II, III e IV, também foram utilizados 2 mL de meio de reação padrão e 30 µM digitonina, porém agora as adições sequenciais foram de: 5 mM succinato, 100 nM CCCP, 1 µM AA e 200 µM TMPD + 2 mM ascorbato. Este experimento foi realizado no oxígrafo Oroboros. Todas as análises foram feitas a 37 °C.

3.13.2 OCR em Células Aderidas

A fim de avaliar o consumo mitocondrial de O_2 na ausência de XPC, realizamos experimentos em aparelho XF24 Extracelular Flux Analyzer (Seahorse Bioscience©). Previamente ao ensaio, os sensores de oxigênio e de prótons do cartucho *XF24 Assay Kit* foram hidratados com 1 mL *XF Calibrant Solution*, pH 7,40 a 37 °C e incubados em estufa umidificada livre de CO_2 por no mínimo 12 h. Em paralelo, aproximadamente 4×10^4 células em 250 µL de meio DMEM completo foram semeadas em placas de 24 poços *XF24 V7 Cell Culture Microplates* pré-tratadas com poli-L-lisina, distribuídas de acordo com a figura 9, e incubadas de 12-16 h em estufa umidificada com 5% de CO_2. Imediatamente antes do ensaio, as células foram lavadas com 1 mL de *XF Assay Medium* pH 7,40 (não tamponado) suplementado com D-glicose 10 mM e piruvato 1,1 mM (Glc) ou D-galactose 10 mM e piruvato 1,1 mM (Gal), e incubadas em 675 µL do mesmo meio de cultura por no mínimo 1 h em estufa livre de CO_2. Os poços A1, B4, C3 e E6 (Fig. 9) correspondem ao controle sem células como referência para correção dos valores da taxa de consumo de O_2 (OCR) e taxa de acidificação do meio (ECAR).

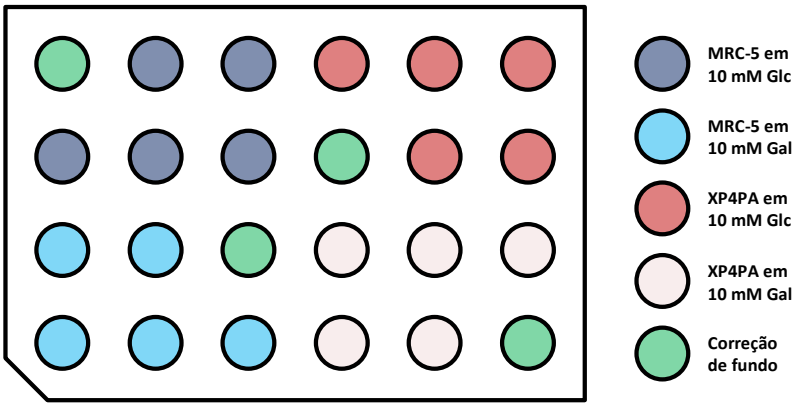


Figura 9 - Desenho esquemático da distribuição das células em *XF24 V7 Cell Culture Microplates*. As células foram incubadas de 12-16 h em meio DMEM Alta Glc completo e só então foram incubadas em meio de cultura *XF Assay Medium* suplementado com 10 mM Glc ou 10 mM de Gal.

Após o período de incubação, o cartucho foi retirado da estufa e os reservatórios injetores foram carregados com as seguintes drogas: i) reservatório A, 75 µL de 10 µM de oligomicina A (concentração final de 1 µM); ii) reservatório B, 83 µL de 2 µM de CCCP (concentração final de 200 nM); iii) reservatório C, 92 µL de 10 µM de rotenona e antimicina A (concentração final de 1 µM). Todas as drogas foram diluídas em *XF Assay Medium* e se encontravam 10X concentradas em relação à concentração molar final desejada em meio de cultura. Após a calibração dos sensores do cartucho, o OCR foi medido em quatro condições: 1) três medidas no meio XF Assay Medium suplementado com suas respectivas fontes oxidáveis de carbono (OCR inicial – OCR_i); 2) duas medidas após a injeção do conteúdo do reservatório A (OCR acoplado a síntese de ATP – OCR_{ATP}); 3) duas medidas após a injeção do conteúdo do reservatório B (OCR máximo – $OCR_{máx}$); e 4) duas medidas após a injeção do conteúdo do reservatório C, (OCR residual – OCR_{res}).

Foram realizados 3 experimentos independentes. Os experimentos foram realizados em quintuplicatas. Com base nas medidas de OCR realizadas em diferentes condições de estresse mitocondrial, foram calculados os seguintes parâmetros (6):

Respiração basal (RB) = OCR_i - OCR_{res}

Capacidade respiratória máxima (CRM) = $OCR_{máx}$ - OCR_{res}

Capacidade respiratória reserva (CRR) = $OCR_{máx}$ - OCR_i

Respiração acoplada à síntese de ATP (RATP) = OCR_i - OCR_{ATP} (6)

Vazamento de prótons (VP) = OCR_{ATP} - OCR_{res}

Respiração não-mitocondrial (RNM) = OCR_{res}

Todos os dados foram analisados através do Teste *t* de Student's não-pareado: i) MRC-5 Glc *vs*. XP4PA Glc, ii) MRC-5 Gal *vs*. XP4PA Gal; Teste *t* de Student's pareado: iii) MRC-5 Glc *vs*. MRC-5 Gal e iv) XP4PA Glc *vs*. XP4PA Gal.

3.14 Medida Indireta de Espécies Reativas de Oxigênio

3.14.1 Análise da Produção de $O_2^{\bullet -}$ com MitoSOX™

Para a quantificação do $O_2^{\cdot -}$, as células MRC-5 e XP4PA-SV foram lavadas com PBS gelado e tripsinizadas. Logo após, elas foram tratadas com MitoSOX™ 5 µM, AA 5 µM e DPI 5 µM por 30 min a 37 ° C. Depois do tratamento, as amostras foram analisadas no canal FL-2 do citômetro de fluxo de acordo com protocolos estabelecidos (Payne et al., 2007).

3.14.2 Análise da produção de H_2O_2 com Amplex® UltraRed

A produção de H_2O_2 pelas células MRC-5 e XP4PA-SV e XP4PA-XPC foi monitorada espectrofluorimetricamente em leitor de microplaca SpectraMax 190 (Molecular Devices©) usando Amplex® UltraRed 5 µM na presença de HRP 0,1 U/mL (Zhou et al., 1997). Os experimentos foram conduzidos a 37ºC em PBS/Hank's (Na_2HPO_4 10 mM, KH_2PO_4 1,8 mM, pH 7,2, NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, $CaCl_2$ 1,3 mM, $MgSO_4$ 1,0 mM, $NaHCO_3$ 4,2 mM, D-glicose 1,0 g/L). A medida da produção de H_2O_2 foi realizada em três condições: i) controle não-tratado (somente células), ii) com DPI 5 µM, iii) com DPI 5 µM mais AA 1 µM. Cerca de 5×10^4 células por poço foram incubadas, em triplicata, por 30 min, nas três condições citadas, a 37 °C como padronização do tempo de preparo das amostras. Após esse período foi adicionado o Amplex® UltraRed e o HRP com auxílio de uma micropipeta multicanal (Eppendorf®) e a fluorescência foi monitorada em 530 nm para excitação e 590 nm para emissão com baixa sensibilidade (ajustada para 2 no software SoftMax® Pro – Molecular Devices©) – em regime de uma leitura a cada 23 segundos (sendo 19 s para aquisição, 3 s para agitação e 1 s de espera) durante 15 min. O cálculo das velocidades foi realizado a partir do 4º min até 12º min da reação. Feita a regressão linear calculou-se as variações de fluorescência por unidade de tempo. A curva de calibração foi feita pela adição de concentrações conhecidas

de H_2O_2, com a qual os valores de fluorescência por unidade de tempo (unidades arbitrárias/min) foram convertidos a valores de quantidade por unidade de tempo (pmol/min).

3.15 Medida de Atividades Enzimáticas

3.15.1 Atividade de Citrato Sintase

A atividade de citrato sintase foi avaliada espectrofotometricamente, como descrito em Hansford & Castro, 1982. Para este experimento, foram preparadas as seguintes soluções: Tris-HCl 0,1 M, pH 8,1; acetil-CoA 5 mM, DTNB 10 mM e oxaloacetato 25 mM diluídos em Tris-HCl 0,1 M, pH 8,1; e Triton X-100 10% (m/v). A reação com volume final de 200 µL consistia Tris-HCl 0,1 M, pH 8,1, acetil-CoA 50 µM, DTNB 100 µM, oxaloacetato 250 µM, Triton X-100 0,1% (m/v). A reação foi iniciada através da adição 2 µL de extrato celular proteico na concentração de 1,5 mg/mL (3 µg de proteína por poço). A atividade de citrato sintase foi mensurada espectrofotometricamente em leitor de microplaca SpectraMax 190 (Molecular Devices©) no comprimento de onda de 412 nm, em regime de uma leitura a cada 19 segundos (sendo 15 s para aquisição, 3 s para agitação e 1 s de espera), durante 5 min a 30 °C. A atividade enzimática foi estimada através da formação do DNTB-CoA derivado da reação e o valor foi calculado a partir do coeficiente de extinção molar do TNB ($\varepsilon=13{,}6\cdot10^{-6}$ $M^{-1}\cdot cm^{-1}$ ou 13,6 $\mu M^{-1}\cdot cm^{-1}$) e ajustado a fim de representar o número de mols de citrato formado por min por miligrama de proteína (nmol/min/mg).

3.15.2 Atividade de Superóxido Dismutase (SOD)

A medida da atividade de SOD foi determinada pelo Kit SOD activity colorimetric assay kit (Abcam®) de acordo com instruções do fabricante. Brevemente, cerca de $2{,}5\times10^5$ células foram incubadas em placas de 35 mm (TPP® – 20,8 cm²) por 24 h em condição padrão de cultura. Ao término desse período, as células foram tripsinizadas, ressuspensas em DMEM completo e centrifugadas a 300 *g* por 5 min a 4 °C. O sobrenadante foi descartado, as células foram lavadas com tampão PBS e centrifugadas mais uma vez por 5 min a 4 °C. Foi adicionado 50 µL de tampão de preparação (Tris-HCl 0,1 M, pH 7,4, Triton X-100 0,5% (v/v), β-mercaptoetanol 5 mM e 1X coquetel antiprotease) e deixado descansar durante 30 min em gelo.

Em seguida, as células foram sonicadas em três vezes em amplitude de 10% por 10 s de duração e 30 s de intervalo em processador ultrassônico VC505 Vibra-Cell™ (Sonics®). O extrato proteico foi centrifugado a 16.000 *g* durante 10 min a 4 °C. O sobrenadante foi coletado e a concentração de proteínas foi estimada usando reagente de Bradford com curva-padrão de BGG como referência. As reações foram montadas em triplicata em placa de 96 poços (Greiner, Sigma-Aldrich®). Foi adicionado a cada poço 10 µg de proteína. A atividade de SOD é expressa como porcentagem de inibição da redução do sal de tetrazólio WST-1 a formazan.

3.15.3 Atividade de Glutationa Peroxidase (GPx)

O ensaio para a atividade da enzima glutationa peroxidase foi realizado com base em Lawrence & Burk (1976). Foram utilizadas cerca de $8x10^6$ células homogeneizando-as em 1 mL de PBS gelado. Foram utilizados 25 µL do homogenato para os ensaios, representando, aproximadamente, 100 µg de proteína.

Em cubeta de quartzo de 1,5 mL, com caminho óptico de 1 cm, a 25ºC, foram adicionados tampão fosfato dibásico de potássio 100 mM (pH 7,7), EGTA 1 mM, NaN_3 1 mM, H_2O_2 250 µM, NADPH 150 µM, glutationa redutase (GR) 60 mU/mL e glutationa reduzida (GSH) 5 mM. O volume final do ensaio foi 1,0 mL.

Após a adição dos reagentes descritos, exceto GSH, monitorou-se o branco da reação na presença de excesso de GR, em 340 nm. Em seguida, adicionou-se GSH e foi monitorada, durante 1 min, a queda na absorbância de NADPH devido à atividade da enzima GR. Foram adicionados 25 µL de homogenato celular (aproximadamente 100 µg de proteína) a fim de monitorar a atividade total (GR+GPx). Como havíamos monitorado a atividade da enzima GR anteriormente, com excesso da mesma, a fim de que ela não fosse fator limitante para a reação, descontamos sua atividade da atividade total, obtendo a atividade da enzima glutationa peroxidase (GPx). Para os cálculos da atividade, em mU/mg de proteína, após a obtenção da variação de absorbância por minuto, aplicamos a fórmula geral para ensaios enzimáticos mostrada a seguir (7):

$$(\text{U/L}) = \frac{\Delta Abs \times VT \times 1000}{\varepsilon \times c \times VA} \qquad (7)$$

onde, ΔAbs é o valor da variação da absorbância da amostra por min descontado a absorbância do branco por min; *VT* é volume total do ensaio (mL); 1000 é o fator de diluição para converter a litro; ε é o coeficiente de absortividade molar, em $mM^{-1} \times cm^{-1}$; *c* é o caminho óptico, em cm, *VA* é o volume da amostra adicionada, em mL.

3.16 Ensaio de Reação em Cadeia da Polimerase Quantitativa (qPCR)

3.16.1 Análise de Expressão Gênica (RT-qPCR)

Condições de cultivo celular

Linhagens imortalizadas: A fim de diminuir possíveis variações no transcriptoma das células nas linhagens MRC-5, XP4PA-SV e XP4PA-XPC seguiu-se a cultura celular de acordo com o protocolo descrito a seguir. Cerca de $2{,}5 \times 10^5$ células foram incubadas em placas de 35 mm (TPP® – 20,8 cm²) por 24 h em condição padrão de cultura. No dia seguinte, as células foram tripsinizadas, ressuspensas, contadas e novamente $2{,}5 \times 10^5$ células foram plaqueadas nas mesmas condições. O RNA foi isolado após 24 h.

Linhagens primárias: Devido à dificuldade de expansão das linhagens primárias, as células foram cultivadas em meio DMEM contendo 15% de SBF, sendo 50% fresco e 50% do meio condicionado em células HeLa. Para obtenção deste, cerca de $2{,}0 \times 10^6$ células HeLa foram semeadas em frascos de 75 cm² contendo 25 mL de meio DMEM completo com 15% de SBF. De dois a três dias depois, o meio foi removido e filtrado em membrana de 0,22 μm. Com esse meio, os fibroblastos primários foram cultivados até atingirem confluência de 60-90% em placa de 35 mm. Uma vez atingida a confluência, procedeu-se o isolamento de RNA.

Knockdown de XPC: Cerca de $2{,}8 \times 10^5$ células por poço da linhagem selvagem, MRC-5, foram semeadas em placas de 6 poços e incubadas por 24 h em condição padrão de cultura. Findo o período, procedeu-se o protocolo de transfecção. Em microtubos estéreis contendo 260 μL de OptiMEM® (Life Technologies™) foram adicionados com 15,6 μL do reagente de transfecção Lipofectamine® RNAiMAX (Life Technologies™). Em outros dois microtubos reservados, contendo 130 μL de OptiMEM®, foram adicionados com 26 pmol de siRNA (Mission® esiRNA – Sigma-Aldrich®) contra eGFP e XPC (Tabela 1). EsiRNA são pequenos RNAs de interferência de fita dupla preparados através da digestão controlada com

endo-ribonuclease originando uma mistura heterogênea de moléculas de siRNA para um mesmo mRNA. Essa abordagem permite uma maior especificidade e efetividade no silenciamento gênico, e um menor efeito *off-target* (silenciamento colateral de outros genes além do gene alvo). Então, foram misturados 130 µL do meio contendo Lipofectamine® ao meio contendo o esiRNA. Os tubos foram cuidadosamente agitados e a mistura descansou por 5 min a TA, para formação do complexo RNA-lipídeos. Enquanto isso, o meio de cultura foi removido da placa contendo as células, lavadas duas vezes com PBS estéril pré-aquecido a 37 °C e incubadas com 1,75 mL de meio OptiMEM®. Percorrido os 5 min, 250 µL da mistura de RNA-lipídeo foram pipetados cuidadosamente nos poços (quantidade final de 25 pmol de esiRNA e 7,5 µL de Lipofectamine® em cada poço). As células foram reincubadas em estufa por 3 dias e o RNA isolado no fim desse período.

Tabela 1 – Sequência referência dos esiRNAs utilizados nos experimentos de silenciamento de XPC em células MRC-5.

Gene	Nome do Gene	Sequência	mRNA RefSeq
XPC	xeroderma pigmentosum, complementation group C	CGTTTCAATAAAGGGGTCCATGAGGACACACACAAGGTTCACCTTCTCTG CCTGCTAGCAAATGGCTTCTATCGAAATAACATCTGCAGCCAGCCAGATC TGCATGCTATTGGCCTGTCCATCATCCCAGCCCGCTTTACCAGAGTGCTGCC TCGAGATGTGGACACCTACTACCTCTCAAACCTGGTGAAGTGGTTCATTGG AACATTTACAGTTAATGCAGAACTTTCAGCCAGTGAACAAGATAACCTG CAGACTACATTGGAAAGGAGATTTGCTATTTACTCTGCTCGAGATGATGA GGAATTGGTCCATATATTCTTACTGATTCTCCGGGCTCTGCAGCTCTTGACC CGGCTGGTATTGTCTCTACAGCCAATTCCTCTGAAGTCAGCAACAGCAAA GGGAAAGA	NM_004628.4
eGFP	enhanced green fluorescent protein	GTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTCACCGGGGTGGTGCCCATCCTGGTCGAGC TGGACGGCGACGTAAACGGCCACAAGTTCAGCGTGTCCGGCGAGGGCGAGG GCGATGCCACCTACGGCAAGCTGACCCTGAAGTTCATCTGCACCACCGGCA AGCTGCCCGTGCCCTGGCCCACCCTCGTGACCACCCTGACCTACGGCGTGCA GTGCTTCAGCCGCTACCCCGACCACATGAAGCAGCACGACTTCTTCAAGTC CGCCATGCCCGAAGGCTACGTCCAGGAGCGCACCATCTTCTTCAAGGACGA CGGCAACTACAAGACCCGCGCCGAGGTGAAGTTCGAGGGCGACACCCTGGT GAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACATCC TGGGGCACAAGCTGGAGTACAACTACAACAGCCACAACGTCTATATCATG GCCGACAAGCAGAAGAACGGCATCAAGGTGAACTTCAAGATCCGCCACA ACATCGAGGACGGCAGCGTGCAGCTCGCCGACCACTACCAGCAGAACACC CCCATCGGCGACGGCCCCGTGCTGCTGCCCGACAACCACTACCTGAGCACCC AGTCCGCCCTGAGCAAAGACCCCAACGAGAAGCGCGATCACATGGTCCTG CTGGAGTTCGTGACCGCCGCCGGGATCACTCTCGGCATGGACGAGCTGTA	NC_025025.1

Tratamento com 5-aza-dC: Cerca de $2{,}0\times10^5$ células em placas de 35 cm foram incubadas em meio DMEM completo contendo 1 µM de 5-aza-dC em condições padrão de cultura. O meio de cultura foi trocado todo dia adicionando-se 1 µM de 5-aza-dC. Passados dois dias, as células foram tripsinizadas, contadas em câmera de Neubauer e novamente semeadas nas mesmas condições. As células foram mantidas em cultura na presença de 5-aza-dC com subcultivos a cada dois dias, e o RNA foi isolado após oito dias de crescimento na presença desse agente desmetilante.

A extração de RNA foi feita através do Kit RNeasy Micro Kit, Qiagen© cuja tecnologia permite a purificação do RNA (máximo 45 µg) de pequenas quantidades de tecidos e células. Todas as amostras foram tratadas com 8 U de RNase-free DNase I (Ambion®) por 15 min a 30 °C, para eliminar quaisquer resquícios de DNA nas amostras.

Preparação de cDNA por reação de transcriptase reversa (RT)

O RNA total extraído das células MRC-5, XP4PA-SV, XP4PA-XPC, AS405 e XP17VI, XP02SP e XP03SP foi convertido a cDNA pelo Kit *High Capacity cDNA Reverse Transcription*® (Applied Biosystems®). Para cada 20 µL de reação foi adicionado 2 µg de RNA a fim de se evitar a necessidade de quantificação após a conversão para cDNA, que aumenta a probabilidade de contaminação devido manipulação. Os tubos foram iniciamente aquecidos a 25 °C por 10 min e a reação ocorreu a 50 °C por 2 h. Ao término da reação, os tubos foram aquecidos por 15 min a 75 °C para inativação da transcriptase reversa. Todas as amostras foram tratadas com 5 U de RNase H (*DNase-free* – Ambion®) por 30 min a 37 °C que degrada RNA de duplex RNA:DNA restando somente o cDNA sintetizado. A RNase H foi inativada por aquecimento durante 10 min a 72 °C.

Preparação da RT-qPCR e aquisição dos dados

Os níveis de mRNA de *XPC*, *PPARGC1A* (PGC-1α), *PPRC1*, *NRF1*, *NFE2L1* (NRF2), *PPARA* (PPARα), *PRKAA1* (AMPK), *SIRT1*, *SIRT3*, *TFAM*, *SDHA*, *KRT8*, foram medidos pelo ensaio RT-qPCR, com iniciadores específicos para os mRNAs desses **genes alvos** e *ACTB* (β-actina), *TBP*, *TUBB* (β-tubulina) e *HPRT* como **genes *housekeeping*** utilizados como **normalizadores**. As reações foram realizadas com o kit *2X SYBR® Green PCR Master Mix* (Applied Biosystem®). Cada 25 µL de reação contém 12,5 µL 2X SYBR® Green PCR Master Mix, 5 pmoles de cada iniciador e 100 ng de cDNA template. As reações e leituras foram realizadas no equipamento 7300 Real Time PCR System (Applied Biosystems®) de acordo com protocolos padrão do equipamento. A sequência dos iniciadores utilizados é apresentada na tabela 2 abaixo:

Tabela 2 – Relação dos genes investigados e sequência dos iniciadores utilizados nas reações de RT-qPCR.

Gene	Nome do Gene	Sequência		mRNA RefSeq
NRF1	nuclear respiratory factor 1	Senso	CTC TGA GAA CTT CAT GGA GGA ACA	NM_005011.3
		Antissenso	CGT GTC CTC GGG AGA AGA AG	
NFE2L1	nuclear factor, erythroid 2-like 1	Senso	TAC TCC CAG GTT GCC CAC A	NM_006164.4
		Antissenso	CAT CTA CAA ACG GGA ATG TCT GC	
PPARA	peroxisome proliferator-activated receptor alpha	Senso	GTC TCC CAG RGG AGC ATT GA	NM_005036.4
		Antissenso	ACC AGC TTG AGT CGA ATC GT	
PRKAA1	protein kinase, AMP-activated alpha 1 catalytic subunit	Senso	CGG AGC CTT GAT GTG GTA GG	NM_006251.5
		Antissenso	TCA TCC AGC CTT CCA TTC TTA CA	
SIRT1	sirtuin 1	Senso	TGG GTA CCG AGA TAA CCT TCT	NM_012238.4
		Antissenso	TGT TCG AGG ATC TGT GCC AA	
SIRT3	sirtuin 3	Senso	CAC AGT CTG CCA AAG ACC CT	NM_012239.5
		Antissenso	CAA TGT CGG GCT TCA CAA CG	
SDHA	succinate dehydrogenase complex, subunit A, flavoprotein (Fp)	Senso	CCT TTC TGA GGC AGG GTT TA	NM_004168.2
		Antissenso	AGA GCA GCA TTG ATT CCT CC	
PPARGC1A	peroxisome proliferator-activated receptor gamma, coativator 1 alpha	Senso	AGA CAC CGC ACG CAC CGA AAT	NM_013261.3
		Antissenso	AGC TGT CAT ACC TGG GCC GAC G	
PPRC1	peroxisome proliferator-activated receptor gamma, coativator related 1	Senso	GAG CAG GTT ATC TCT GGA GGA	NM_015062.4
		Antissenso	AGC AGC TCC GAA TCA GGA ATG	
TFAM	transcription factor A, mitochondrial	Senso	AAC CAA AAA GAC CTC GTT CAG C	NM_003201.2
		Antissenso	TTC AGC TTT TCC TGC GGT GA	
KRT8	keratin 8, type II	Senso	GAA TGA ATG GGG TGA GCT GGA	NM_001256282.1
		Antissenso	AGG TGG ACA CCT TGT AGG ACT	
XPC	xeroderma pigmentosum, complementation group	Senso	CAT CGT GGG AGC CAT CGT AAG	NM_004628.4
		Antissenso	CTC ACC ATC CGC TGC ACA TTT T	
ACTB	actin, beta	Senso	CTC TTC CAG CCT TCC TTC CT	NM_001101.3
		Antissenso	AGC ACT GTG TTG GCG TAC AG	
TUBB	tubulin, beta class I	Senso	TGG ACT CTG TTC GCT CAG GT	NM_001293212.1
		Antissenso	TGC CTC CTT CCG TAC CAC AT	
TBP	TATA box binding protein	Senso	CCA CTC ACA GAC TCT CAC AAC	NM_003194.4
		Antissenso	CTG CGG TAC AAT CCC AGA ACT	
HPRT	hypoxanthine phosphorybosyltransferase	Senso	GAA AAG GAC CCC ACG AAG TGT	NM_000194.2
		Antissenso	AGT CAA GGG CAT ATC CTA CAA CA	

Os experimentos foram realizados a partir de 3-6 amostras de cDNA por linhagem após a conversão do RNA isolado em dias e passagens diferentes. Todas as reações foram feitas em triplicata. O limiar (*threshold*) para detecção da fluorescência foi ajustado manualmente para comparação dos Ct (*cycle threshold*) entre os experimentos independentes. Define-se como Ct a intersecção entre o limiar da fluorescência e a curva de amplificação, dentro de uma faixa exponencial de detecção da fluorescência. Os valores foram calculados conforme o método ΔΔCt (Pfaffl, 2001), considerando a eficiência da reação e os valores de Ct, de acordo com a equação (8):

$$\Delta\Delta\mathrm{Ct}_{alvo/ref} = \frac{\mathrm{E}_{alvo}^{\Delta\mathrm{Ct}\,alvo(\mathrm{controle-inquirido})}}{\mathrm{E}_{ref}^{\Delta\mathrm{Ct}\,ref(\mathrm{controle-inquirido})}} \quad (8)$$

onde, **E** é a eficiência da reação de cada par de iniciadores, **ΔCt** é diferença entre os Ct (o número de ciclos no qual a fluorescência foi detectada de acordo com um limiar de detecção pré-estabelecido), **alvo** é o gene questionado, **ref** é o gene *housekeeping* ou normalizador, **controle** é a linhagem celular selvagem (MRC-5 ou AS405), e **inquirido** é a linhagem celular XP-C (XP4PA-SV, XP4PA-XPC ou XP17VI).

O teste estatístico usado para comparar as médias dos valores de ΔΔCt foi o teste *t* de Student's para observações não-pareadas. Foi estabelecido o valor de $p<0,05$ como suficiente para existir uma diferença estatística significativa.

3.16.2 Análise do Número de Cópias e Frequência de Deleção de mtDNA

O DNA das linhagens MRC-5, XP4PA-SV, XP4PA-XPC, XP12RO, AS405 e XP17VI, foi isolado com auxílio do kit DNeasy Blood & Tissue seguindo as instruções do fabricante (Qiagen®). As amostras foram quantificadas em espectrofotômetro NanoDrop 1000.

As reações foram realizadas com o kit *2X SYBR® Green PCR Master Mix* (Applied Biosystem®). Cada 25 µL de reação contém 12,5 µL 2X SYBR® Green PCR Master Mix, 5 pmoles de cada iniciador e 20 ng de DNA template. Os genes escolhidos para a análise foram: *HPRT* ou *NCAPD2* para o controle de carregamento de nDNA, *MT-ND1* para análise do número de cópias de mtDNA e *MT-ND4L* para análise da frequência de deleção em mtDNA (Tabela 3). O gene *MT-ND4L* foi escolhido como marcador de deleção devido à alta suscetibilidade de deleção da região genômica na qual ele se encontra em humanos (Damas et al., 2012).

Tabela 3 – Relação dos genes mitocondriais e nucleares e sequência dos iniciadores utilizados nas reações de qPCR.

Gene	Nome do Gene	Sequência		NCBI RefSeq
MT-ND1	mitochondrially encoded NADH 1 dehydrogenase	Senso	ACT ACG CAA AGG CCC CAA CG	NC_012920.1
		Antissenso	GAG CTA AGG TCG GGG CGG TG	
MT-ND4L	mitochondrially encoded NADH 4L dehydrogenase	Senso	ACC CCT CAA CAC CCA CTC CCT CTT	NC_0111137.1
		Antissenso	TAG GCC CAC CGC TGC TTC GC	
HPRT	hypoxanthine phosphoribosyltransferase	Senso	TGA CAT GTG CCG CCT GCG AG	NC_000023.11
		Antissenso	GTG GTC GCT TTC CGT GCC GA	
NCAPD2	non-SMC condensin I complex, subunit D2	Senso	ATG GTT GCC ACT GGG GAT CT	NC_000012
		Antissenso	TGC CAA AGC CTA GGG GAA GA	

Para o número de cópias de mtDNA, o gene alvo é *MT-ND1* e o gene referência é *HPRT* ($\Delta\Delta Ct_{MT\text{-}ND1/HPRT}$). Para a frequência de deleção de mtDNA, o gene alvo é *MT-ND4L* e o gene referência é *MT-ND1* ($\Delta\Delta Ct_{MT\text{-}ND4L/MT\text{-}ND1}$).

Foram realizados de 3-4 experimentos independentes a partir de 4-6 amostras de DNA isoladas em dias e passagens diferentes. Todas as reações foram realizadas em triplicata. O limiar (*threshold*) para detecção da fluorescência foi ajustado manualmente para comparação dos Ct entre os experimentos independentes. Os valores foram calculados conforme o método $\Delta\Delta Ct$, considerando a eficiência da reação e os valores de Ct, de acordo com a equação (4) descrita na seção anterior (3.16.2.3).

3.16.3 PCR de Fragmento Longo (XL-PCR)

Esse ensaio foi realizado de acordo com Kovalenko & Santos (2009) com pequenas modificações. O DNA foi isolado conforme descrito na seção anterior. Cada 50 µL de reação consistiu em 15 µL de 3,3X XL PCR buffer, acetato de magnésio 1,3 mM, BSA 100 µg/mL, 20 pmoles de cada iniciador, dNTPs 200 nM, 15 ng de DNA alvo e q.s.p. 45 µL de água deionizada estéril livre de RNase e DNase (GeneAmp® XL PCR Kit – Applied Biosystems®). Em termociclador MJ Research PTC-0150 MiniCycler (MJ Research, Inc), as reações foram iniciadas pela técnica "*Hot-Start*" adicionando-se 5 µL de 0,2 U/µL de r*Tth* DNA polymerase XL (1 U) na reação, a 75 °C, 90 s após o aquecimento. O protocolo experimental utilizado para amplificação do fragmento de 16,3 kbp de mtDNA foi: 26 ciclos de desnaturação a 94 °C por

30 s, anelamento a 64 °C por 30 s e amplificação a 68 °C por 12 min. Para detecção de danos no nDNA amplificamos um fragmento de 10,4 kbp no gene *HPRT* utilizando os seguintes parâmetros: 31 ciclos de desnaturação a 94 °C por 30 s, anelamento a 64 °C por 30 s e amplificação 68 °C por 12 min. Os pares de iniciadores estão apresentados na tabela 4.

Tabela 4 – Relação dos iniciadores baseado na região genômica amplificada e sequência dos iniciadores utilizados nas reações de XL-PCR.

Iniciador	Sequência		Accession no.
XL-mtDNA	Senso	TGA GGC CAA ATA TCA TTC TGA GGG GC	J01415
	Antissenso	TTT CAT CAT GCG GAG ATG TTG GAT GG	
XL-HPRT	Senso	TGG GAT TAC ACG TGT GAA CCA ACC	J00205
	Antissenso	GCT CTA CCC TCT CCT CTA CCG TCC	

Por fim, 20 µL da reação foram misturados com 4 µL de *6X Orange DNA Loading Dye*, aplicados em gel de agarose 0,8% diluído em tampão TAE e submetidos a eletroforese de 5-7 V/cm por 4 h. No término da corrida eletroforética, o gel foi corado por 30 min em solução de 5 µM de brometo de etídeo e descorado por 10 min em água deionizada. As intensidades das bandas foram analisadas através do programa ImageJ. Os valores de fluorescência foram corrigidos a partir dos Cts obtidos nas reações de qPCR com os genes *ND1* e *HPRT*, para normalização dos fragmentos mitocondrial e nuclear, respectivamente.

4 RESULTADOS

4.1. ENSAIO *IN VITRO* DE CINÉTICA DE INCISÃO EM DNA PLASMIDIAL (ECID)

4.1.1. Caracterização dos Danos Induzidos em DNA Plasmidial

Uma das hipóteses iniciais deste trabalho propunha que a proteína XPC desempenhava um papel direto em reparo de bases oxidadas no mtDNA. Desta forma, propusemos estabelecer um ensaio *in vitro* para medir essa atividade de reparo em extratos mitocondriais. Para tal, padronizamos um ensaio de indução de danos gerados oxidativamente em DNA plasmidial, utilizando-se das propriedades fotoquímica do AM. Essa molécula, pertencente à classe dos corantes fenotiazínicos, é um fotossensibilizador capaz de gerar oxigênio singlete ($^1O_2$) com alto rendimento quântico quando fotoativado. O oxigênio molecular em seu estado singlete é altamente reativo, o que acarreta na formação de bases oxidadas, principalmente 8-oxoGua, no DNA (Severino et al., 2003). O ensaio consiste em monitorar a conversão de DNA plasmidial, tratado com AM, em sua forma relaxada após sua incubação com DNA glicosilases específicas, que introduzem quebras de fita simples em sítios contendo bases oxidadas.

A figura 10 representa a corrida eletroforética de um experimento de padronização de danos induzidos pelo AM. O DNA plasmidial fotossensibilizado não-tratado com DNA glicosilases serviu de controle para se subtrair as quebras de fita induzidas simplesmente através do tratamento com o AM. Apesar do $^1O_2$ *per se* não gerar quebra de fita simples de DNA, reações colaterais podem induzir subespécies reativas que a fazem (Epe, 1991).

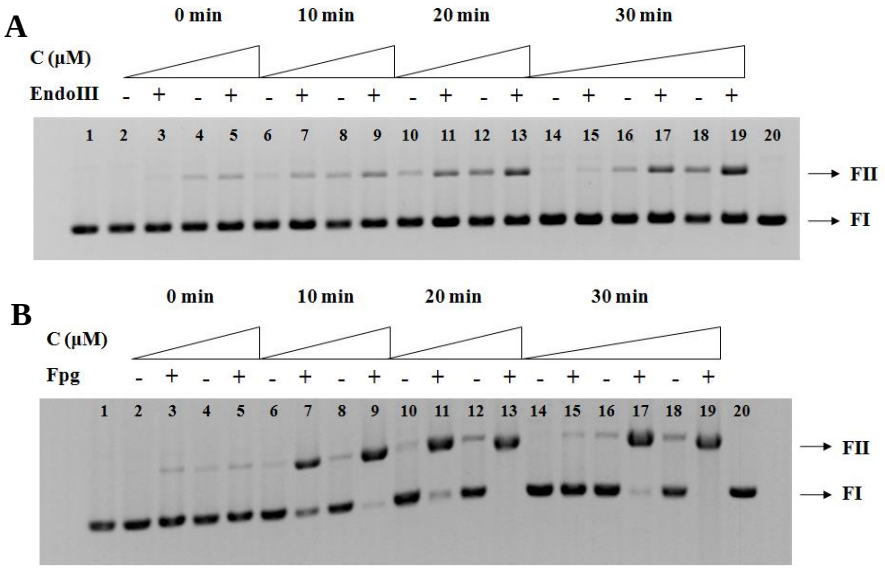


Figura 10 – Exemplo representativo de determinação de lesões de DNA induzida por fotossensibilização de AM. As amostras foram submetidas à geração crescente de $^1O_2$ e então tratadas com EndoIII (A), Fpg (B) ou BSA (todas as colunas com o símbolo -). Cada par - + representa a mesma concentração de AM com a qual se tratou o DNA plasmidial, submetido (+) ou não (-) a reação contendo a DNA glicosilase: 1 e 20) pBR322 não-tratado, 2 e 3) 0 µM, 4 e 5) 50 µM, 6 e 7) 10 µM, 8 e 9) 50 µM, 10 e 11) 10 µM, 12 e 13) 50 µM, 14 e 15) 0 µM, 16 e 17) 10 µM, 18 e 19) 50 µM. O tempo de fotoexcitação do AM está representado acima: 2-5) 0 min (escuro), 6-9) 10 min, 10-13) 20 min, 14-19) 30 min. FI representa a topologia superenovelada e FII a relaxada.

Observou-se que o tratamento na concentração de 50 µM de AM com 20 min de fotossensibilização causou ao menos um sítio reconhecível por Fpg por plasmídeo (no nível de detecção do ensaio). Desse modo, não foi possível construir uma curva dose-resposta incluindo os valores de 50 µM de AM (Fig. 11 A), devido à saturação do sistema. Por sua vez, o mesmo tratamento não foi capaz de induzir lesões sensíveis à EndoIII suficientes a ponto de saturar o sistema. Foi possível construir uma curva dose-resposta conforme demonstrado na figura 11 B. Observou-se uma relação diretamente proporcional entre tempo de fotossensiblização do corante e o número de sítios reconhecidos pela EndoIII, mas não com relação à concentração.

Esses dados confirmam observações de outros grupos de que a Gua em DNA dupla fita é particularmente sensível ao ataque do $^1O_2$ gerado pela fotossensibilização do azul de metileno (Floyd et al., 1989; Ravanat & Cadet, 1995). De fato, poucos sítios sensíveis à EndoIII também foram observados por outros autores (Pflaum et al., 1994).

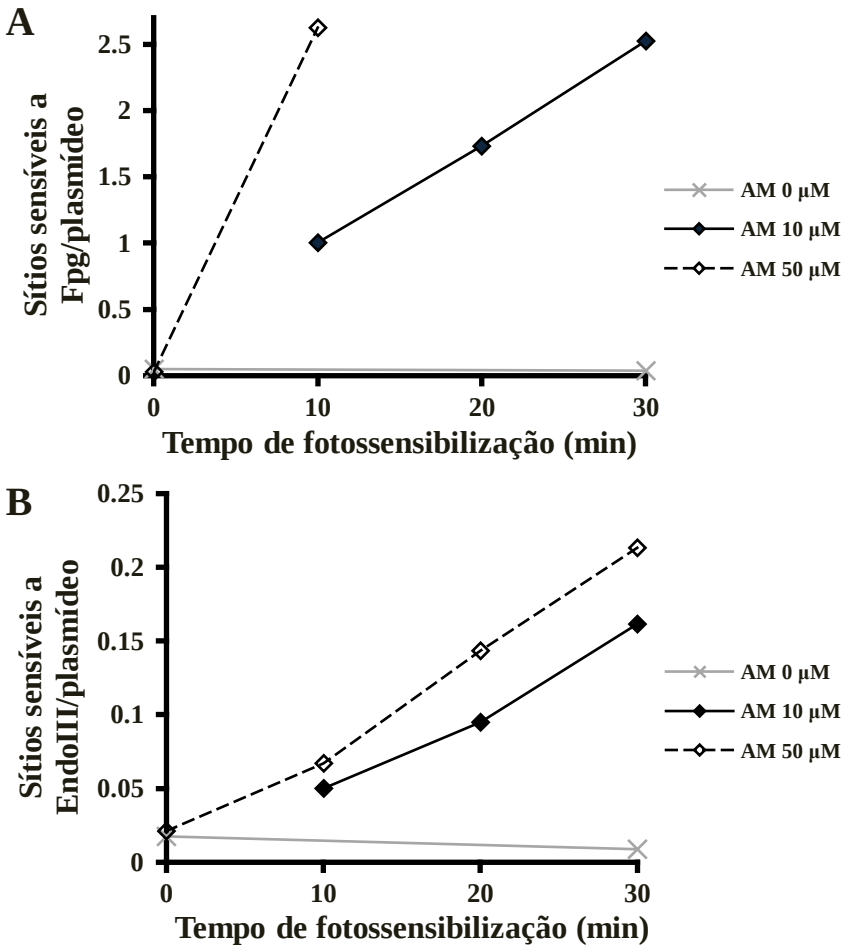


Figura 11 – Indução de lesões em DNA plasmidial pela fotossensibilização do AM. A) Sítios sensíveis a Fpg. Com 20 min de fotossensibilização com 50 µM de AM não foi detectável resquício de banda de DNA plasmidial na forma superenovelada após tratamento com Fpg. **B)** Sítios sensíveis a EndoIII.

A partir desses dados, 10 µM de AM fotossensibilizado por 10 min foi a condição de tratamento escolhida para a padronização dos ensaios *in vitro* de cinética de incisão em DNA plasmidial, uma vez que o substrato de DNA plasmidial apresentaria, em média, um sítio sensível a Fpg (1,002) e EndoIII (0,050).

4.1.2 Confirmação da Pureza das Frações Mitocondriais

Em ensaios *in vitro* de atividade de BER em extratos mitocondriais é de extrema importância prevenir-se de qualquer contaminação nuclear a fim de evitar-se que as proteínas nucleares contribuam para a atividade medida (Maynard et al., 2010). Deste modo, todas as preparações mitocondriais são testadas para contaminação nuclear antes de sua utilização, através da detecção de proteínas nucleares na preparação mitocondrial como indicador de

contaminação. A figura 12 exemplifica um fracionamento mitocondrial bem sucedido com células MRC-5 e XP4PA-SV. Usamos dois marcadores nucleares, lamin B2 e PCNA, e um marcador mitocondrial, ATPB. Apesar de ter sido detectada uma pequena quantidade de Lamin B2 nas frações mitocondriais de XP4PA-SV, essa não ultrapassou 5% do sinal da fração nuclear conforme verificado por densitometria das bandas no programa ImageJ. É importante ressaltar que a presença de proteínas mitocondriais na fração nuclear é resultado da contaminação desta com células não rompidas. No entanto, como a fração nuclear é utilizada apenas como controle positivo para as proteínas nucleares, essa contaminação não influencia nos resultados funcionais.

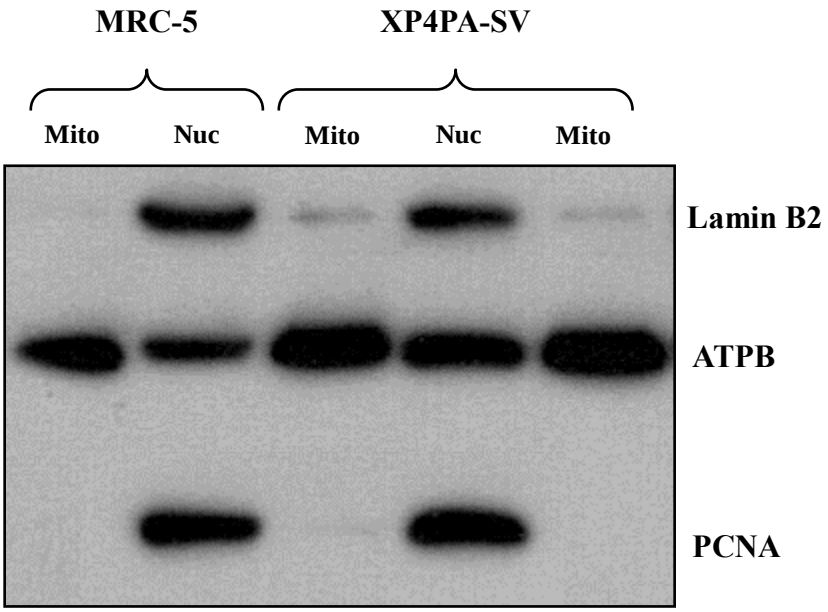


Figura 12 – Pureza de frações mitocondriais após isolamento por centrifugação diferencial em gradiente de densidade. Western blot representativo de um isolamento mitocondrial de células MRC-5 e XP4PA-SV. Em cada canaleta foi adicionado 10 μg de proteína das frações mitocondriais ou nucleares isoladas de fibroblastos da linhagem MRC-5 ou XP4PA-SV. Mito: canaletas contendo frações mitocondriais. Nuc: canaletas contendo frações nucleares.

4.1.3 Padronização do ECID

Após a confirmação da pureza das frações mitocondriais seguiu-se o processo de preparação dos extratos proteicos mitocondriais (EPM) para realizar os ensaios de reparo de DNA *in vitro*. Inicialmente, utilizamos diferentes concentrações do extrato proteico para padronizar o ensaio. A figura 13 mostra que nas condições inicialmente testadas, a concentração de 20 μg de proteína apresentava uma atividade endonucleolítica pronunciada, degradando o DNA plasmidial controle (que não sofreu indução de danos através de fotossensibilização por AM – canaleta 3).

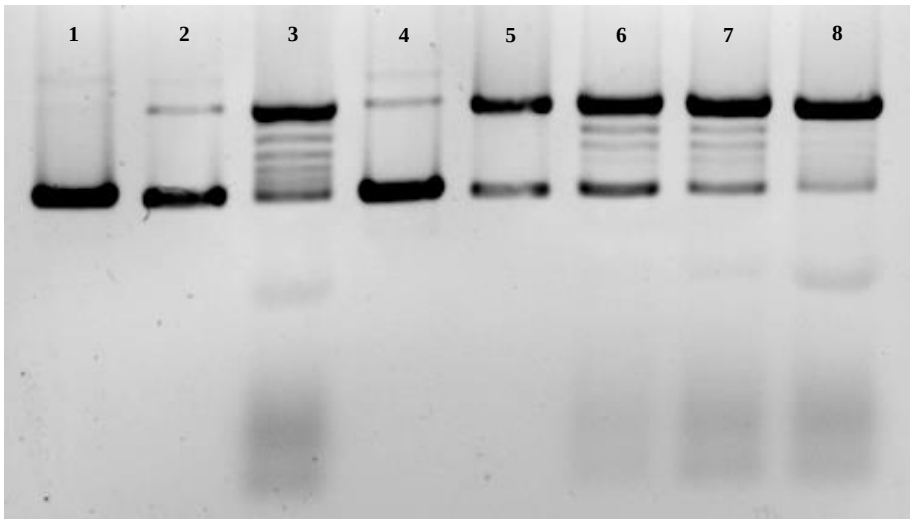


Figura 13 – **Experimento piloto dos ensaios *in vitro* de cinética de incisão em DNA plasmidial**. Após o processamento dos extratos mitocondriais, diferentes quantidades de proteína foram utilizadas para padronização do ensaio. **1**) pBR322 não-tratado; **2**) pBR322 não-tratado + 1 U de Fpg; **3**) pBR322 não-tratado + 20 μg de EPM de XP4PA; **4**) pBR322 com 10 μM de AM fotossensibilizado por 10 min (tratado); **5**) pBR322 tratado + 1 U de Fpg; **6**) pBR322 tratado + 5 μg EPM de XP4PA; **7**) pBR322 tratado + 10 μg EPM de XP4PA; **8**) pBR322 tratado + 20 μg EPM de XP4PA. As amostras incubadas com EPM foram incubadas a 37 °C durante 4 h. Notam-se a presença de DNA degradado nas canaletas 3, 6, 7 e 8 por ação de inespecífica de nucleases.

Duas modificações foram adicionadas ao protocolo experimental: adicionamos 10 mM de EDTA, ao invés de 5 mM (a fim de quelar os metais divalentes de Ca^{2+} e Mg^{2+}), e 1 μg de poli-d(I)d(C) (para sequestrar a atividade inespecífica de nucleases). Nessas novas condições, a atividade endonucleolítica inespecífica dos extratos mitocondriais diminuiu consideravelmente, de modo que a proporção de DNA plasmidial na forma relaxada pode correlacionar diretamente com o tempo de incubação do substrato tratado com AM e fotossensibilizado (Fig. 14 A). Desse modo, foi construída uma curva de cinética de incisão em DNA plasmidial já subtraindo o controle-negativo (Fig. 14 B).

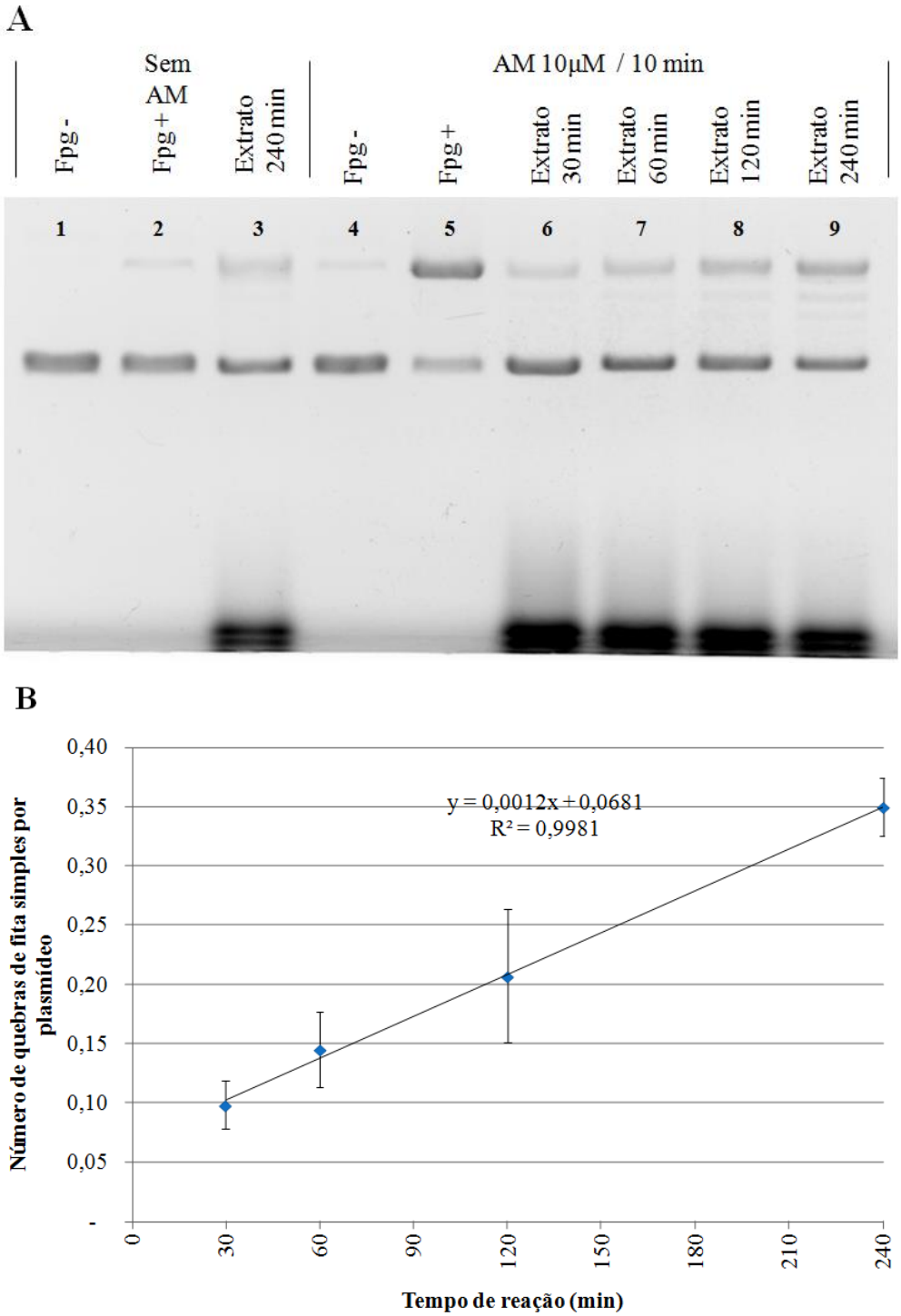


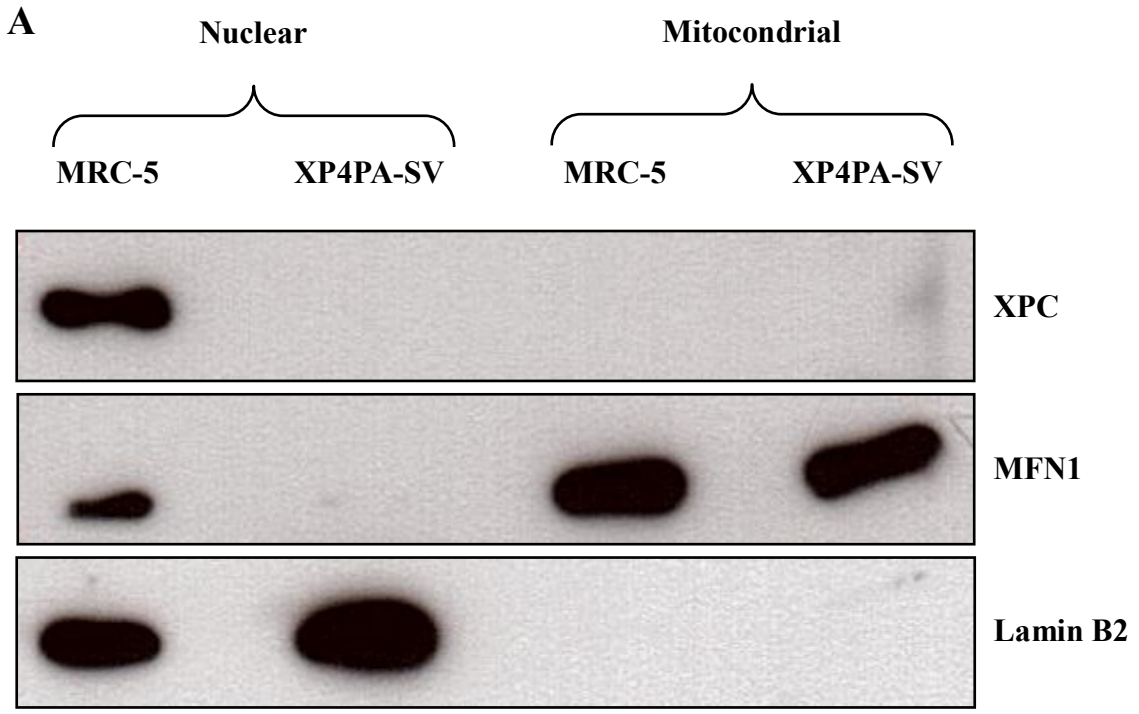
Figura 14 – **Padronização do Ensaio *in vitro* de Cinética de Incisão em DNA plasmidial**. **A)** Gel demonstrativo de um experimento de cinética de incisão em DNA plasmidial. **1**) pBR322 não-tratado; **2**) pBR322 não-tratado + 1 U de Fpg; **3**) pBR322 não-tratado + 5 µg de EPM de XP4PA por 240 min; **4**) pBR322 com 10 µM de AM fotossensibilizado por 10 min (tratado); **5**) pBR322 tratado + 1 U de Fpg; **6**) pBR322 tratado + 5 µg EPM de XP4PA durante 30 min; **7**) pBR322 tratado + 5 µg de EPM de XP4PA por 60 min; **8**) pBR322 tratado + 5 µg de EPM de XP4PA por 120 min; **9**) pBR322 tratado + 5 µg de EPM de XP4PA por 240 min. **B**) Cinética de incisão em DNA plasmidial pBR322 tratado com 10 µM de AM fotossensibilizado por 10 min. Os sítios sensíveis foram quantificados por ImageJ e normalizados subtraindo o controle negativo (atividade inespecífica de nuclease). Os valores são apresentados como média ± desvio padrão (n=2)

4.2 Análise da Localização Subcelular de XPC

Após a padronização do ECID, começamos os nossos experimentos partindo das seguintes observações anteriores: i) sabendo que OGG1 é a principal DNA glicosilase a participar no reparo de 8-oxoGua em mtDNA (de Souza-Pinto et al., 2001) e que ii) XPC interage fisicamente e funcionalmente com OGG1 no núcleo (D'Errico et al., 2006); estaria XPC auxiliando a atividade de OGG1 na mitocôndria? Para responder essa pergunta, investigamos, por Western blot, a presença ou não de XPC em frações mitocondriais altamente purificadas.

No entanto, pode-se ver claramente na figura 15 A que mitocôndrias da linhagem selvagem, MRC-5, não apresentam qualquer sinal para XPC. Igualmente, experimentos de imunofluorescência indicam a presença majoritária de XPC no núcleo, e talvez, uma presença minoritária no citoplasma (Fig. 15 B). Porém, o sinal citoplasmático de XPC em células MRC-5 muito provavelmente representa uma ligação inespecífica do anticorpo secundário, uma vez que células XP4PA-SV, que não apresentam níveis detectáveis da proteína XPC, quando avaliado por Western blot (Fig 15 A), também apresentam uma fluorescência basal.

Esses resultados indicam que XPC, pelo menos em condição padrão de cultura, não se localiza em mitocôndria de células humanas. Desta forma, um papel direto de XPC sobre a atividade de OGG1 mitocondrial não seria possível.



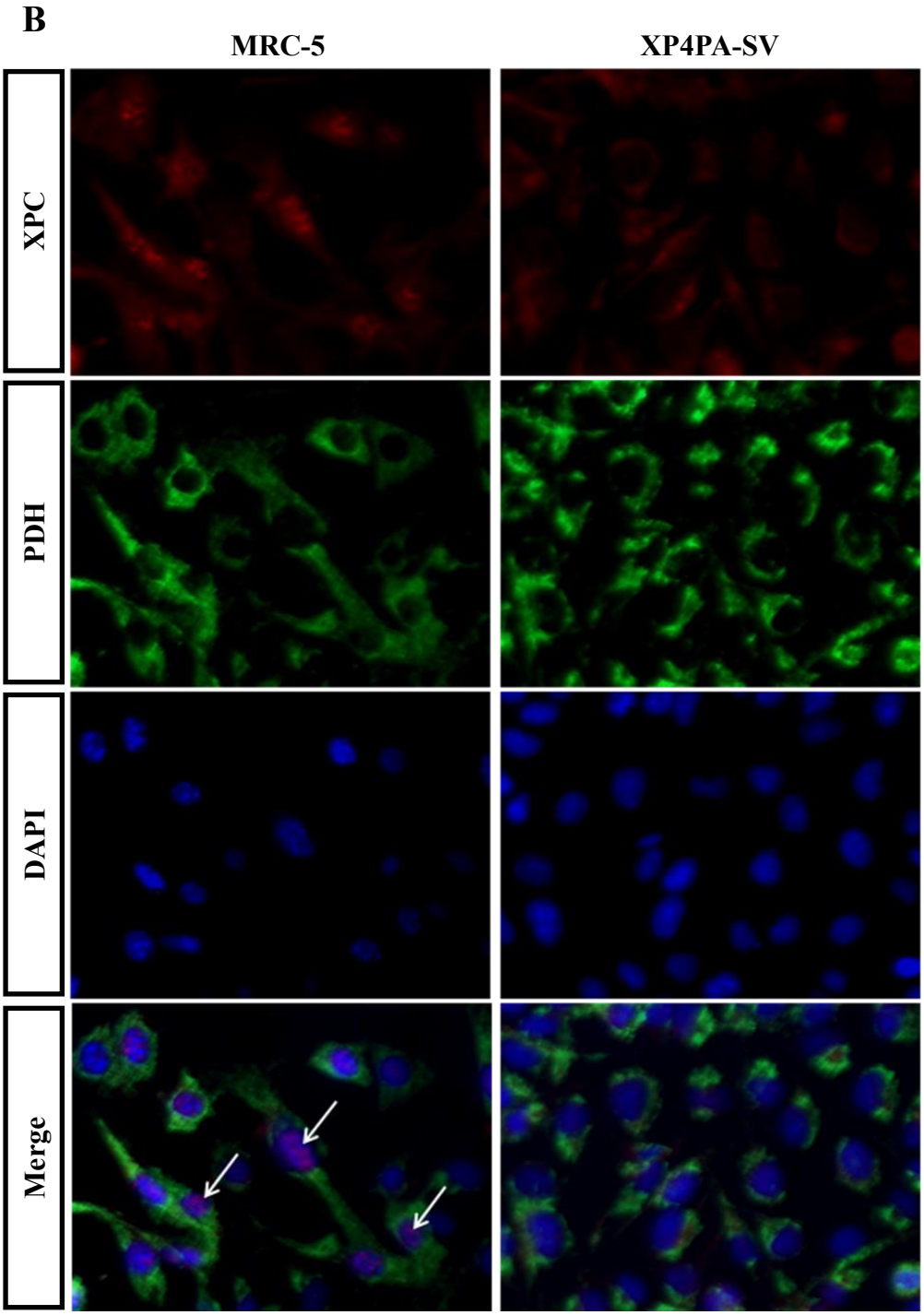


Figura 15 – Localização subcelular da proteína XPC. A) Western blot de frações mitocondriais e nucleares das linhagens MRC-5 e XP4PA-SV. Foram usados anticorpos primários contra XPC, mitofusin-1 (como controle mitocondrial – MFN1) e lamin B2 (como controle nuclear). As frações mitocondriais purificadas das células MRC-5 não apresentaram sinal para XPC, ao contrário das frações nucleares que tiveram um sinal consistente. Como esperado, na linhagem XP4PA, mutante para XPC, não foi detectado sinal da proteína XPC em qualquer um dos dois compartimentos celulares investigados. **B)** Imunofluorescência de células MRC-5 e XP4PA. Foram usados os anticorpos primários contra XPC e piruvato desidrogenase (PDH). Os ensaios demonstraram a presença da proteína XPC no núcleo, conforme esperado e indicado pelas flechas brancas. Esses experimentos foram feitos em parceria com a Dra Rute A. P. Costa e também foram utilizados em sua tese de doutorado (2013).

4.3 Análise da Sensibilidade de Células XP-C a Estresse Redox Mitocondrial

4.3.1 Ensaios de Sobrevivência Celular Clonogênica

Em um estudo-piloto conduzido anteriormente pela Prof. Dra Nadja C. de Souza-Pinto em colaboração com a Dra Tinna Stevsner da University of Aarhus, Dinamarca, dados preliminares indicaram que duas linhagens primárias de fibroblastos isolados de paciente XP-C eram mais sensíveis a diversas toxinas mitocondriais do que as linhagens selvagens – AA e ROT, o desacoplador protonóforo CCCP e o ionóforo de potássio valinomicina. Dessa forma, uma das propostas iniciais foi avaliar a sensibilidade de células XP-C frente a danos induzidos no mtDNA.

O conhecimento da estrutura molecular do AM prontificou vários estudos a analisarem a sua capacidade de se localizar em compartimentos celulares. O caráter de cátion lipofílico desse corante é responsável pela sua atração a ambientes eletroquímicos negativos, como a matriz mitocondrial (Kowaltowski et al., 1999; Kandela et al., 2002). Aliás, o elevado potencial de membrana da mitocôndria (180 mV) a torna particularmente suscetível à compartimentalização dessa molécula, concentrando-a cerca de 1.000 vezes em sua matriz em relação ao citosol (Gabrielli et al., 2004). Essa abordagem vem sendo utilizada no nosso laboratório para a indução seletiva de danos no mtDNA. Nosso grupo tem utilizado um protocolo de tratamento que se baseia na permanência do AM exclusivamente em mitocôndrias após retirada do meio contendo o AM, e a lavagem das células com PBS para remoção do excesso de AM no citosol e no núcleo. Em sua dissertação de mestrado, Ms. Carolina Domeniche Romagna demonstrou que, além de colocalizar em mitocôndrias de células HeLa, o AM incorporado é capaz de gerar $^1O_2$ verificado pela formação do endoperóxido de 9,10-difenilantraceno (Costa et al., 2011; Romagna, 2012). Além disso, células HEK293T tratadas com AM e fotossensibilizadas apresentam significativamente mais danos no mtDNA analisado pela diminuição no rendimento de amplificação por PCR de um fragmento longo de 16,3 quilo pares de base (kpb), do que o genoma nuclear (Tonolli, 2013).

Na ausência de fotossensibilização, o tratamento das células com AM não resultou em diminuição no ISC em células selvagens. Porém, células XP4PA-SV e XP4PA-XPC apresentaram uma pequena citotoxicidade na concentração de AM 20 μM, em tratamento controle não-fotossensibilizado (Fig 16 A). Nos tratamentos com AM fotossensibilizado por 30

min, foi possível verificar em todas as linhagens uma curva clássica de morte concentração-dependente (Fig. 16 B). Na comparação entre linhagens, as células XP4PA-SV foram mais sensíveis ao tratamento com AM 20 μM quando comparadas à linhagem MRC-5 (p<0,05). Essa maior sensibilidade aos danos induzidos por AM não foi revertida na linhagem XP4PA-XPC, apesar dessas apresentarem um pequeno aumento na taxa de sobrevivência quando comparadas com as células deficientes em XPC.

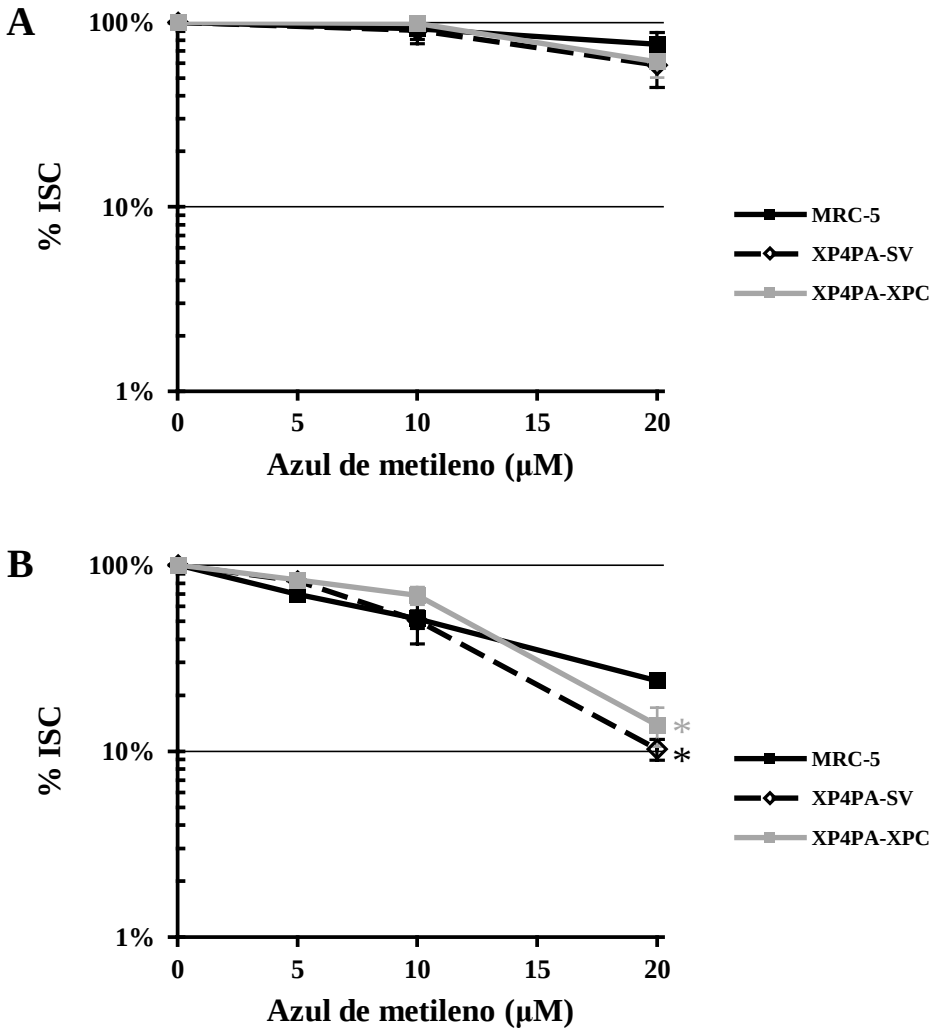


Figura 16 – **Ensaio de sobrevivência clonogênica em tratamento com AM**. **A)** Células MRC-5, XP4PA-SV e XP4PA-XPC tratadas com duas concentrações de AM (10 e 20 μM) e incubadas no escuro, como controle de fotossensibilização. **B)** Células MRC-5, XP4PA-SV e XP4PA-XPC tratadas com três concentrações de AM (5, 10 e 20 μM) e fotossensibilizadas por 30 min. Os valores são apresentados como média ± e.p.m. (n=3).
* diferença estatisticamente significativa em comparação com MRC-5 (p<0,05).

Porque o AM pode ser incorporado diferentemente dependendo da linhagem celular, resolvemos tratar as células com estressores mitocondriais clássicos como a ROT e AA, inibidores dos complexos I e III, respectivamente, que também induzem estresse redox (Kowaltowski et al., 2009).

Células XP-C tratadas com AA foram mais sensíveis do que a linhagem selvagem, nas concentrações de 1,0 e 2,0 μM ($p<0,05$). A correção do defeito genético de XP-C resultou na recuperação da sensibilidade a AA das células XP4PA-XPC aos níveis da linhagem selvagem (Fig. 17 A).

No protocolo de tratamento com ROT, novamente, a linhagem XP4PA-SV foi mais sensível do que MRC-5. No entanto, esses experimentos necessitam de mais repetições, uma vez que, em outros dois experimentos independentes, obtivemos uma baixa eficiência de plaqueamento para a linhagem XP4PA-SV. Mesmo assim, ao contrário do tratamento com AA, células XP4PA-XPC não foram igualmente sensíveis à selvagem (Fig. 17 B). O tratamento nas duas maiores concentrações de ROT, 0,75 e 1,00 μM, foram mais citotóxicos para a linhagem corrigida do que para MRC-5 ($p<0,05$). Esses resultados indicam existir uma variação na resposta ao estresse redox mitocondrial, dependendo do modelo adotado. Se por um lado, a ausência da proteína XPC sensibiliza as células a estresse mitocondrial via inibição do complexo III, e em menor grau via complexo I, indicando um possível papel protetor, XPC não participa da proteção contra danos no mtDNA infligidos por $^1O_2$.

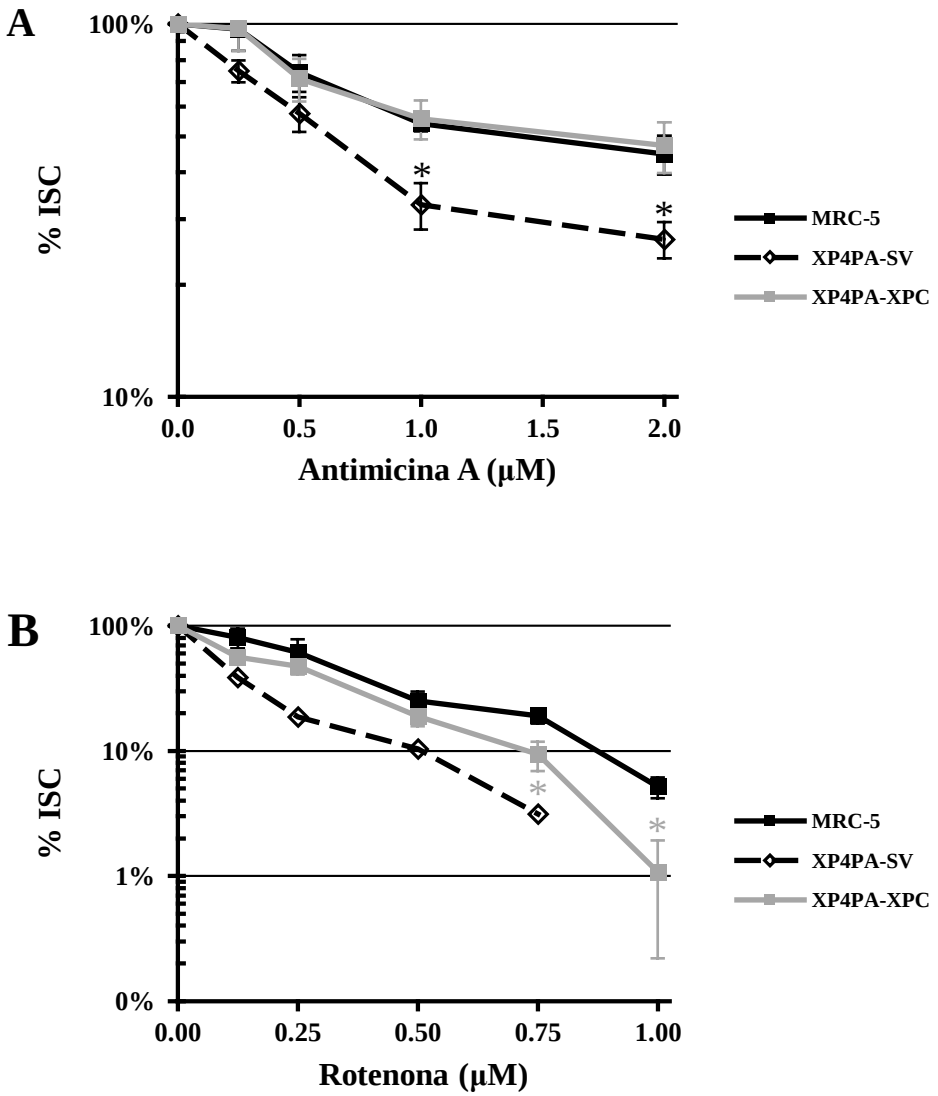


Figura 17 – Ensaio de sobrevivência clonogênica em tratamento com inibidores dos complexos I e III. **A)** Células MRC-5, XP4PA-SV e XP4PA-XPC tratadas com cinco concentrações de AA (0,25; 0,5; 1,0; 2,0 e 4,0 µM) por 4 h. Os valores são apresentados como média ± e.p.m. (n=3). **B)** Células MRC-5, XP4PA-SV e XP4PA-XPC tratadas com três concentrações de ROT (0,125; 0,25; 0,50; 0,75 e 1,00 µM). Os valores são apresentados como média ± e.p.m. (MRC-5 e XP4PA-XPC n=3; XP4PA-SV n=1).
* diferença estatisticamente significativa em comparação com MRC-5 (p<0,05).

4.3.2 Teste de Redução do MTT

Utilizando as linhagens de MDF, avaliamos também se ausência de Xpc em modelo murino (*Xpc*$^{-/-}$) tornaria as células mais sensíveis ao estresse redox mitocondrial do que a linhagem selvagem (*Xpc*$^{+/+}$). Apesar de observarmos uma tendência ao aumento de citotoxicidade na linhagem *knockout* para *Xpc*, a diminuição no %ISC não atingiu o nível de significância estatística (Fig. 18). Devemos considerar, porém, que foram feitos apenas dois experimentos independentes, o que restringe o poder estatístico do teste *t*. Para nossa surpresa,

a linhagem heterozigoto $Xpc^{+/-}$ foi mais sensível que a $Xpc^{+/+}$ nas concentrações de 10 e 20 µM (p<0,05). Esses resultados apontam para um efeito de haploinsuficiência ou desequilíbrio na via de reparo que sensibiliza as células ao estresse redox mitocondrial.

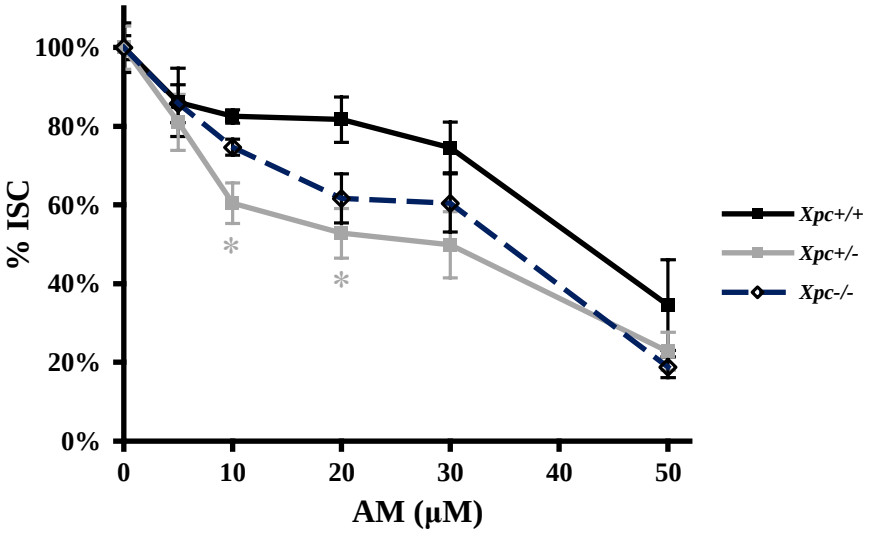


Figura 18 – Índice de sobrevivência celular medido pela redução do MTT em MDFs após o tratamento com AM fotossensilibizado. MDF $Xpc^{+/+}$, $Xpc^{+/-}$ e $Xpc^{-/-}$ foram tratadas com cinco concentrações de AM (5, 10, 20, 30 e 50 µM) por 1 e, após lavagem com PBS, sensibilizadas por 30 min. Os valores são apresentados como média ± e.p.m. (n=2).
* diferença estatisticamente significativa em comparação com $Xpc^{+/+}$ (p<0,05).

4.3.3 Número e Tempo de Duplicação da População Celular (NDPC)

Utilizando ainda MDFs investigamos o papel da proteína Xpc no crescimento celular em duas condições de cultivo, em normóxia (3% de O_2) ou hiperóxia (20% de O_2), que é a condição padrão da maioria das culturas celulares mantidas sob atmosfera ambiente. A figura 19 apresenta um gráfico de NDPC por tempo de cultura de um experimento independente. Devido a problemas técnicos com a estufa de O_2, não pudemos concluir os experimentos com o número de repetições adequado.

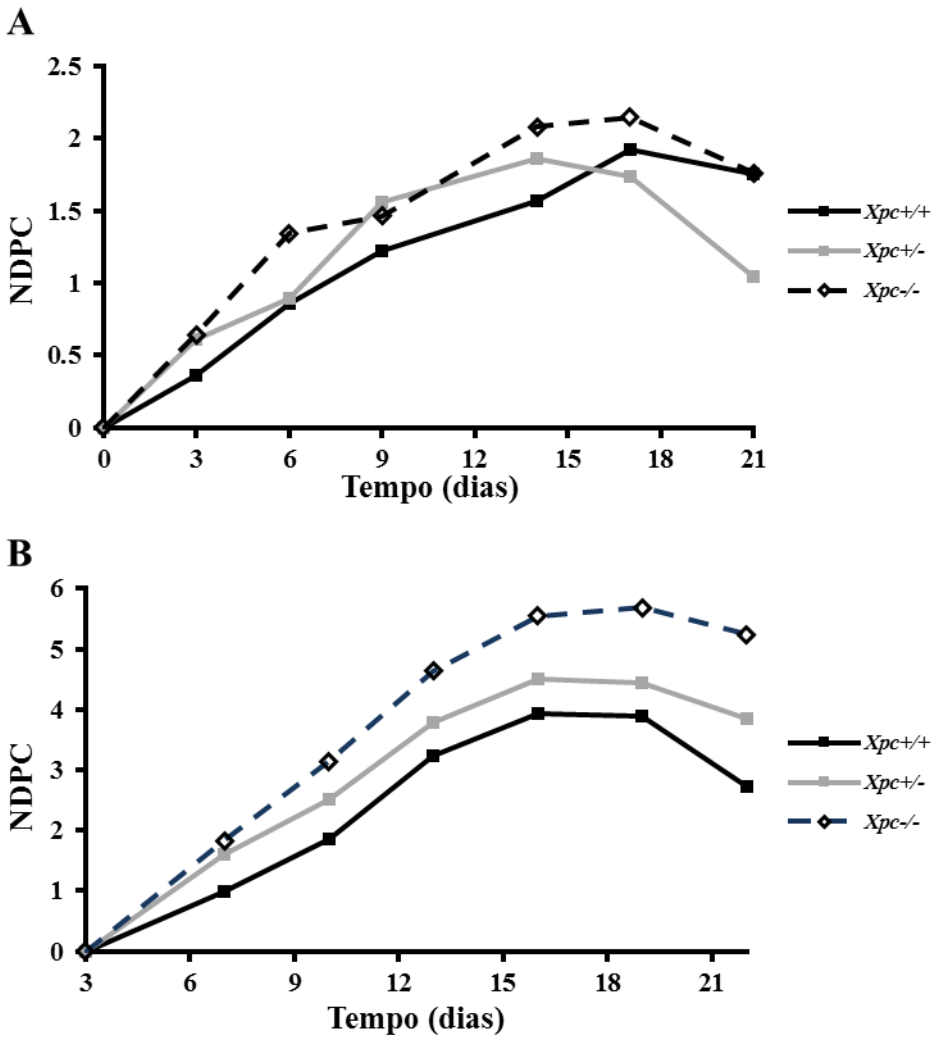


Figura 19 – Número de duplicações da população celular (NDPC). A) MDFs *Xpc*$^{+/+}$, *Xpc*$^{+/-}$ e *Xpc*$^{-/-}$ cultivados em estufa com 20% de O_2. **B)** MDFs *Xpc*$^{+/+}$, *Xpc*$^{+/-}$ e *Xpc*$^{-/-}$ cultivados em estufa com 3% de O_2.

O formato do gráfico na figura 19 B indica que, em condição de normóxia, apesar de todas as células entrarem em senescência proliferativa ao mesmo tempo, por volta do 15º dia, os MDFs *Xpc*$^{-/-}$ se dividem mais rapidamente do que MDFs selvagens. Realmente, o tempo de duplicação da população celular de fibroblastos *Xpc*$^{-/-}$ é 29,1% menor do que a linhagem selvagem ($Xpc^{+/+} = 3{,}31$; $Xpc^{+/-} = 2{,}88$ e $Xpc^{-/-} = 2{,}34$ dias). Por outro lado, em condição de hiperóxia, as 3 linhagens apresenram tempos de duplicação similares, o que sugere que essas condições de cultura podem mascarar efeitos sutis no ciclo celular decorrentes da ausência de proteínas de reparo.

4.4 Medida da Taxa de Consumo de Oxigênio

Uma vez que as células deficientes em XPC demonstraram maior sensibilidade a três agentes que induzem, primariamente, estresse redox mitocondrial, investigamos a integridade funcional das mitocôndrias nas linhagens celulares utilizadas. Para avaliar o funcionamento dos complexos da CTE na ausência de XPC, resolvemos fazer medidas de consumo de oxigênio em aparelho Oroboros® em células permeabilizadas em suspensão. Iniciamos os experimentos com substratos que fornecem elétrons ao carreador NADH, permitindo a entrada dos elétrons especificamente pelo complexo I (C-I), também conhecido como NADH desidrogenase. A OCR basal da linhagem XP4PA-SV era menor do que a da linhagem selvagem, assim como a OCR após permeabilização para captação do substrato (p<0,05) (Fig. 20). Essa menor OCR nas células XP4PA-SV em comparação a MRC-5 se mantém após adição de ADP para estimular a fosforilação via ATP sintase (p<0,05); e o consumo de O_2 é o mesmo nas duas linhagens quando inibidas com CAT (um inibidor da translocase de nucleotídeos de adenina – ANT1), indicando que a linhagem MRC-5 não apresenta maior taxa de respiração devido a um desacoplamento prévio (vazamento de H^+, *proton leak* em inglês). De fato, após o desacoplamento efetuado pela adição de FCCP, a velocidade de respiração da linhagem MRC-5 é significativamente maior do que as células de paciente XP-C. O controle respiratório, que é a razão entre a OCR fosforilativo (estado 3_{ADP}) e a OCR não-fosforilativo (estado 4_{Oligo}), é significativamente menor em células XP-C quando comparadas com MRC-5.

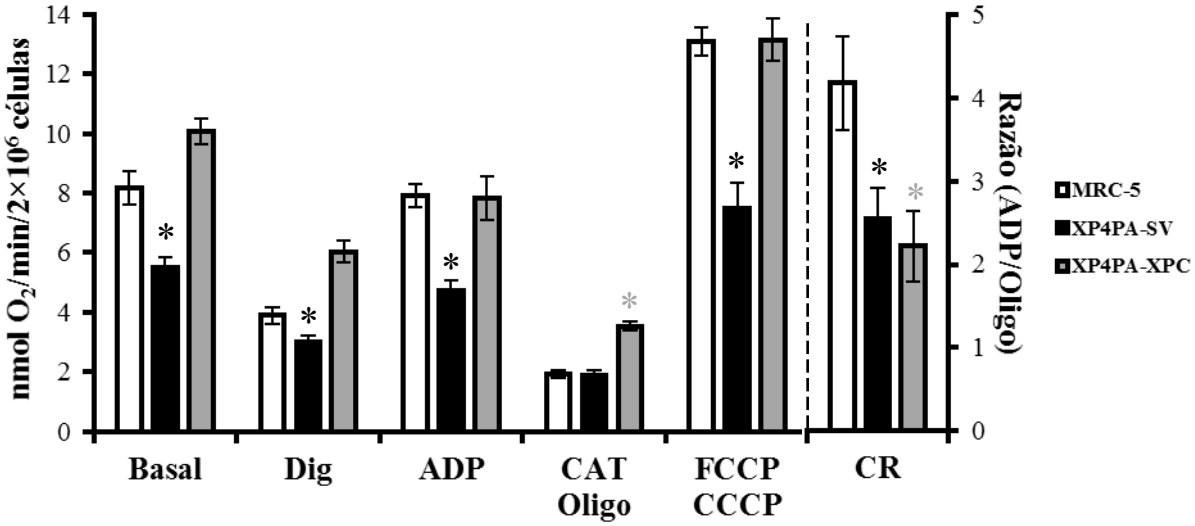


Figura 20 – OCR ligada a substratos de NADH em células MRC-5, XP4PA-SV e XP4PA-XPC. Os parâmetros respiratórios são: **Basal)** taxa respiratória com substrato endógeno, **Dig)** após permeabilização com digitonina 30 µM, **ADP)** após adição de ADP 100 µM para fosforilação (estado 3), **CAT/Oligo)** após a adição de CAT 4 µM ou oligomicina A 1 µM para inibição da ATPase (estado 4), **CCCP)** velocidade respiratória máxima após desacoplamento com CCCP 0,25 ou 1 µM, **CR)** controle respiratório, razão entre estado 3 e estado 4. Os valores são apresentados como média ± e.p.m. (MRC-5 e XP4PA-SV n=12; XP4PA-XPC n=4)
* diferença estatisticamente significativa em comparação com MRC-5 (p<0,05).

Quando avaliamos o impacto da correção de XPC na linhagem deficiente para essa proteína, observamos que todos os valores de OCR nos parâmetros respiratórios analisados retornaram a níveis comparáveis ao da linhagem selvagem, com exceção de OCR em estado 4. Fica patente que a presença de XPC é capaz de reverter a deficiência na respiração mitocondrial via complexo I. Não escapou à nossa atenção que XP4PA-XPC apresenta uma maior respiração em estado não-fosforilativo indicativo de um desacoplamento leve, refletindo assim no valor do controle respiratório, que foi igual entre XP4PA-SV e XP4PA-XPC (Fig. 20).

Em seguida dos experimentos de controle respiratório, analisamos as taxas de consumo de O_2 via complexos II e IV. Ao contrário do que foi observado para o C-I, ao iniciarmos o consumo de O_2 pela adição de succinato, as células XP4PA-SV respiravam mais do que a linhagem selvagem. Igualmente, a velocidade de respiração máxima do complexo II, após o desacoplamento com CCCP, foi significativamente maior do que MRC-5 ($p<0,05$). Por outro lado, células da linhagem XP4PA-XPC apresentam OCR semelhante à da linhagem selvagem, em todas as condições experimentais. Esse resultado favorece o argumento de que a menor taxa respiratória do complexo II em células selvagens não se deve à limitação dos complexos III e IV subsequentes na CTE. De fato, a OCR após a adição de AA, bloqueou igualmente o fluxo de elétrons e o consumo de O_2 em ambas as linhagens MRC-5 e XP4PA-SV. Valores similares de OCR em ambas as linhagens foram obtidos quando o complexo IV foi alimentado diretamente com TMPD/ascorbato (Fig. 21).

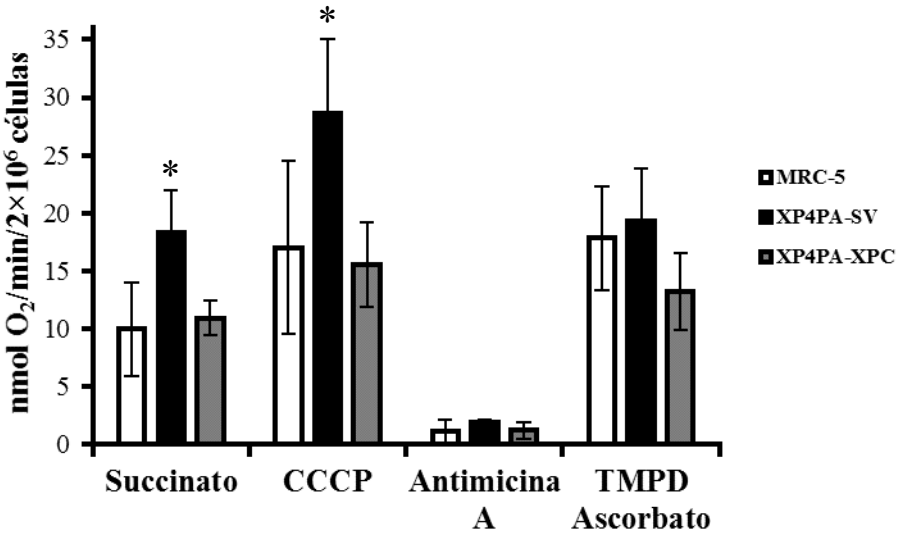


Figura 21 – OCR via complexos II e IV em células MRC-5, XP4PA-SV e XP4PA-XPC. Os parâmetros respiratórios são: **Succinato)** taxa respiratória do complexo II (SDH); **CCCP)** velocidade máxima de respiração pelo complexo II; **Antimicina A)** após adição de AA 1 μM; **TMPD/Ascorbato)** após adição de TMPD 0,2 mM e ascorbato 2 mM, OCR do complexo IV. Os valores são apresentados como média ± desvio padrão. (MRC-5 n=5; XP4PA-SV n=3; XP4PA-XPC n=9)
* diferença estatisticamente significativa em comparação com MRC-5 ($p<0,05$).

Esses dados estão de acordo com os dados obtidos pela Dra Rute A. P. Costa (2013) que demonstrou que em ambas as linhagens MRC-5 e XP4PA-SV apresentam a mesma atividade de citocromo *c* oxidase (complexo IV). Conclui-se que na ausência de XPC as OCRs dos complexos I e II se encontram inversamente moduladas, havendo uma diminuição da OCR via C-I e um aumento da OCR via C-II que são revertidas através da correção de XPC em modelo celular isogênico.

Em seguida, perguntamos se essa diferença nas atividades dos complexos I e II se reflete em alterações na OCR em células intactas. A análise nesse sistema é especialmente valiosa, pois essa medida de OCR abrange o aporte de todas as fontes oxidáveis de carbono da célula, e a síntese e degradação de ATP (*turnover*) inclui todas as reações celulares que demandam ATP, direta ou indiretamente (Brand & Nicholls, 2011).

Ao contrário das análises em células permeabilizadas, observou-se que o consumo basal de O_2 da linhagem XP4PA-SV estava significativamente maior do que a linhagem selvagem (Fig. 22 A). Porém, descontando a respiração não-mitocondrial mensurada após a inibição da CTE com ROT e AA, a respiração basal das duas linhagens não diferiam entre si. Inesperadamente, XP4PA-SV apresentou uma maior CRM quando comparada com células MRC-5 ($p<0,05$). Porque a linhagem XP4PA-SV foi mais sensível ao estresse redox mitocondrial induzido por AM, AA e ROT do que a MRC-5, imaginava-se que, em parte, esse fenômeno seria explicado pela incapacidade que células XP-C teriam de superar insultos que demandassem maior capacidade respiratória.

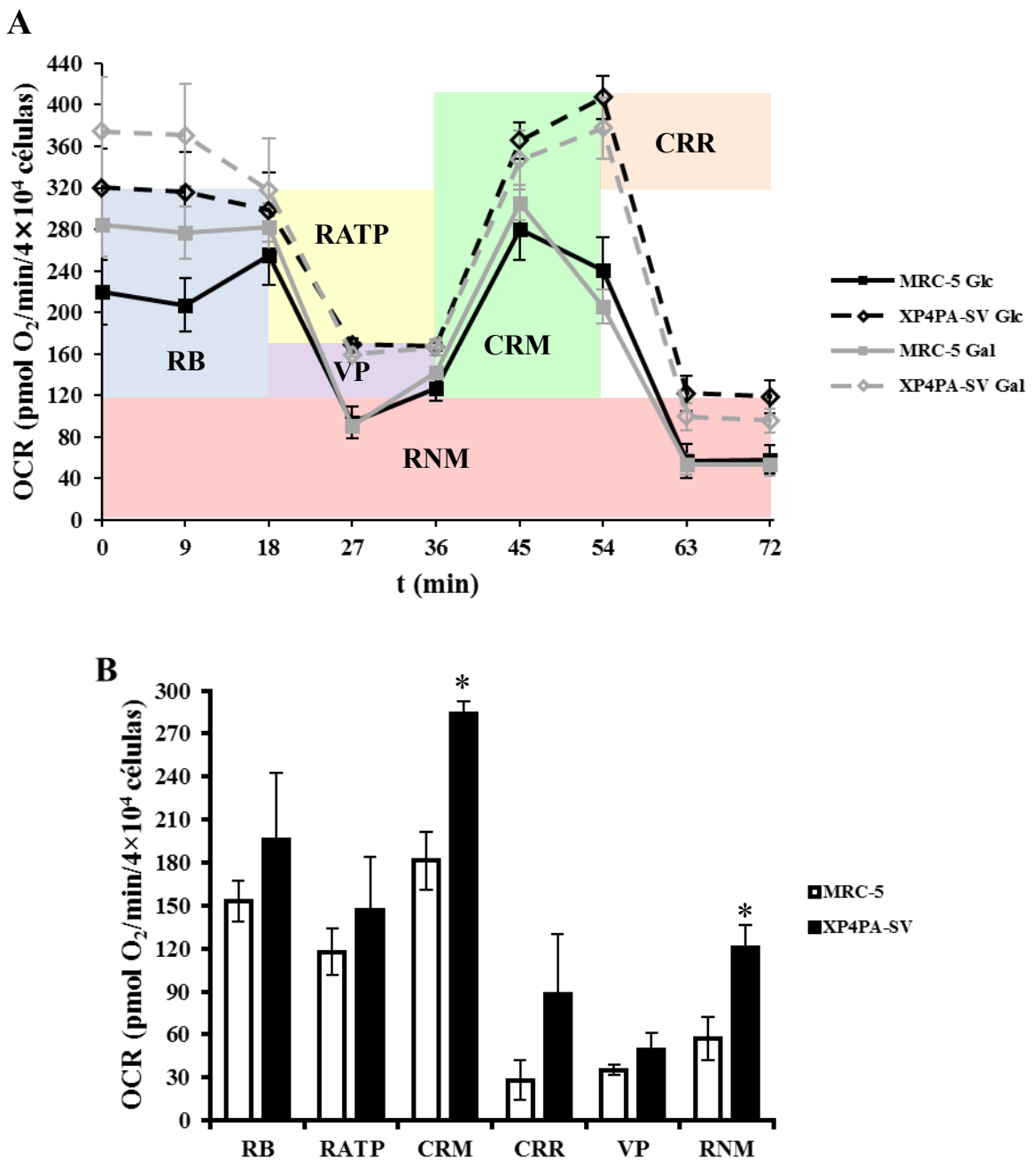


Figura 22 – Medida OCR em células aderidas. A) Traçado experimental de três experimentos independentes e uma ilustração esquemática dos parâmetros analisados. **B)** Gráfico de parâmetros bioenergéticos de glicose como fonte de carbono calculados conforme descrito na seção 3.13.2. RB) respiração basal; RATP) respiração acoplada à síntese de ATP; CRM) capacidade respiratória máxima; CRR) capacidade respiratória reserva; VP) vazamento de H+; RNM) respiração não-mitocondrial. Os valores são apresentados como média ± desvio padrão. (n=3).
* diferença estatisticamente significativa em comparação com MRC-5 (p<0,05).

Esses resultados indicam que, apesar de células XP-C apresentarem alteração no uso dos complexos da CTE, essa modulação não afeta sua capacidade respiratória. Além disso, corroboramos os resultados de Rezvani et al. (2011) demonstrando que a ausência de XPC gera um aumento de consumo de O_2 não-mitocondrial, compatível com a atividade de NOX1.

4.5 Análise da Produção e Remoção de Espécies Reativas de Oxigênio

4.5.1 Análise Indireta de Espécies Reativas de Oxigênio

Para acessarmos o estado redox das células XP-C, resolvemos investigar a produção de $O_2^{\bullet-}$ e H_2O_2 com o uso de sondas fluorescentes específicas para cada espécie. Inicialmente, medimos a produção de H_2O_2 através do uso de Amplex® UltraRed que tem fluorescência menos sensível a variações de pH do que o Amplex® Red, de acordo com o manual do fabricante.

Células de pacientes XP-C produziram mais H_2O_2 do que a linhagem selvagem no controle não-tratado e essa produção foi totalmente revertida em células corrigidas ($p<0,05$). Em experimentos anteriores nosso grupo já havia demonstrado que células XP-C produziam mais H_2O_2 do que a linhagem selvagem (Costa, 2013). Essa maior produção foi parcialmente inibida através da incubação com DPI, um inibidor de flavoproteína e, consequentemente, de NOX. Com isso, podemos refinar a geração de H_2O_2 mitocondrial ao invés da detectarmos a partir de outros compartimento e sistemas enzimáticos. Na presença de DPI, ainda assim células XP4PA-SV produziram mais H_2O_2 do que a linhagem corrigida XP4PA-XPC ($p<0,05$). Esse resultado é um indicativo de que outras alterações moleculares, além de NOX1, são responsáveis pelo aumento na produção de H_2O_2 em células XP-C. A adição de DPI e AA nas células não gerou um incremento na produção de H_2O_2 decorrente de um aumento na produção de $O_2^{\bullet-}$ através do complexo III (Fig. 23).

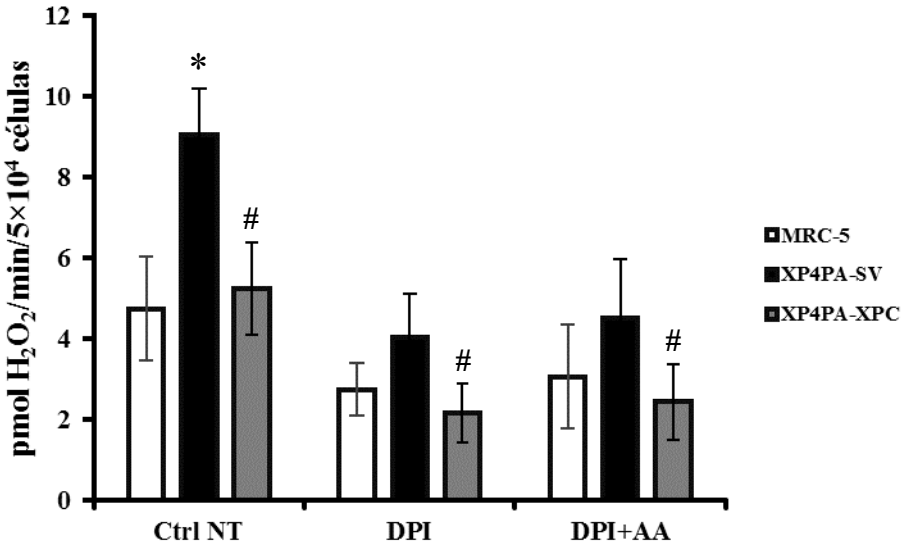


Figura 23 – Medida da produção de H_2O_2 por Amplex® UltraRed. Para analisar a produção de H_2O_2, 5×10^4 foram incubadas em 0,2 mL de PBS/Hank's, Amplex® UltraRed 5 µM e HRP 0,1 U/mL, com excitação e emissão de 530 e 590 nm, respectivamente. **Ctrl NT)** sem adição; **DPI)** DPI 5 µM; **DPI+AA)** DPI 5 µM e AA 1 µM. Os valores são apresentados como média ± desvio padrão. (MRC-5, n=3; XP4PA-SV e XP4PA-XPC, n=5). * diferença estatisticamente significativa em comparação com MRC-5 (p<0,05). # diferença estatisticamente significativa em comparação com XP4PA-SV (p<0,05).

Resolvemos investigar a produção de $O_2^{\bullet-}$ mitocondrial por meio da oxidação da sonda fluorescente MitoSOX^{TM}. Na presença de DPI 5 µM e AA 5 µM, a mediana da fluorescência de células XP4PA-SV foi significativamente maior do que de células MRC-5 (Fig. 24). Um aumento na fluorescência pela oxidação do MitoSOX^{TM} não é restrito a reação com $O_2^{\bullet-}$ (Zilonka et al., 2008). Porém, no nosso sistema, podemos assegurar que grande parte da fluorescência é proveniente da formação $O_2^{\bullet-}$ no complexo III inibido pela AA, um processo genuinamente e cientificamente comprovado (Loschen et al., 1971, Boveris & Cadenas, 1975; Dionisi et al., 1975; Turrens, 2003; Robinson et al., 2006; Mukhopadhyay et al., 2007).

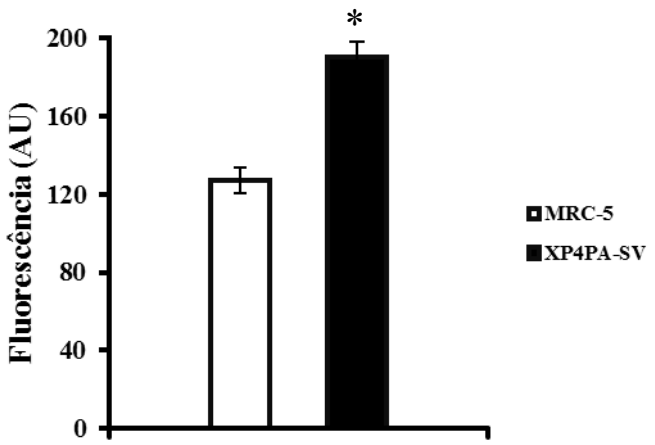


Figura 24 – Medida da produção de $O_2^{\bullet-}$ por MitoSOX™. Células MRC-5 e XP4PA-SV foram tripsinizadas e 1×10^6 foram tratadas com AA 5 µM, DPI 5 µM e MitoSOX 5 µM em 500 µL de meio DMEM por 30 min. As amostras foram analisadas em citômetro de fluxo, canal FL-2. Os valores são apresentados como média ± e.p.m. (n=6). * diferença estatisticamente significativa em comparação com MRC-5 (p<0,05).

4.5.2 Análise da Atividade de Enzimas Antioxidantes

O aumento na detecção de $O_2^{\bullet-}$ e H_2O_2 nos experimentos descritos anteriormente pode ser consequência de um desequilíbrio no sistema de defesa antioxidante. Dessa forma, resolvemos investigar as atividades enzimáticas de superóxido dismutase (SOD) e glutationa peroxidase (GPx). Em todas as linhagens investigadas, a atividade de SOD total se manteve constante (Fig. 25 A). Já a atividade de GPx, uma das enzimas responsáveis em detoxificar H_2O_2 gerado pela dismutação do $O_2^{\bullet-}$, estava aproximadamente 3,8X menor em células XP4PA-SV, em comparação à linhagem MRC-5 (Fig. 25 B).

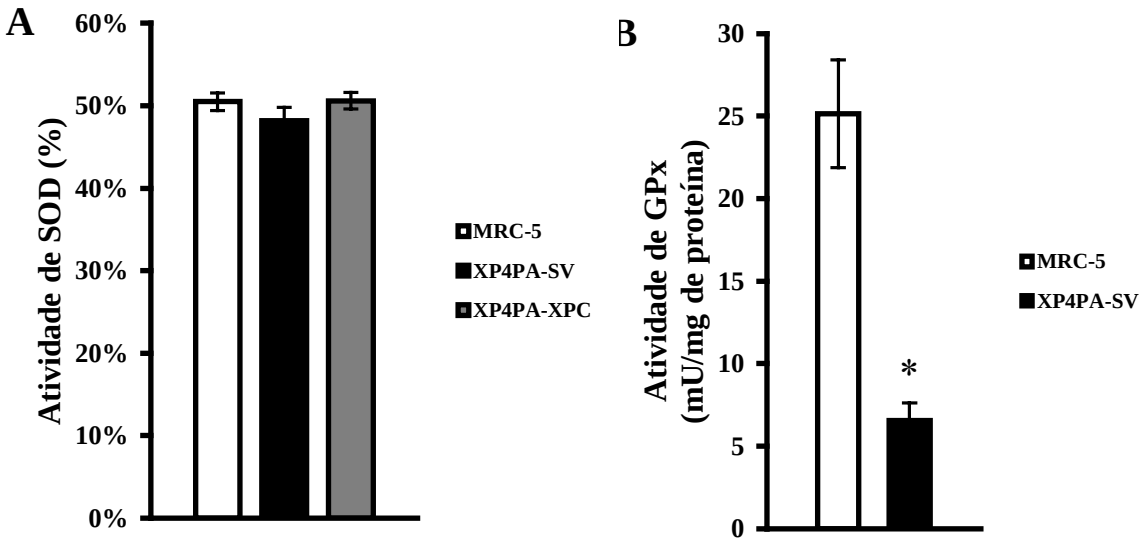


Figura 25 – **Atividade de enzimas antioxidantes. A)** Gráfico da atividade de SOD. A atividade enzimática é expressa pela inibição da redução de WST-1 a formazan. Nesse sistema, a enzima xantina oxidase gera $O_2^{\bullet-}$ que, por sua vez, reduz WST-1 a formazan. Na presença de SOD, o $O_2^{\bullet-}$ gerado é dismutado a H_2O_2, diminuindo a conversão de WST-1 a formazan. Os valores são apresentados como média ± desvio padrão (n=3). **B)** Gráfico da atividade de GPx. A reação para monitorar a atividade de GPx consistiu de 100 µg de proteína celular total em tampão fosfato dibásico de potássio 100 mM (pH 7,7), EGTA 1 mM, $NaNO_3$ 1 mM, H_2O_2 250 mM, NADPH 150 mM, glutationa redutase 60 mU/mL (GR) e glutationa reduzida 5 mM (GSH). A redução nos valores de absorbância, devido à oxidação do NADPH a NADP+ foi monitorada a 340 nm em espectrofotômetro termostatizado a 25 °C. Os valores são apresentados como média ± e.p.m. (n=4)
* diferença estatisticamente significativa em comparação com MRC-5 (p<0,05).

4.6 Análise de Danos, Número de Cópias e Deleção do mtDNA

Uma vez que identificamos em células de pacientes XP-C um aumento na geração mitocondrial de $O_2^{\bullet-}$ e H_2O_2 somada a uma diminuição da defesa antioxidante via GPx, resolvemos investigar a formação de lesões em mtDNA nessa linhagem. Para isso, utilizamos a técnica de XL-PCR onde é amplificado um fragmento de 16,3 kpb do mtDNA, quase todo o genoma mitocondrial. Essa técnica se baseia na característica que algumas lesões de DNA apresentam de impedir a progressão da síntese de DNA pela polimerase da reação. Assim sendo, quão menor a quantidade final do amplicon durante a fase exponencial da reação, maior número de lesões presentes no DNA molde.

Na linhagem XP4PA-SV encontramos o mtDNA significativamente mais lesionado do que na linhagem MRC-5 (p<0,05). Essa diminuição na amplificação do fragmento longo de mtDNA não foi devido ao menor número de cópia de genoma mitocondrial por células, conforme demonstrado na figura 26 A. Ademais, em células XP-C apenas o mtDNA apresentou um acúmulo significativo de lesões bloqueadoras, uma vez que não observamos um aumento significativo de danos no nDNA nessa linhagem (Fig. 26 A). Com o intuito de saber se o aumento de danos no mtDNA era uma consequência da ausência de XPC, e não um artefato específico da linhagem XP4PA-SV, realizamos o mesmo experimento com o DNA de outra

linhagem XP-C não-relacionada e seu respectivo controle. Na comparação entre fibroblastos primários extraídos de um indivíduo normal (AS405) com os de um indivíduo XP-C (XP17VI) encontramos que o mtDNA do paciente XP-C também estava mais danificado do que a selvagem (Fig. 26 B).

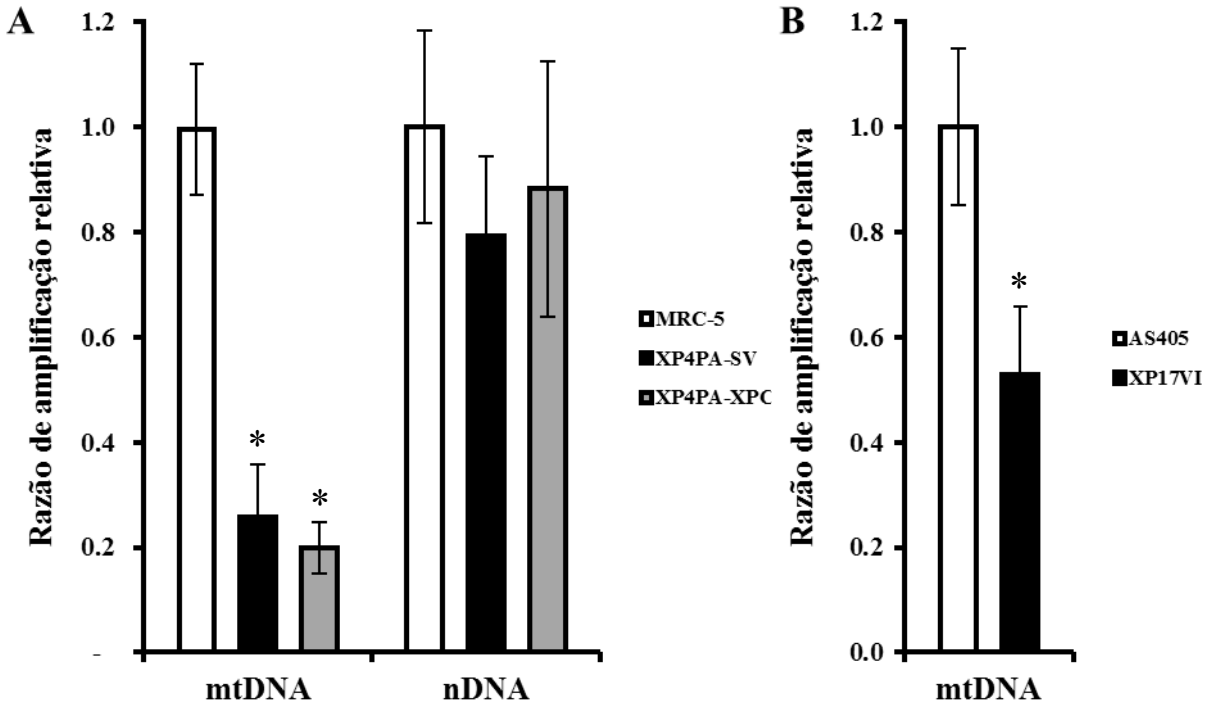


Figura 26 – **Análise de danos no mtDNA pela técnica de XL-PCR. A)** Gráfico de razão de amplificação relativa de mtDNA e nDNA com três linhagens celulares, MRC-5 (selvagem), XP4PA-SV e XP4PA-XPC. A razão de amplificação relativa de mtDNA foi calculada através do densitografia em gel de agarose do fragmento de 16,3 kbp do mtDNA pelo fragmento de 140 bp do gene *MT-ND1*. A razão de amplificação relativa de nDNA foi calculada através do densitografia em gel de agarose do fragmento de 10,4 kbp do gene nuclear *HPRT* pelo fragmento de 170 bp do mesmo gene.Os valores são apresentados como média ± desvio padrão (n=3). **B)** Gráfico de razão de amplificação relativa de mtDNA de duas linhagens primárias AS405 (selvagem) e XP17VI.
* diferença estatisticamente significativa comparada com seus respectivos controles (p<0,05).

Porém, na linhagem XP4PA-XPC não detectamos uma diminuição de danos no mtDNA (Fig. 26 A), apesar de termos observado a recuperação na produção de H_2O_2 e o retorno da taxa de respiração do complexo I e II aos níveis da linhagem MRC-5 (Fig. 20, 21 e 23). Ficou demonstrado que na ausência de XPC, o mtDNA se encontra ou mais danificado ou mais deletado, e que a correção do defeito molecular em células XP-C não é capaz para reverter essas alterações no mtDNA.

A fim de obtermos uma estimativa da frequência de deleção de mtDNA, realizamos qPCR para *MT-ND4L*, um gene mitocondrial mais frequentemente deletado em populações humanas. Como controle usamos o gene *MT-ND1* que se encontra raramente deletado. Desse modo, quão menor a razão de amplificação de *MT-ND4L* por *MT-ND1* mais deletado o mtDNA se encontra. Conforme demonstrado na figura 27 A, observamos um aumento de deleção no mtDNA de células XP-C em comparação com a linhagem selvagem (p<0,05). A fim de

averiguarmos de que o aumento na deleção de *MT-ND4L* se trata de uma característica específica de células XP-C, realizamos o mesmo experimento com a linhagem XP12RO, isolada de paciente XP-A. Nessa linhagem não observamos um aumento de deleção no mtDNA comparado à linhagem MRC-5 ($\Delta\Delta Ct_{XP12RO}$=1,03±0,068 *vs.* $\Delta\Delta Ct_{MRC\text{-}5}$=0,98±0,038). Além disso, o aumento na deleção de mtDNA em XP-C também foi confirmado na linhagem primária XP17VI comparado com sua respectiva linhagem selvagem (Fig. 27 B).

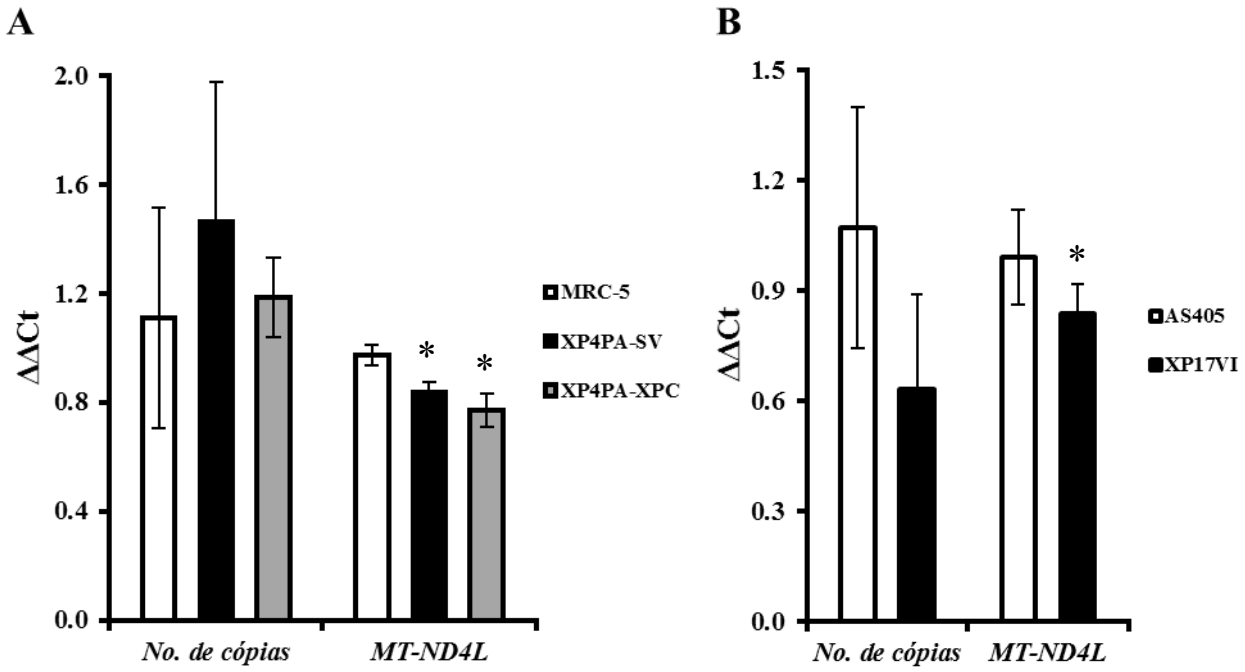


Figura 27 – **Análise de número de cópias de mtDNA e frequência de deleção por qPCR. A)** Gráfico de ΔΔCt de três linhagens celulares, MRC-5 (selvagem), XP4PA-SV e XP4PA-XPC. O ΔΔCt foi calculado através equação descrita na seção 3.16.2. Para o número de cópias de mtDNA (No. de cópias) o gene alvo foi *MT-ND1* e o gene referência foi *HPRT*. Para a presença de MT-ND4L (MT-ND4L) o gene alvo foi *MT-ND4L* e o gene referência foi *ND1*. Os valores são apresentados como média ± desvio padrão (n=4). **B)** Gráfico de ΔΔCt de duas linhagens primárias AS405 (selvagem) e XP17VI. Os valores são apresentados como média ± desvio padrão (AS405, n=4; XP17VI, n=6).
* diferença estatisticamente significativa comparada com seus respectivos controles (p<0,05).

A correção molecular de XPC não foi capaz de reverter o aumento na deleção de mtDNA (Fig. 27 A). Esses dados sugerem que os danos e as deleções no mtDNA em células XP-C não podem ser revertidos após a reintrodução de XPC. Além disso, pode-se ao menos especular que esses danos e deleções no mtDNA são permanentes e, talvez, ajam como marcadores de estresse redox crônico mesmo após o retorno do equilíbrio redox.

4.7 Análise da Atividade de Citrato Sintase

No mesmo estudo-piloto conduzido pela Profa. Dra Nadja C. de Souza-Pinto, na University of Aarhus, havia indícios de que mitocôndrias isoladas a partir de fibroblastos de paciente XP-C perdiam sua atividade de citrato sintase durante o processamento da amostra, algo que não ocorria em mitocôndrias de indivíduos normais. Desse modo, em colaboração com a Dra Rute A. P. Costa, resolvemos investigar essa atividade enzimática de citrato sintase em linhagens XP-C imortalizada e primária.

Em mitocôndrias isoladas de MRC-5 e XP4PA-SV não observamos a perda da atividade de citrato sintase em nenhuma das duas linhagens (1.642±390 *vs.* 1.567±366 mU/mg de proteína, respectivamente).

Ainda assim, porque a atividade da enzima citrato sintase é comumente utilizada como um indicador de número de mitocôndrias, resolvemos investigar a atividade de citrato sintase em extrato celular total. De fato, estudos indicam que a atividade de citrato sintase permanece inalterada mesmo em condições experimentais distintas, uma vez que é expressa constitutivamente (Booth & Kirby, 1991). A atividade de citrato sintase apresentou-se diminuída em as ambas linhagens deficientes em XPC, XP4PA-SV e XP17VI (p<0,05), em comparação com as respectivas linhagens selvagens (Fig. 28 A e B). Esses dados indicam que células XP-C possuem menos mitocôndrias do que células selvagens, apesar de o número de cópias de mtDNA relativo ao gene nuclear de cópia única se manter constante.

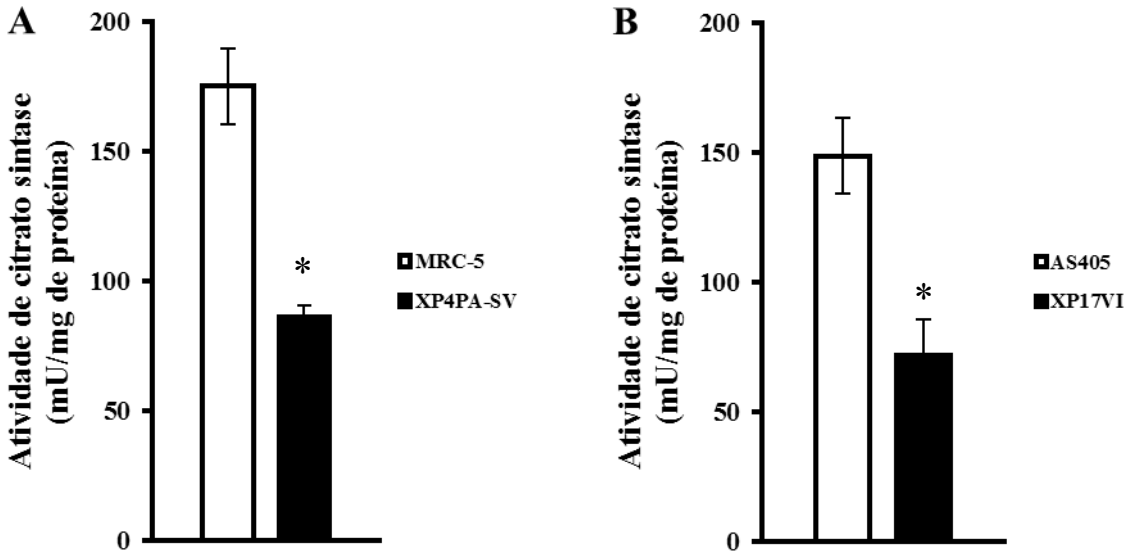


Figura 28 – **Atividade de citrato sintase. A)** Gráfico da atividade de citrato sintase das linhagens MRC-5 (selvagem) e XP4PA-SV. **B)** Gráfico da atividade de citrato sintase das linhagens AS405 (selvagem) e XP17VI. Os valores são apresentados como média ± e.p.m. (n=4). * diferença estatisticamente significativa comparada com suas respectivas linhagens selvagens (p<0,05)

4.8 Análise de Expressão Gênica

4.8.1 Triagem de Genes Diferencialmente Expressos em XP-C

Os dados apresentados anteriormente nos impulsionaram a verificar se a modulação da atividade dos complexos da CTE e do número de mitocôndrias por célula se dava em nível transcricional. Desta forma, realizamos experimentos para avaliar a expressão diferencial de genes envolvidos em três processos mitocondriais: i) genes da CTE, ii) genes de reguladores de biogênese mitocondrial e iii) genes de moduladores do metabolismo mitocondrial.

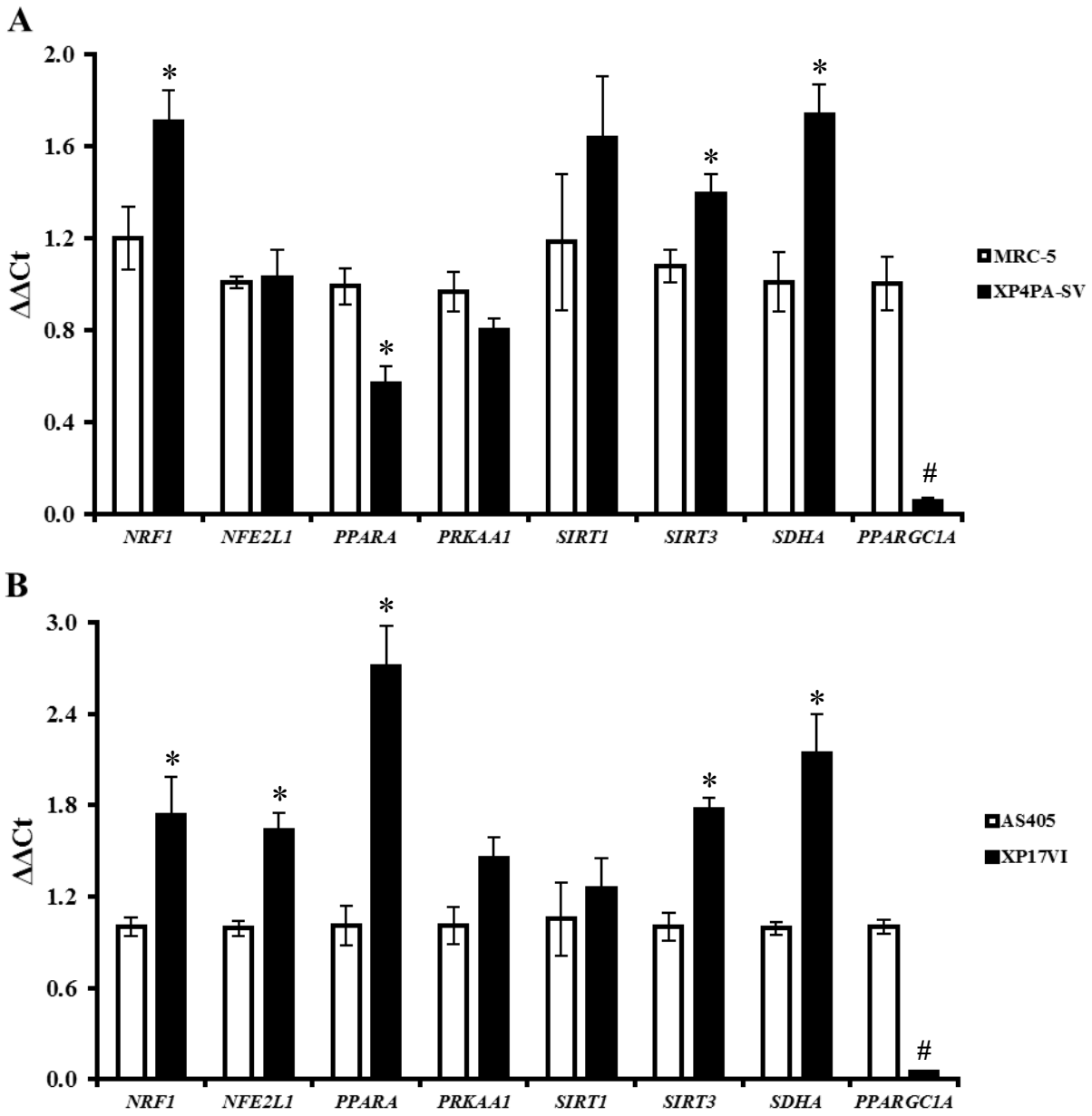


Figura 29 – Expressão de genes da CTE, de reguladores de biogênese mitocondrial e de moduladores de metabolismo mitocondrial. A) Gráfico de ΔΔCt de MRC-5 (selvagem) e XP4PA-SV. O ΔΔCt foi calculado através equação descrita na seção 3.16.2. O gene referência de todos os genes analisados foi *ACTB.* A análise dos resultados com outros genes *housekeeping* (*TUBB*, *TBP* e *HPRT*) demonstrou que não há diferença entre esses e o gene *housekeeping ACTB* utilizado referência para todas as análises. Os valores são apresentados como média ± e.p.m. (n=4). **B)** Gráfico de ΔΔCt de duas linhagens primárias AS405 (selvagem) e XP17VI. Os valores são apresentados como média ± desvio padrão (AS405, n=4; XP17VI, n=6).
* diferença estatisticamente significativa comparada com seus respectivos controles (p<0,05).

Conforme visualizado nas figuras 29 A e B, nessa triagem o gene *PPARGC1A* destacou-se como o produto com expressão mais alterada em células XP-C em relação aos respectivos controles. O gene *PPARGC1A* (*peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1 alpha*) codifica para o coativador transcricional PGC-1α, um importante controlador de biogênese mitocondrial. Essa proteína atua principalmente em conjunto com fatores de transcrição recrutando-os aos promotores de seus genes-alvo (Andersson &

Scarpulla, 2001; Meirhaeghe et al., 2003; Lin et al., 2005). Observamos uma diminuição de cerca de 16X na expressão de PGC-1 α em células XP4PA-SV comparado a MRC-5 (p<0,001). Além disso, em células XP4PA-SV observamos um aumento na expressão de *SDHA*, uma subunidade do complexo II, corroborando os dados de respiração aumentada em XP-C quando succinato é utilizado como substrato respiratório. Outros dois genes *NRF1* e *SIRT3* apresentaram expressão aumentada em células XP4PA-SV em comparação a MRC-5. SIRT3 é uma desacetilase dependente de NAD^+ encontrada na mitocôndria (Schwer et al., 2002) e está fortemente associada a regulação da reprogramação metabólica e da resposta ao estresse oxidativo (Chen et al., 2014). NRF1 é um fator de transcrição envolvido na expressão de subunidades da CTE, enzimas de biossíntese do grupo heme, e fatores regulatórios da transcrição e da replicação do mtDNA (Scarpulla, 2008). O fato da expressão desses dois genes ter sido encontrada aumentada em células XP-C sugere um papel delas na reorganização metabólica mitocondrial.

Igualmente, a linhagem não transformada XP17VI apresentou uma diminuição de cerca de 21X na expressão de *PPARGC1A* em comparação à linhagem selvagem (p<0,001). Também observamos o mesmo aumento na expressão de *SDHA*, *SIRT3* e *NRF1*. Porém, em células primárias, observamos também um aumento na expressão de *NFE2L1* e *PPARA*. Esses resultados são opostos ao obsevado em células XP4PA-SV, no qual foi demonstrada a diminuição na expressão de *PPARA*. Devido a essa discrepância, e porque a diminuição de *PPARGC1A* foi robusta e reprodutível nos dois modelos celulares, resolvemos investigar a fundo os possíveis mecanismos que afetam a expressão desse coativador transcricional.

4.8.2 Análise do Papel de XPC na Metilação do Promotor de *PPARGC1A*

Barrès et al. (2009) demonstraram que a metilação não-CpG da região promotora de *PPARGC1A* mediada por DNMT3B [*DNA (cytosine-5-)-methyltransferase 3 beta*] alterava sua expressão e, consequentemente, a densidade mitocondrial. Em vista disso, tratamos células MRC-5 e XP4PA-SV com o agente pan-desmetilante 5-aza-2′-desoxicitidina (5-aza-dC). Como controle de indução, usamos o gene *KRT8* (*keratin 8, type II*) que é superexpresso em fibroblastos após o tratamento com 5-aza-dC (Liang et al., 2002). Após terem sido cultivadas por 8 dias na presença de 5-aza-dC 1 μM, ambas as linhagens tiveram um aumento significativo na expressão de *KRT8* quando comparado com o controle tratado com PBS (p<0,05). A desmetilação, porém, não afetou a expressão de *PPARGC1A* em ambas as linhagens (Fig. 30).

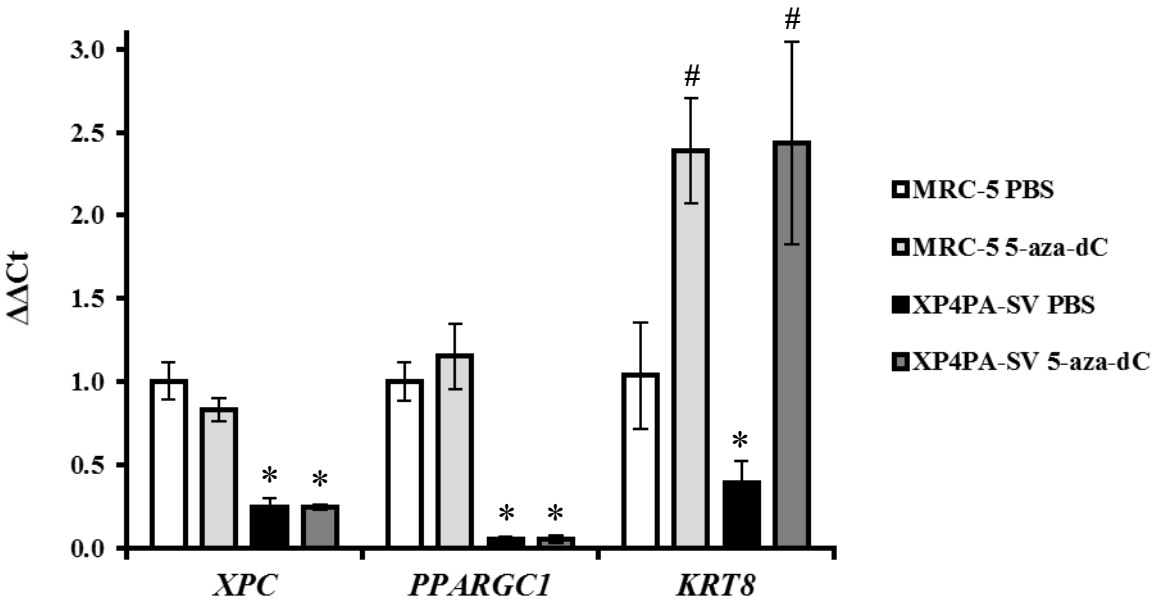


Figura 30 – **Expressão de XPC, PPARGC1 e KRT em células tratadas com 5-aza-dC** Gráfico de ΔΔCt de MRC-5 (selvagem) e XP4PA-SV tratadas com PBS (controle-negativo) e 5-aza-dC (agente pan-desmetilante). O ΔΔCt foi calculado através da equação descrita na seção 3.16.2. O gene referência de todos os genes analisados foi *ACTB*. Os valores são apresentados como média ± desvio padrão. (n=3).
* diferença estatisticamente significativa entre linhagens (p<0,05).
# diferença estatisticamente significativa entre o grupo tratado e o grupo controle da mesma linhagem (p<0,05).

A linhagem XP4PA-XPC não pôde ser usada nesses experimentos, pois, conforme relatado em Dubuy et al. (2013) as células foram previamente tratadas com o mesmo agente desmetilante a fim de aumentar a eficiência da correção. De fato, a expressão de *KRT8* se encontra constitutivamente aumentada em células XP4PA-XPC mesmo sem tratamento com 5-aza-dC (Fig. 31).

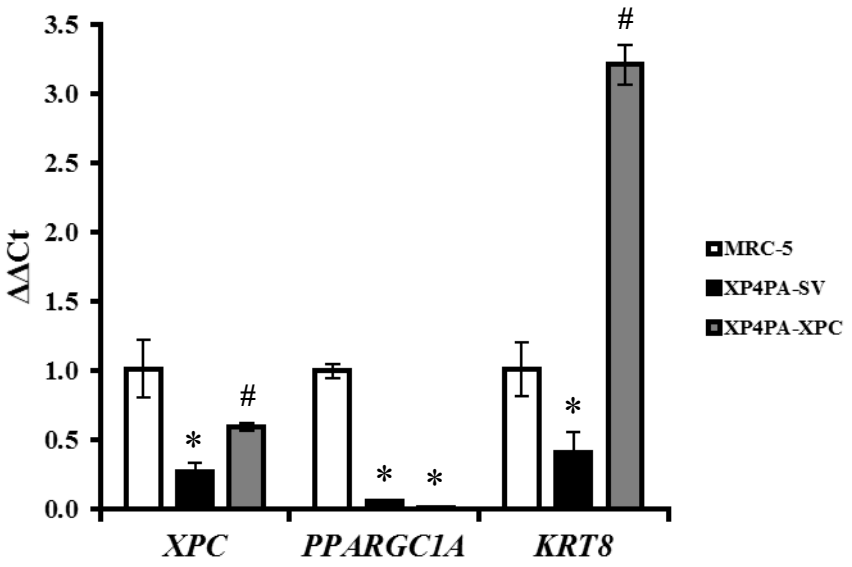


Figura 31 – Expressão de XPC, PPARGC1 e KRT na linhagem XP-C corrigida. Gráfico de ΔΔCt de três linhagens celulares: MRC-5 (selvagem), XP4PA-SV e XP4PA-XPC. O ΔΔCt foi calculado através equação descrita na seção 3.16.2. O gene referência de todos os genes analisados foi *ACTB*. Os valores são apresentados como média ± desvio padrão. (n=3).
* diferença estatisticamente significativa entre linhagens (p<0,05).
# diferença estatisticamente significativa entre o grupo tratado e o grupo controle da mesma linhagem (p<0,05).

Também realizamos experimentos de sequenciamento de DNA da região promotora de PPARGC1A após tratamento com bissulfito. O tratamento da amostra de DNA com bissulfito converte citosinas não-metiladas a uracila, enquanto regiões contendo 5-metilcitosina permanecem resistentes a essa conversão. Dessa forma, após a reação de sequenciamento, toda citosina desmetilada gera um sinal para timina enquanto toda citosina metilada continua gerando um sinal para citosina. Contudo, não obtivemos um sinal limpo para o sequenciamento a despeito de termos obtido uma média de 15 colônias bacterianas brancas contendo como inserto a região promotora de *PPARGC1A* clonada em vetor pDrive® (Qiagen®).

4.8.3 Análise da Expressão de Genes da Família PGC1 e TFAM como Gene-alvo

Porque PPARGC1A pertence à família dos coativadores de PGC1 que apresentam sobreposição de função, resolvemos investigar a expressão dos outros dois membros da família, os genes *PPARGC1B* (*peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1 beta*) e *PPRC1* (*peroxisome proliferator-activated receptor gamma, coactivator related 1*). Também investigamos a expressão de *TFAM* (*mitochondrial trancription factor A*) um gene-alvo de PGC-1α (Barrès et al., 2009).

Não foi possível estabelecer a eficiência da PCR de *PPARGC1B* mesmo utilizando quatro diferentes pares de iniciadores. Quando analisamos a expressão de *PPRC1* na linhagem XP-C identificamos um leve aumento quando comparado à linhagem selvagem (Fig. 32). Igualmente, observamos um aumento significativo na expressão de *TFAM* em células XP4PA-SV quando comparado com as células de MRC-5. Porém, não observamos, em células corrigidas, o retorno da expressão de *PPRC1* e *TFAM* aos níveis da linhagem selvagem.

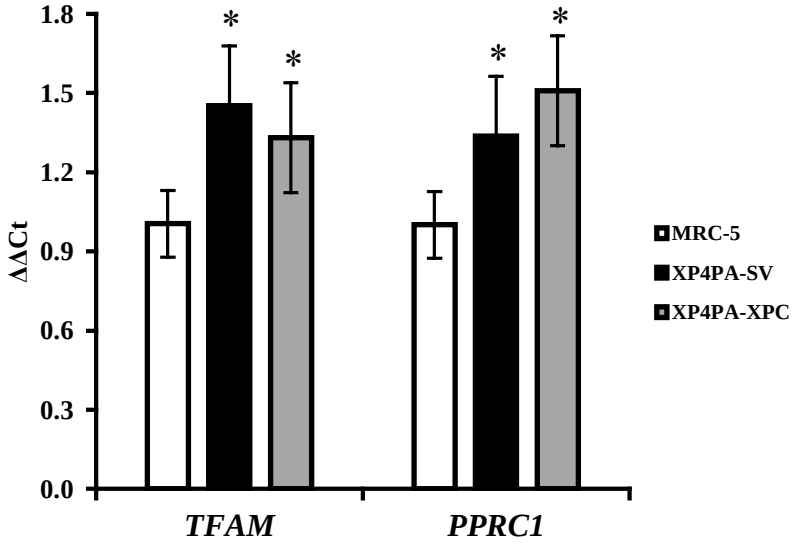


Figura 32 – Expressão de TFAM e PPRC1. Gráfico de ΔΔCt de três linhagens celulares: MRC-5 (selvagem), XP4PA-SV e XP4PA-XPC. O ΔΔCt foi calculado através equação descrita na seção 3.16.2. O gene referência de todos os genes analisados foi *ACTB*. Os valores são apresentados como média ± desvio padrão. (n=3).
* diferença estatisticamente significativa entre linhagens (p<0,05).

Juntos, esses dados indicam que a diminuição acentuada de PGC-1α não altera a expressão de genes-alvo da família PGC1. Inclusive, ao menos PPRC1, se encontra regulado positivamente em células XP-C, e podemos ao menos especular que participa no aumento da expressão de TFAM nessas células.

4.8.4 Análise do Efeito do Silenciamento de XPC na Expressão de *PPARGC1A*

Por fim, resolvemos investigar o efeito do silenciamento *XPC* via *knockdown* com esiRNA em células MRC-5 na expressão de *PPARGC1A*. Corroborando os dados anteriores, após a supressão da expressão de *XPC* com esiRNA não encontramos uma diminuição na expressão de *PPARGC1A* como observado na linhagem XP4PA-SV, ao menos 5 dias após o silencimento (Fig. 33). Rezvani et al. (2011) observaram que o silenciamento de *XPC* mediado

por shRNA em queratinócitos levou a uma adaptação metabólica a longo prazo, a qual se estabeleceu somente 20 dias após a transfecção. Assim sendo, é possível que a janela experimental em nosso protocolo não foi longa o suficiente para detectar qualquer alteração metabólica dirigida pela ausência de XPC.

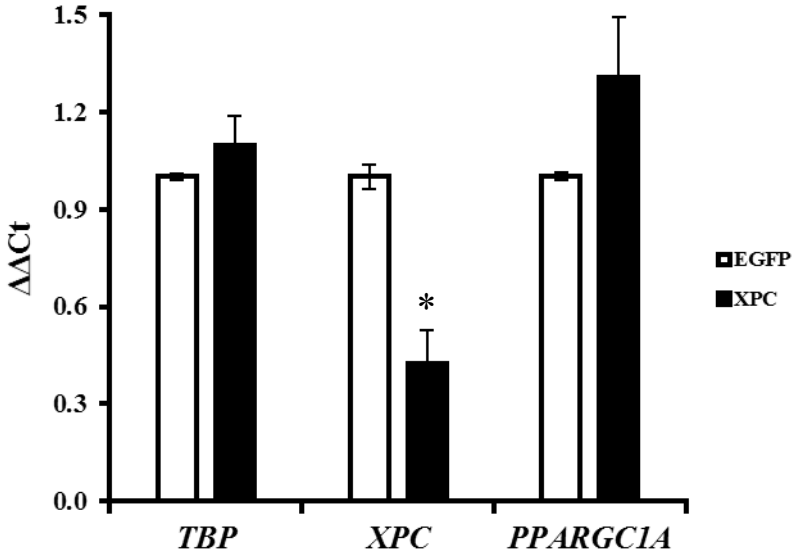


Figura 33 – Expressão de TBP, XPC e PPARGC1A em experimento de silenciamento de XPC. Gráfico de ΔΔCt da linhagem MRC-5 transfectadas com esiRNA contra EGFP (controle) e XPC. O ΔΔCt foi calculado através equação descrita na seção 3.16.2. O gene referência de todos os genes analisados foi *ACTB*. Os valores são apresentados como média ± desvio padrão. (n=3).
***** diferença estatisticamente significativa (p<0,05).

4.8.5 Análise da Influência do Tipo de Mutação no Gene *XPC* na Expressão de *PPARGC1A*

Os resultados anteriores indicaram que a diminuição na expressão de *PPARGC1A* observada em células XP4PA-SV e XP17VI não é resultado direto da ausência da proteína XPC. Dessa forma, investigamos se essa diminuição estaria relacionada ao tipo de mutação nas linhagens XP-C. Isso porque as linhagens XP4PA-SV e XP17VI compartilham da mesma mutação em homozigose no gene *XPC*, a deleção no dinucleotídeo TG (c.1643_1644delTG). Por isso, analisamos mais duas linhagens XP-C, XP03SP que contém a mesma mutação de XP4PA-SV e XP17VI, e XP02SP, que apresenta uma mutação distinta em homozigose, a tranversão G→T (c.1969G>T).

Conforme demonstrado por vários autores, a maioria das mutações *nonsense* em XPC induz *nonsense mediated RNA decay* (Chavanne et al., 2000; Khan et al., 2006; Khan et al., 2009). Corroborando observações anteriores, os experimentos evidenciaram que as três

linhagens primárias de fibroblastos isolados de pacientes XP-C possuem uma diminuição significativa na quantidade de transcrito de XPC (p<0,05). Para nossa surpresa, as linhagens XP17VI e XP03SP contendo a mutação comum (c.1643_1644delTG) apresentaram uma diminuição na expressão de *PPARGC1A* de 21,2X e 5,8X, respectivamente. A linhagem XP02SP, porém, contendo a mutação c.1969G>T não apresentou alteração na expressão de *PPARGC1A* em comparação à linhagem selvagem (Fig. 34), sugerindo que a diminuição na expressão de *PPARGC1A* pode, de fato, estar relacionada ao tipo de mutação presente em *XPC*. Entretanto, outras linhagens XP-C, contendo mutações distintas precisam ainda ser analisadas para suportar essa correlação.

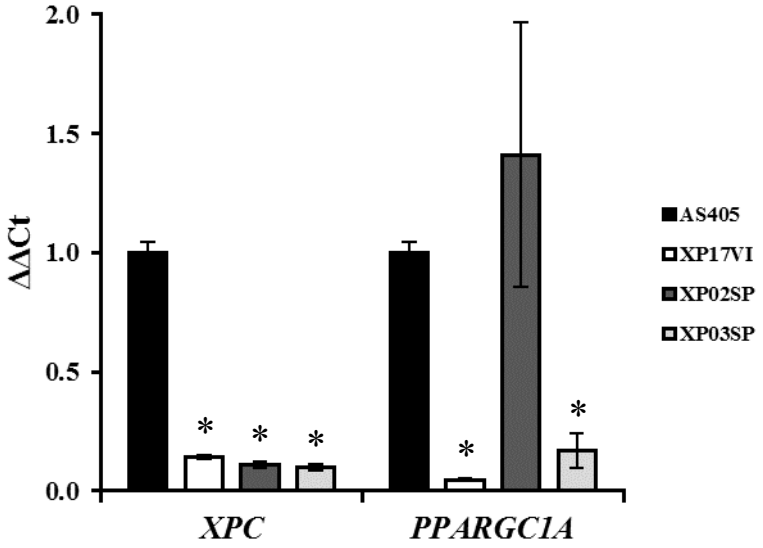


Figura 34 – Expressão de XPC e PPARGC1A em linhagens primárias com mutações distintas em *XPC*. Gráfico de ΔΔCt da linhagem MRC-5 transfectadas com esiRNA contra EGFP (controle) e XPC. O ΔΔCt foi calculado através da equação descrita na seção 3.16.2. O gene referência de todos os genes analisados foi *ACTB*. Os valores são apresentados como média ± desvio padrão. (n=3).
***** diferença estatisticamente significativa (p<0,05).

5 DISCUSSÃO

Várias evidencias experimentais recentes sugerem que alterações metabólicas desempenham um papel importante na fisiopatologia de doenças causadas por defeitos primários em vias de reparo de DNA. Esses estudos demonstraram em células de pacientes XP-A e CS-B um significativo desequilíbrio redox mitocondrial, como consequência do aumento no potencial de membrana mitocondrial devido a uma diminuição na mitofagia (Fang et al., 2014; Scheibye-Knudsen et al., 2013a), um mecanismo fundamental na remoção de mitocôndrias danificadas e disfuncionais (Youle & Narendra, 2011). Esse mecanismo explica porque pacientes com mutações em *XPA*, que dão origem a síndrome de DeSanctis-Cacchione (XP com sintomas neurológicos), e em *CSA* e *CSB*, que dão origem a CS, possuem sintomas que mais se assemelham a doenças mitocondriais, fato que foi inclusive utilizado no desenvolvimento da ferramenta de diagnóstico de doenças mitocondriais – www.mitodb.com (Scheibye-Knudsen et al., 2013b). Defeitos mitocondriais também foram observados no modelo murino de ataxia-telangiectasia (*ataxia-telangiectasia mutated* – ATM), outra doença genética de defeito em reparo de DNA (Valentin-Vega & Kastan, 2012). Surpreendentemente, a correção parcial da disfunção mitofágica em camundongos *Atm*$^{-/-}$, através do cruzamento com *Becn1*$^{+/-}$, uma proteína relacionada à autofagia, atrasa a formação de tumores.

Nesse contexto, a demonstração de que XPC estimula a atividade catalítica de OGG1, e que OGG1 é a principal responsável pelo reparo de guaninas oxidadas em mtDNA nos levou a investigar o papel de XPC na manutenção da integridade do mtDNA e o papel de disfunção mitocondrial no fenótipo celular de células XP-C. Em nosso estudo, ficou claro que XPC não possui papel direto na manutenção da integridade de mtDNA, uma vez que a proteína não é encontrada na mitocôndria. Contudo, isso não descarta um papel de XPC na regulação do metabolismo mitocondrial. De um lado, por exemplo, as proteínas ATM, CSA e CSB são encontradas em mitocôndrias, especialmente após indução de estresse oxidativo (Aamann et al., 2010; Kamenisch et al., 2010; Sharma et al., 2014). Por outro lado, nenhuma proteína mutada em XP foi encontrada em mitocôndrias até o presente momento, mesmo no estudo relacionando defeitos mitocondriais à proteína XPA (Fang et al., 2014). No entanto, em modelo XP-A existe uma ligação entre reparo de DNA e disfunção mitocondrial. Os autores postularam que a ativação prolongada de PARP devido a não-resolução dos danos no DNA leva a uma diminuição no conteúdo de NAD^+. Dessa forma, a atividade de desacetilase dependente de NAD^+ desempenhada por SIRT1 se encontraria comprometida, levando também a inibição da

ativação de PGC-1α. Por fim, isso culminaria em diminuição da expressão de UCP2 (*uncoupling protein 2, mitochondrial proton carrier*), levando a um aumento do ΔΨ mitocondrial como mecanismo compensatório para o aumento da síntese de ATP. Contudo, como explanado na seção 1.3, um aumento na FPM acarreta em uma maior geração de ROS (Korshunov et al., 1997). Além disso, a diminuição do ΔΨ mitocondrial é um dos mecanismos pelo qual as células reconhecem mitocôndrias danificadas (Matsuda et al., 2010). PINK1 (*PTEN-induced putative kinase 1*) recruta a proteína Parkin mediante a diminuição de ΔΨ mitocondrial, elicitando processo de mitofagia (Narendra et al., 2010; Vives-Bauza et al., 2010). Em células XP-A, a elevação do ΔΨ mitocondrial impede a remoção de mitocôndrias danificadas através do processo mitofágico, um importante mecanismo de controle de qualidade mitocondrial. Desse modo, essas células se tornam mais vulneráveis à via intrínseca de morte celular apoptótica.

Não obstante XPC não se localizar em mitocôndrias, sua ausência resulta em alterações na função mitocondrial e no aumento de sensibilidade celular a estresse redox mitocondrial induzido por AA. Esses efeitos são dependentes de XPC, uma vez que a curva de sobrevivência ao tratamento com AA de XP4PA-XPC é semelhante a da linhagem selvagem. Igualmente, parece que o tratamento com ROT também sensibiliza preferencialmente células XP-C, ao passo que as linhagens selvagem e corrigida são menos sensíveis ao tratamento com esse inibidor do complexo I da CTE. Dependendo do microambiente e do estado redox, a AA pode atuar como um agente citoprotetor (Bambrilia & Cantoni, 1998). Porém, o tratamento com AA é mais comumente associado à morte celular, principalmente devido ao fato de que o bloqueio do fluxo de elétrons através do C-III resulta em aumento na produção mitocondrial de EROs (Kowaltowski et al., 2009). Em experimentos conduzidos pela Dra Rute A. P. Costa (2013), células XP-C foram mais sensíveis à permeabilização da membrana mitocondrial induzida por Ca^{2+}, mesmo na presença de inibidores clássicos do poro de transição da permeabilidade mitocondrial (mPTP). Fong et al. (2014) demonstraram que o tratamento com toxinas mitocondriais, incluindo AA e ROT, normalmente induzia mitofagia em células normais, e apoptose, em células XP-A. Contudo, apesar dos autores terem demonstrado que o silenciamento de XPC não induz um aumento na formação de EROs mitocondrial, eles não investigaram a sensibilidade dessas células ao tratamento com AA, ROT e CCCP. A inibição farmacológica do mPTP ou através da deleção de ciclofilina-D (Cyp-D), um componente de mPTP, resulta na diminuição de morte celular necrótica, e em alguns casos, apoptótica (Ryu et al., 2010). Na situação inversa, o aumento na ativação de mPTP poderia sensibilizar células à

morte necrótica. Seguindo esse raciocínio, XPC poderia modular a formação de mPTP através da regulação dos complexos da CTE.

Por outro lado, células XP-C apresentam uma maior sensibilidade ao tratamento com AM fotoativado, que gera primariamente $^1O_2$, que não é revertida na linhagem corrigida. Esses resultados sugerem que o mecanismo citotóxico de AM difere daquele de AA e ROT, e que o papel de XP-C não é tão relevante nessa condição. De fato, apesar dos estudos de Gabrielli et al. (2004) terem demonstrado que AM se concentra em suspensões mitocondriais, o mesmo grupo descreveu que, em células, AM se acumula preferencialmente em lisossomos (Oliveira et al., 2011). Essas observações, em conjunto com os nossos dados, demonstram que a sensibilidade de células XP-C à fotoativação do AM não está diretamente ligada à adaptação dos complexos respiratórios mitocondriais nessas células, uma vez que outros sítios celulares podem representar alvos mais relevantes para a indução de morte.

Em conjunto com os resultados mostrando um desbalanço na atividade dos diferentes complexos da CTE, esses resultados sugerem que células XP-C são mais sensíveis ao estresse redox mitocondrial devido a algum papel da proteína XPC na modulação dos complexos da CTE. Apesar de inicialmente especulativo, a correlação entre a correção da hipersensibilidade aos inibidores da CTE e a não-correção ao estressor mitocondrial que gera EROs fora do contexto molecular da CTE em células XP4PA-XPC suporta a conclusão que CTE é o alvo primário do efeito funcional da ausência de XPC.

De acordo com essa hipótese, a ausência de XPC resulta em uma adaptação quanto ao uso dos complexos da CTE, com um aumento da participação C-II e uma diminuição no C-I. A correção de XPC na linhagem XP4PA-XPC é suficiente para recuperar a atividade dos complexos aos níveis da selvagem, MRC-5. Esses resultados podem ser interpretados tanto do ponto de vista bioenergético celular quanto de estresse redox. A diminuição do OCR via C-I e o aumento de OCR via C-II podem ser entendidos como um mecanismo protetor na produção de EROs. Isso porque, conforme descrito na seção 1.1, o C-I é capaz de produzir $O_2^{\bullet-}$ em dois sítios: o sítio de ligação a FMN e o sítio de ligação a UbQ (Kowaltowski et al., 2009). Pelo contrário, a disposição molecular dos centros redox no C-II previne a formação de EROs nesse complexo (Yankovskaya et al., 2003). A montagem do C-I envolve a expressão de genes contidos nos genomas mitocondrial e nuclear em conjunto com um grupo de proteínas conhecidas “fatores de montagem” (McKenzie & Ryana, 2010). Mutações em genes que codificam proteínas estruturais e/ou catalíticas, assim como em fatores de montagem, resultam na perda de atividade do complexo. Mesmo quando a atividade catalítica é preservada, como

no caso da neuropatia ótica hereditária de Leber, observa-se um aumento na sensibilidade a inibidores de C-I com subsequente geração de EROs (Lenaz et al., 2004).

Por outro lado, o C-I é o complexo da ETC com o maior número de subunidades codificadas no mtDNA. Desse modo, é provável que o acúmulo de danos no mtDNA observado em células XP-C é contrabalanceado pela supressão de C-I e incremento de C-II a fim de reduzir o impacto do desequilíbrio no estado redox. Em conjunto esses dados sugerem que a proteína XPC possui uma função ainda desconhecida na regulação dos complexos da CTE e na manutenção do equilíbrio redox mitocondrial.

Recentemente, mutações nos genes que codificam o complexo da succinato desidrogenase da CTE foram associados ao desenvolvimento de tumores (Ackrell et al., 2000; Baysal et al., 2000; Gimenez-Roqueplo et al., 2001; Douwes Dekker et al., 2003). A ligação molecular entre mutação em genes da SDH e tumorigênese é a ativação do fator de transcrição HIFα (*hypoxia inducible factor 1, alpha subunit*) (Gottlieb & Tomlinson, 2005). Em concentrações fisiológicas de O_2, as subunidades HIF1 e HIF2 de HIFα são degradadas pela atividade de prolil hidroxilase (PHD). Essa enzima catalisa hidroxilação, de modo dependente de α-cetoglutarato e O_2, de um resíduo de prolina no domínio de degradação dependente de oxigênio em HIFα, levando à sua degradação (Huang et al., 1998; Epstein et al. 2001; Ivan et al., 2001). Mutações que comprometem a atividade da SDH acarretam no acúmulo de succinato. Em teoria, o succinato inibe a atividade de PDH (Selak et al., 2005) levando a estabilização de HIFα. Seguindo essa linha de raciocínio, é possível especular que, em células XP-C, o aumento da atividade do complexo II (SDH) possa ser um mecanismo compensatório a fim de reforçar a inibição de HIFα. Esse mecanismo pode parecer contraditório, uma vez que XP-C é uma doença caracterizada pela elevada taxa de desenvolvimento de tumores. Porém, a ausência de XPC poderia ser identificada na intricada rede de vias de sinalização, favorecendo a ativação de vias supressoras tumorais preventivamente.

Entretanto, também demonstramos que células XP-C produzem mais H_2O_2 e $O_2^{\bullet-}$, e que pelo menos a produção de H_2O_2 é revertida após a correção de células deficientes em XPC. Rezvani et al. (2011) demonstraram em queratinócitos, que o silenciamento de XPC via shRNA levou a uma mudança metabólica com uma diminuição da fosforilação oxidativa e um aumento da glicólise. Ainda nesse mesmo estudo, os autores demonstraram que NADPH oxidase 1 (NOX1), uma enzima que gera $O_2^{\bullet-}$ a partir de O_2, é ativada após o silenciamento de XPC. Porém, nossos dados indicam que mesmo na presença de DPI, um inibidor de NOX, células XP-C produzem mais $O_2^{\bullet-}$ e H_2O_2. Além disso, nos experimentos de OCR em células aderidas,

observamos uma elavada taxa de respiração não-mitocondrial em células XP-C (p<0,05) que parece ser compatível com a atividade de NADPH oxidase 1 (NOX1).

Ademais foi observado uma diminuição na atividade da GPx em células XP-C. Outra enzima antioxidante, a catalase, já havia sido investigada em pacientes XP, que apresentaram uma clara diminuição na atividade da enzima em comparação às linhagens controle, independente da atividade de reparo (Vuillaume et al., 1986). De fato, a deficiência na atividade de catalase em células XP-C mostrou ser totalmente dependente da presença da proteína XPC, uma vez que a correção retroviral de fibroblastos XP-C por si só reverteu a atividade da enzima aos níveis de células selvagens (Quilliet et al., 1997). Juntos, esses dados indicam que o sistema antioxidante diretamente dependente de NADPH e glutationa encontra-se afetado em células XP-C, o que pode exacerbar os efeitos citotóxicos de um aumento na taxa de produção de oxidantes, como observado para $O_2^{\bullet -}$ e H_2O_2. De fato, estudos recentes apoiam a ideia de que o aumento na produção de EROs é fundamental para a promoção da proliferação celular. Uma das principais proteínas supressoras tumorais, a fosfatase PTEN (*phosphatase and tensin homolog*) é inativada através da oxidação do resíduo de cisteína catalítico por H_2O_2 (Lee et al., 2002). Essa inativação é fundamental na ativação da via PI3K/PIP3/AKT1 tempo suficiente para propagação do estímulo de crescimento (Kwon et al., 2004). Em queratinócitos, Ming et al. (2011) demonstraram que o silenciamento de PTEN acarretava no comprometimento do reparo de DNA via GG-NER, através da supressão da expressão de XPC. O mesmo grupo demonstrou posteriormente que SIRT1 regula a expressão de XPC via desacetilação de PTEN. Quando desacetilada, essa fosfatidil-inositol-3,4,5-trifosfatase se torna ativada e se contrapõe a geração do segundo mensageiro PIP3 (fosfatidil-inositol-3,4,5-trifosfato) da via PI3K/AKT (Ming et al., 2010). Na ausência de SIRT1, a ativação de AKT inibe a expressão de XPC através do aumento na translocação do citoplasma para o núcleo do supressor transcricional p130, em complexo com E2F4. Dessa forma, pode ser que a ausência de XPC atue como sinalização de proliferação celular, através da geração de EROs e retroalimentando a inibição de PTEN.

No modelo Xpc murino, utilizando MDFs *Xpc*$^{-/-}$ observamos um menor tempo de duplicação da população celular em condição de normóxia do que nas linhagens heterozigóticas e selvagem. Esses resultados estão de acordo com as observações de Rezvani et al. (2011) no qual queratinócitos *knockdown* para XPC adquiriram capacidade proliferativa aumentada 20 dias após o silenciamento. Além disso, também observamos uma tendência de citotoxicidade aumentada frente a danos induzidos pela fotossensibilização do AM em MDFs *Xpc*$^{-/-}$. Melis et al. (2008) demonstraram que MEFs (do inglês, *murine embryonic fibroblasts*) de camundongos

Xpc$^{-/-}$ também são mais sensíveis à exposição a hiperóxia em relação às linhagens *Xpa*$^{-/-}$ e selvagem, reforçando a ideia de que a ausência de Xpc sensibiliza as células aos efeitos tóxicos do estresse redox. No entanto, apesar de Melis et al. (2008) terem observado que MEFs *Xpc*$^{-/-}$ são mais sensíveis a estresse oxidativo, mesmo em 3% de O_2, não foi averiguado o comportamento proliferativo dessas células. Dessa forma, nossos dados não se contrapõem à literatura, fomentando futuras investigações que separem mais claramente o papel de XPC na sensibilidade celular ao estresse redox do papel do estresse redox na proliferação celular na ausência de XPC.

Uma característica peculiar do modelo de XP-C em camundongos é o prevalente desenvolvimento de tumores pulmonares (Hollander et al., 2005). Na época da publicação desses resultados, ainda não se conhecia o papel auxiliar de XPC como cofator de OGG1 no reparo de 8-oxoGua via BER (D'Errico et al., 2006), o que poderia explicar o aumento de tumores pulmonares nos camundongos *Xpc*$^{-/-}$. De fato, camundongos com dupla deleção nos genes *Ogg*$^{-/-}$*Myh*$^{-/-}$ e *Nth*$^{-/-}$*Neil1*$^{-/-}$ também desenvolvem tumores pulmonares, com assinaturas mutacionais distintas (Xie et al., 2004; Chan et al., 2009). Apesar disso, Melis et al. (2013) demonstraram através de sequenciamente do gene repórter *LacZ* em camundongos *Xpc*$^{-/-}$ que células do pulmão não acumulam mais mutações do que as selvagens. MEFs *Xpc*$^{-/-}$ em cultura, porém, acumulam mais mutações no gene *LacZ* quando cultivada em estufa com 20% de O_2 do que MEFs selvagem e *Xpa*$^{-/-}$ (Melis et al., 2013).

Em contrapartida, nossos dados indicam que o mtDNA de células XP-C se encontra mais deletado do que em células selvagens, considerando a diminuição na expressão relativa do gene *MT-ND4L*. Além disso, na ausência de XPC o mtDNA também apresenta um número elevado de lesões bloqueadoras da progressão de polimerases, mesmo em células não expostas a nenhum agente genotóxico. O mesmo efeito não foi observado no DNA nuclear, que apresentou níveis similares de lesões bloqueadoras. Entretanto, o aumento de deleção e de danos no mtDNA não é revertido após a reintrodução da proteína XPC. Moléculas de mtDNA deletadas apresentam, em teoria, vantagens replicativas em relação à molécula selvagem (Wallace, 1992; Kowald et al., 2014). De fato, deleções no mtDNA que envolvem as duas origens de replicação são raramente detectadas (Damas et al., 2012 e 2014), o que confirma o papel do menor tempo de replicação no enriquecimento de mtDNA deletado. Assim sendo, o fato de não observarmos a recuperação dos níveis de deleção no mtDNA em células corrigidas em relação à linhagem selvagem está de acordo com a natureza da genética mitocondrial, onde a população de moléculas de mtDNA selvagem se encontra em desvantagem replicativa em

relação às moléculas de mtDNA deletadas, impedindo a repopulação. Como o aumento na produção de H_2O_2 é revertido em células corrigidas, enquanto as deleções e o acúmulo de lesões não é, podemos argumentar que as modificações no mtDNA em nosso modelo experimental não são a causa primária do aumento na geração de EROs.

Nossos dados sugerem que em células XP-C o acúmulo de danos e frequência de deleção no mtDNA são, muito provavelmente, produtos colaterais de desequilíbrio redox global, ao invés de defeitos no reparo de mtDNA. Quanto à sua participação no mecanismo de tumorigênese em pacientes XP-C, o papel de mutações no mtDNA no desenvolvimento do câncer é talvez o mais controverso dentre doenças complexas e multifatoriais (Schon et al., 2012). Mutações no mDNA foram descritas em células leucêmicas já na década de 60 por Clayton & Vinograd (1967 e 1969). Estudos iniciais que propuseram uma funcionalidade entre mutações no mtDNA e câncer observaram frequências de mutações entre 50-70% das linhagens tumorais analisadas (Horton et al., 1996; Polyak et al., 1998). Nos estudos de Horton et al. (2006) uma deleção de 294 nt no gene *MT-ND1* foi encontrada em 50% das células tumorais. Essa mutação, devido à acentuada disfunção que ela acarreta, muito provavelmente, teve origem somática e não germinativa, uma vez que o indivíduo contendo essa mutação, homoplásmica ou mesmo em alta taxa de heteroplasmia, manifestaria um quadro clínico de doença mitocondrial severa. Porém, Seoane et al. (2011) demonstraram em células de gliomas humanos e em modelo murino de gliomagênese que o mtDNA não acumula mutações, mesmo com alta instabilidade genômica nuclear.

Contudo, um denominador comum a mitocôndrias, metabolismo e desenvolvimento tumoral é a sinalização redox. Conforme mencionado na seção 1.3, algumas mutações no mtDNA contribuem para o aumento da geração de EROs em células tumorais com consequente resistência a indução de apoptose e aumento da agressividade metastática (Petros et al., 2005; Shidara et al., 2005; Ishikawa et al., 2008). De acordo com essa linha de raciocínio, mutações no mtDNA que promovem a geração de EROs poderiam favorecer o desenvolvimento de tumores através do aumento na sinalização redox, estimulando a proliferação celular. Corroborando essa hipótese, Woo et al. (2012) cruzaram camundongos $Tfam^{+/-}$, que apresentam uma diminuição moderada no número de cópias e aumento de danos no mtDNA, com $Apc^{Min/+}$, um camundongo de modelo tumoral de polipose adenomatosa Coli, e observaram um aumento no número de pólipos intestinais que cresciam mais rapidamente do que no camundongo $Tfam^{+/+}/Apc^{Min/+}$. Surpreendemente, esse efeito foi revertido através do cruzamento com camundongos transgênicos expressando catalase mitocondrial (Woo et al., 2012). No modelo

XP-C, observamos a ocorrência concorrente de acúmulo de lesões e deleções em mtDNA e de aumento na taxa de geração de EROs com diminuição na atividade de enzimas detoxificadoras dessas. Esse cenário estabelece condições para que alterações na sinalização redox, aliadas a alterações metabólicas causadas pela disfunção mitocondrial possam contribuir para a transformação maligna. E, de fato, em MDFs, observamos que a deleção de Xpc leva a um aumento da taxa proliferativa em condições de normóxia em relação às concentrações de O_2 às quais as células são expostas no organismo.

Nossos resultados também demonstram que a via de controle transcricional da biogênese mitocondrial está alterada em células XP-C carregando a mutação c.1643_1644delTG, que apresentaram uma drástica redução na expressão de *PPARGC1A*. Essa descoberta nos prontificou a investigarmos outros membros da família do coativadores PGC-1, uma vez que a função biológica desse coativador transcricional apresenta sobreposição significativa com outros membros da família (Lai et al., 2008). Infelizmente, não conseguimos verificar a expressão de *PPARGC1B* mesmo utilizando quatro diferentes pares de iniciadores. Apesar de vários estudos terem demonstrado que os coativadores PGC-1α e β apresentam sobreposição no controle de programas genéticos durante o desenvolvimento cardíaco (Lai et al., 2008), alguns estudos sugerem funções distintas durante a oncogênese. Hu et al. (2012) demonstraram que PGC-1β está associado a aquisição de alongamento altenativo de telômeros (ALT – no inglês, *alternative telomere lengthening*) em modelo de linfoma de células T. Nesse estudo, os autores investigaram os mecanismos moleculares de aquisição de ALT em decorrência da perda da atividade de telomerase (mTERT) e descobriram que células tumorais positivas para ALT apresentavam um aumento na expressão de PGC-1β. Concomitantemente, células ALT+ apresentaram um aumento na produção de EROs, uma diminuição na taxa de consumo de O_2 basal e um aumento significativo na expressão de vários genes envolvidos na regulação de biogênese mitocondrial e modulação do metabolismo, entre eles PPARα (*PPARA*), TFAM e NFR2 (*NFE2L1*) que também encontramos superexpressos em células XP-C. Em outro estudo, Haq et al. (2013) descreveram um novo papel do fator de transcrição MITF (*microphthalmia-associated transcription factor*) na ativação de PGC-1α em melanoma. Os autores investigaram a mutação V600E no oncogene BRAF (*B-Raf proto-oncogene, serine/threonine kinase*), a alteração genética mais comumente encontrada em melanomas, e os mecanismos moleculares de aquisição de resistência após o tratamento com inibidores dessa serina/treonina quinase. Ficou demonstrado que a ativação de PGC-1α exerce um papel fundamental nos mecanismos de resistência em melanomas tratados com inibidores de BRAF,

o que leva a um aumento na taxa de consumo de O_2, tornando os melanócitos resistentes "viciados" em fosforilação oxidativa. Essa característica permite o uso de desacopladores mitocondriais como abordagem farmacológica a fim de inibir o crescimento tumoral ou até induzir morte celular. Estudos adicionais de transfecção de PGC-1α e/ou silenciamento de PGC-1β em células XP4PA-SV podem contribuir para o entendimento do papel distinto desses coativadores no modelo XP-C.

Para tentar desvendar o mecanismo molecular pelo qual a ausência de XPC leva às alterações transcricionais observadas no eixo NAD^+/SIRT1/PGC-1α resolvemos investigar o papel da metilação de DNA como mecanismo de controle epigenético na expressão de *PPARGC1A* em células XP-C. Essa hipótese foi baseada em dois estudos recentes que descobriram o papel da timina DNA glicosilase (TDG) na desmetilação de 5-metilcitosina oxidadas (Wu & Zhang, 2014). Os estudos de Cortellino et al. (2011) e Cortazár et al. (2011) demonstraram que o *knockout* de *Tdg* em camundongos acarretava em fenótipo de letalidade embrionária, algo incomum entre camundongos *knockout* para outras DNA glicosilases. Cortellino et al. (2011) demonstraram que na ausência de TDG, ilhas CpG de vários genes se encontravam hipermetiladas, uma marca característica de repreensão transcrional. Já nos estudos conduzidos por Cortazár et al. (2011) os autores demonstram que TDG se encontra enriquecido nas regiões promotoras de *Oct4* a *Nanog* de células-tronco embrionárias (ESCs, do inglês *embryonic stem cells*), o que não acontece em células neuronais progenitoras e em MEFs. Porque XPC interage com e estimula a atividade de TDG *in vitro* (Shimizu et al., 2003 e 2010) e é recrutada na região promotora de *Nanog* no processo de reprogramação embrionária (Fong et al., 2011), imaginamos que XPC poderia estar associada à região promotora de *PPARGC1A* estimulando a sua expressão. No entanto, a correção molecular de XPC em células deficientes não foi capaz de reverter a expressão de *PPARGC1A*. Igualmente, em células XP-C, o tratamento com 5-aza-dC, que promove a desmetilação passiva de citosinas metiladas, não foi capaz de alterar a expressão de *PPARGC1A*. Entretanto, vale ressaltar que as células XP4PA-XPC foram submetidas ao tratamento com 5-aza-dC durante o processo de correção sítio-específica da mutação em *XPC*, o que alterou seu padrão de metilação, como demonstrado pela expressão significativamente alterada de *KRT8* nessa linhagem em comparação com a linhagem parental XP4PA-SV. Desta forma, não podemos descartar completamente um efeito de metilação na diminuição da expressão de *PPARGC1A*. Experimentos futuros de imunoprecipitação da cromatina poderão responder mais adequadamente se a proteína XPC é

recrutada no promotor de *PPARGC1A*. Ademais, experimentos de co-imunoprecipitação são necessários a fim de verificar a interação *in vivo* entre XPC e TDG.

Uma última hipótese surgiu de experimentos onde resolvemos investigar linhagens de pacientes XP-C com uma mutação diferente da c.1643_1644delTG encontrada em XP4PA-SV e XP17VI. Para nossa surpresa, a linhagem XP02SP contendo a mutação c.1969G>T apresentou níveis de expressão de *PPARGC1A* comparáveis à linhagem selvagem. Inclusive, a linhagem XP03SP contendo a mesma mutação comum a XP4PA-SV e XP17VI também apresentou uma diminuição na expressão de *PPARGC1A*. Esses resultados nos levam a especular sobre a possibilidade do mRNA mutante c.1643_1644delTG gerar um novo RNA regulatório, atuando na supressão da expressão de *PPARGC1A*.

6 CONCLUSÕES

- Apesar da proteína XPC não se localizar em mitocôndrias, ela desempenha um importante papel na sensibilidade celular ao estresse redox mitocondrial, particularmente através dos complexos da CTE.
- A proteína XPC está ligada à regulação dos complexos da CTE. Esse efeito é observado através da reduzida taxa de consumo de O_2 via substrato do C-I e aumentada taxa de consumo de O_2 via substrato do C-II, na ausência de XPC. De fato, essa diferença entre a linhagem XP-C e selvagem analisadas se dá especificamente pela ausência de XP-C, uma vez que em linhagem isogênica corrigida para a expressão de *XPC* a taxa de consumo de O_2 dos complexos I e II são iguais ao do controle.
- As células XP-C produzem mais $O_2^{\bullet -}$ e H_2O_2 de fontes mitocondriais, e ao menos a produção de H_2O_2 depende da presença de XPC. Ademais, células XP-C também apresentam menor atividade de GPx.
- Em condições normais de cultura, células XP-C acumulam lesões especificamente no mtDNA, e não no DNA nuclear. Além disso, células XP-C também acumulam deleções no mtDNA. Porém, a reintrodução da proteína XPC em células mutadas para *XPC* não acarreta na repopulação de moléculas de mtDNA intactas. Dessa forma, esses efeitos observados parecem ser reflexo da exposição crônica ao desequilíbrio redox.
- Duas linhagens XP-C (XP4PA-SV e XP17VI) apresentam menor atividade de citrato sintase, que foi inicialmente relacionada à diminuição acentuada na expressão de *PPARGC1A*. Contudo, esse processo não é dependente da presença da proteína XPC. A metilação de DNA não parece ser o mecanismo epigenético que controla a expressão de *PPARGC1A* em células XP-C. Surpreendentemente, somente células XP-C contendo a mutação c.1643_1644delTG apresentam a diminuição na expressão de *PPARGC1A*.

REFERÊNCIA

AAMANN, M. D.; SORENSEN, M. M.; HVITBY, C.; BERQUIST, B. R.; MUFTUOGLU, M.; TIAN, J.; DE SOUZA-PINTO, N. C.; SCHEIBYE-KNUDSEN, M.; WILSON, D. M.; STEVNSNER, T.; BOHR, V. A. Cockayne syndrome group B protein promotes mitochondrial DNA stability by supporting the DNA repair association with the mitochondrial membrane. **The FASEB Journal**, v. 24, n. 7, 2334-2346, 2010.

ABOUSSEKHRA, A.; BIGGERSTAFF, M.; MONCOLLIN, V.; PODUST, V. N.; PROTID, M.; HQBSCHER, I. I. U.; ELGY, J-M.; WOOD, R. D. Mammalian DNA Nucleotide Excision Repair Reconstituted with Purified Protein Components. **Cell**, v. 80, p. 859-868, 1995.

ACKRELL, B. A. Progress in understanding structure-function relationships in respiratory chain complex II. **FEBS Letters**, v. 466, n. 1, p. 1-5, 2000.

AKBARI, M.; OTTERLEI, M.; PEÑA-DIAZ, 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**, v. 145, n. 4, p. 1201-1212, 2007.

ALVAREZ-GONZALEZ, R.; ALTHAUS, F. R. Poly(ADP-ribose) catabolism in mammalian cells exposed to DNA-damaging agents. **Mutation Research**, v. 218, p. 67-74, 1989.

AMOROSO, A.; CRESPAN, E.; WIMMER, U.; HUBSCHER, U.; MAGA, G. DNA polymerases and oxidative damage: friends or foes? **Current Molecular Pharmacology**, v. 1, n. 2, p. 162-170, 2008.

ANDERSON, C. T.; FRIEDBERG, E. C. The presence of nuclear and mitochondrial uracil-DNA glycosylase in extracts of human KB cells. **Nucleic Acids Research**, v. 8, n. 4, p. 875-888, 1980.

ANDERSSON, U.; SCARPULLA, R. C. Pgc-1-related coactivator, a novel, serum-inducible coactivator of nuclear respiratory factor 1-dependent transcription in mammalian cells. **Molecular Cell Biology**, v. 21, n. 11, p. 3738-3749, 2001.

ANINDYA, R.; MARI, P.-O.; KRISTENSEN, U.; KOOL, H.; GIGLIA-MARI, G.; MULLENDERS, L. H.; FOUSTERI, M.; VERMEULEN, W.; EGLY, J.-M.; SVEJSTRUP, J. Q. A ubiquitin-binding domain in Cockayne syndrome B required for transcription-coupled nucleotide excision repair. **Molecular Cell**, v. 38, n. 5, p. 637-648, 2010.

AOKI, S.; BOYCE, R. P.; HOWARD-FLANDERS, P. Sensitization of *Escherichia coli* to radiation by bromouracil: excessive post-irradiation breakdown of deoxyribonucleic acid without concomitant synthesis. **Nature**, v. 209, n. 5024, p. 686-688, 1966.

ARAÚJO, S. J.; TIRODE, F.; COIN, F.; ARAU, S. J.; POSPIECH, H.; SYVA, J. E.; STUCKI, M.; HU, U.; EGLY, J-M.; WOOD, R. D. Nucleotide excision repair of DNA with recombinant human proteins: definition of the minimal set of factors, active forms of TFIIH, and modulation by CAK. **Genes & Development**, v. 14, p. 349-359, 2000.

AYDOGAN, B.; MARSHALL, D. T.; SWARTS, S. G.; TURNER, J. E.; BOONE, A. J.; RICHARDS, N. G.; BOLCH,W.E. Site-specific OH attack to the sugar moiety of DNA: a

comparison of experimental data and computational simulation. **Radiation Research**, v. 157, p. 38-44, 2002.

BALABAN, R. S.; NEMOTO, S.; FINKEL, T. Mitochondria, Oxidants, and Aging. **Cell**, v. 120, p. 283-295, 2005.

BALASUBRAMANIAN, B.; POGOZELSKI, W. K.; TULLIUS, T. D. DNA strand breaking by the hydroxyl radical is governed by the accessible surface areas of the hydrogen atoms of the DNA backbone. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 95, p. 9738-9743, 1998.

BARONE, F.; MCCULLOCH, S. D.; MACPHERSON, P.; MAGA, G.; YAMADA, M.; NOHMI, T.; MINOPRIO, A.; MAZZEI, F.; KUNKEL, T.; KARRAN, P.; BIGNAMI, M. Replication of 2-hydroxyadenine-containing DNA and recognition by human MutSalpha. **DNA Repair**, v. 6, n. 3, p. 355-66, 2007.

BAYSAL, B. E.; FERRELL, R. E.; WILLETT-BROZICK, J. E.; LAWRENCE, E. C.; MYSSIOREK, D.; BOSCH, A.; VAN DER MEY, A.; TASCHNER, P. E.; RUBINSTEIN, W. S.; MYERS, E. N.; RICHARD 3rd, C. W.; CORNELISSE, C. J.; DEVILEE, P.; DEVLIN, B. Mutations in SDHD, a mitochondrial complex II gene, in hereditary paraganglioma. **Science**, v. 287, n. 5454, p. 848-851, 2000.

BELOUSOVA, E. A.; MAGA, G.; FAN, Y.; KUBAREVA, E. A.; ROMANOVA, E. A.; LEBEDEVA, N. A.; ORETSKAYA, T. S.; LAVRIK, O. I. DNA polymerases beta and lambda bypass thymine glycol in gapped DNA structures. **Biochemistry**, v. 49, n. 22, p. 4695-4704, 2010.

BENDER, A.; KRISHNAN, K. J.; MORRIS, C. M.; TAYLOR, G. A.; REEVE, A. K.; PERRY, R. H.; JAROS, E.; HERSHESON, J. S.; BETTS, J.; KLOPSTOCK, T.; TAYLOR, R. W.; TURNBULL, D. M. High levels of mitochondrial DNA deletions in substantia nigra neurons in aging and Parkinson disease. **Nature Genetics**, v. 38, p. 515–517, 2006.

BERG, R. J.; RUVEN, H. J.; SANDS, A. T.; DE GRUIJL, F. R.; MULLENDERS, L. H. Defective global genome repair in XPC mice is associated with skin cancer susceptibility but not with sensitivity to UVB induced erythema and edema. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 110, n. 4, p. 405-409, 1998.

BERNARDES DE JESUS, B. M.; BJØRÅS, M.; COIN, F.; EGLY, J. M. Dissection of the molecular defects caused by pathogenic mutations in the DNA repair factor XPC. **Molecular and Cellular Biology**, v. 28, n. 23, p. 7225-7235, 2008.

BARRÈS, R.; OSLER, M. E.; YAN, J.; RUNE, A.; FRITZ, T.; CAIDAHL, K.; KROOK, A.; ZIERATH, J. R. Non-CpG methylation of the PGC-1alpha promoter through DNMT3B controls mitochondrial density. **Cell Metabolism**, v. 10, n. 3, p.189-198, 2009.

BEUKERS, R.; BERENDS, W. Isolation and identification of the irradiation product of thymine. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 41, p. 550-551, 1960.

BOGLIOLO, M.; SCHUSTER, B.; STOEPKER, C.; DERKUNT, B.; SU, Y.; RAAMS, A.; TRUJILLO, J. P.; MINGUILLÓN, J.; RAMÍREZ, M. J.; PUJOL, R.; CASADO, J. A.; BAÑOS, R.; RIO, P.; KNIES, K.; ZÚÑIGA, S.; BENÍTEZ, J.; BUEREN, J. A.; JASPERS, N. G. J.; SCHÄRER, O. D.; DE WINTER, J. P.; SCHINDLER, D.; SURRALLÉS, J. Mutations in

ERCC4, encoding the DNA-repair endonuclease XPF, cause Fanconi anemia. **American Journal of Human Genetics**, v. 92, n. 5, 800-806, 2013.

BONAWITZ, N. D.; CLAYTON, D. A.; SHADEL, G. S. Initiation and beyond: multiple functions of the human mitochondrial transcription machinery. **Molecular Cell**, v. 24, p. 813-825, 2006.

BOOTH, F. W.; KIRBY, C. R. Control of gene expression in adult skeletal muscle by changes in the inherent level of contractile activity. **Biochemical Society transactions**, v. 19, n. 2, p. 374-378, 1991.

BOURSOT, P.; YONEKAWA, H.; BONHOMME, F. Heteroplasmy in mice with deletion of a large coding region of mitochondrial DNA. **Molecular Biology and Evolution**, v. 4, n. 1, p. 46-55, 1987.

BOVERIS, A.; CADENAS, E. Mitochondrial production of superoxide anions and its relationship to the antimycin insensitive respiration. **FEBS Letters**, v. 54, n. 3, p. 311-314, 1975.

BOYCE, R.P.; HOWARD-FLANDERS, P. Release of ultraviolet light-induced thymine dimers from DNA in *E. coli* K-12. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 51, n. 2,p. 293-300, 1964.

BRAND, M. D.; NICHOLLS, D. G. Assessing mitochondrial dysfunction in cells. **The Biochemical Journal**, v. 435, n. 2, p. 297-312, 2011.

BRANDON, M.; BALDI, P.; & WALLACE, D. C. Mitochondrial mutations in cancer. **Oncogene**, v. 25, n. 34, p. 4647-4662, 2006.

BRANZEI, D.; FOIANI, M. Regulation of DNA repair throughout the cell cycle. **Nature Reviews. Molecular Cell Biology**, v. 9, n. 4, p. 297-308, 2008.

BREEN, A. P.; MURPHY, J. A. Reactions of oxyl radicals with DNA. **Free Radicals in Biology & Medicine**, v. 18, p. 1033-1077, 1995.

BRIERLEY, E. J.; JOHNSON, M. A.; LIGHTOWLERS, R. N.; JAMES, O. F.; TURNBULL, D. M. Role of mitochondrial DNA mutations in human aging: implications for the central nervous system and muscle. **Annals of Neurology**, v. 43, p. 217-223, 1998.

BROOKS, P. J.; WISE, D. S.; BERRY, D. A.; KOSMOSKI, J. V.; SMERDON, M. J.; SOMERS, R. L.; MACKIE, H.; SPOONDE, A. Y.; ACKERMAN, E. J.; COLEMAN, K.; TARONE, R. E.; ROBBINS, J. H. The oxidative DNA lesion 8,5′-(*S*)-cyclo-2′-deoxyadenosine is repaired by the nucleotide excision repair pathway and blocks gene expression in mammalian cells. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 275, p. 22355-22362, 2000.

BROWN, W. M.; GEORGE, M.; WILSON, A. C. Rapid evolution of animal mitochondrial DNA. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 76, n. 4, p. 1967-1971, 1979.

BUA, E.; JOHNSON, J.; HERBST, A.; DELONG, B.; MCKENZIE, D.; SALAMAT, S.; AIKEN, J. M. Mitochondrial DNA-deletion mutations accumulate intracellularly to detrimental levels in aged human skeletal muscle fibers. **American Journal of Human Genetics**, v. 79, n. 3, p. 469-80, 2006

BUCHALLA, C. M.; WALDMAN, E. A.; LAURENTI, R. A mortalidade por doenças infecciosas no início e no final do século XX no Município de São Paulo. **Revista brasileira de epidemiologia**, v. 6, n. 4, p. 335-344, 2003.

CAMENISCH, U.; DIP, R.; SCHUMACHER, S. B.; SCHULER, B.; NAEGELI, H. Recognition of helical kinks by xeroderma pigmentosum group A protein triggers DNA excision repair. **Nature Structural & Molecular Biology**, v. 13, n. 3, p. 278-284, 2006.

CANDEIAS, L. P.; STEENKEN, S. Reaction of HO* with guanine derivatives in aqueous solution: formation of two different redox-active OH-adduct radicals and their unimolecular transformation reactions. Properties of G(-H)*. **Chemistry**, v. 6, p. 475-484, 2000.

CARDOSO, A. R.; CHAUSSE, B.; DA CUNHA, F. M.; LUÉVANO-MARTÍNEZ, L. A.; MARAZZI, T. B. M.; PESSOA, P. S.; QUELICONI, B. B.; KOWALTOWSKI, A. J. (2012). Mitochondrial compartmentalization of redox processes. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 52, n. 11-12, p. 2201-2008, 2012.

CASTILLO-SALGADO, C. Health situation analysis in the Americas, 1999-2000. **Epidemiological Bulletin**, v. 21, n. 4, p. 1-3, 2000.

CHAMBON, P.; WEILL, J. D.; MANDEL, P. Nicotinamide mononucleotide activation of new DNA-dependent polyadenylic acid synthesizing nuclear enzyme. **Biochemical and Biophysical Research Communication**, v. 11, p. 39-43, 1963.

CHAN, M. K.; OCAMPO-HAFALLA, M.T.; VARTANIAN, V.; JARUGA, P.; KIRKALI, G.; KOENIG, K. L.; BROWN, S.; LLOYD, R. S.; DIZDAROGLU, M.; TEEBOR, G. W. Targeted deletion of the genes encoding NTH1 and NEIL1 DNA N-glycosylases reveals the existence of novel carcinogenic oxidative damage to DNA. **DNA Repair**, v. 8, n. 7, p. 786-794, 2009.

CHATGILIALOGLU, C.; D'ANGELANTONIO, M.; GUERRA, M.; KALOUDIS, P.; MULAZZANI, Q.G. A reevaluation of the ambident reactivity of the guanine moiety towards hydroxyl radicals. **Angewandte Chemie International Edition in English**, v. 48, p. 2214-2217, 2009.

CHAVANNE, F.; BROUGHTON, B. C.; PIETRA, D.; NARDO, T.; BROWITT, A.; LEHMANN, A. R.; STEFANINI, M. Mutations in the XPC gene in families with xeroderma pigmentosum and consequences at the cell, protein, and transcript levels. **Cancer Research**, v. 60, n. 7, p. 1974-1982, 2000.

CHEN, Y.; FU, L. L.; WEN, X.; WANG, X. Y.; LIU, J.; CHENG, Y.; HUANG, J. Sirtuin-3 (SIRT3), a therapeutic target with oncogenic and tumor-suppressive function in cancer. **Cell Death & Disease**, v. 5, p. e1047, 2014.

CHEO, D. L.; RUVEN, H. J.; MEIRA, L. B.; HAMMER, R. E.; BURNS, D. K.; TAPPE, N. J.; VAN ZEELAND, A. A.; MULLENDERS, L. H. F.; FRIEDBERG, E. C. Characterization of defective nucleotide excision repair in XPC mutant mice. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 374, n. 1, p. 1-9, 1997.

CHEO, D. L.; BURNS, D. K.; MEIRA, L. B.; HOULE, J. F.; FRIEDBERG, E. C. Mutational Inactivation of the Xeroderma Pigmentosum Group C Gene Confers Predisposition to 2-Acetylaminofluorene-induced Liver and Lung Cancer and to Spontaneous Testicular Cancer in $Trp53^{-/-}$ Mice. **Cancer Research**, v. 59, p. 771-775, 1999.

CHUNG, F. L.; YOUNG, R.; HECHT, S. S. Detection of cyclic 1,N2-propanodeoxyguanosine adducts in DNA of rats treated with N-nitrosopyrrolidine and mice treated with crotonaldehyde. **Carcinogenesis**, v. 10, p. 1291-1297, 1989.

CLARK, J. M.; BEARDSLEY, G. P. Template length, sequence context, and 3'-5' exonuclease activity modulate replicative bypass of thymine glycol lesions *in vitro*. **Biochemistry**, v. 28, n. 2, p. 775-779, 1989.

CLAYTON, D. A.; VINOGRAD, J. Circular dimer and catenate forms of mitochondrial DNA in human leukaemic leucocytes. **Nature**, v. 216, n. 5116, p. 652-657, 1967.

_____. Complex mitochondrial DNA in leukemic and normal human myeloid cells. . **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 62, n. 4, p. 1077-1084, 1969.

CLAYTON, D. A.; DODA, J. N.; FRIEDBERG, E. C. The Absence of a Pyrimidine Dimer Repair Mechanism in Mammalian Mitochondria. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 71, n. 7, p. 2777-2781, 1974.

CLEAVER, J. E. Defective repair replication of DNA in xeroderma pigmentosum. **Nature**, v. 218, n. 5142, p. 652-656, 1968.

_____. Excision repair – its bacterial beginnings. **DNA Repair**, v. 2, n. 11, p. 1273-1274, 2003.

CLEAVER, J. E.; CROWLEY, E. UV damage, DNA repair and skin carcinogenesis. **Frontiers in Biosciences**, v. 7, p. D1024-1043, 2002.

CLEAVER, J. E.; LAM, E. T.; REVET, I. Disorders of nucleotide excision repair: the genetic and molecular basis of heterogeneity. **Nature Reviews. Genetics**, v. 10, n. 11, p. 756-768, 2009.

COIN, F.; OKSENYCH, V.; EGLY, J. M. Distinct roles for the XPB/p52 and XPD/p44 subcomplexes of TFIIH in damaged DNA opening during nucleotide excision repair. **Molecular Cell**, v. 26, n. 2, p. 245-256, 2007.

COMPE, E.; EGLY, J. M. TFIIH: when transcription met DNA repair. **Nature Reviews. Molecular Cell Biology**, v. 13, n. 6, p. 343-354, 2012.

CONSTANTINOU, A.; GUNZ, D.; EVANS, E.; LALLE, P.; BATES, P. A.; WOOD, R. D.; CLARKSON, S. G. Conserved residues of human XPG protein important for nuclease activity and function in nucleotide excision repair. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 274, n.9, p. 5637-5648, 1999.

COOKE, M. S.; EVANS, M. D.; DIZDAROGLU, M.; LUNEC, J. Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease. **The FASEB Journal**, v.17, n. 10, 1195-1214, 2003.

CORRAL-DEBRINSKI, M.; SHOFFNER, J. M.; LOTT, M. T.; WALLACE, D. C. Association of mitochondrial DNA damage with aging and coronary atherosclerotic heart disease. **Mutation Research**, v. 275, p. 169-180, 1992.

CORTÁZAR, D.; KUNZ, C.; SELFRIDGE, J.; LETTIERI, T.; SAITO, Y.; MACDOUGALL, E.; WIRZ, A.; SCHUERMANN, D.; JACOBS, A. L.; SIEGRIST, F.; STEINACHER, R.;

JIRICNY, J.; BIRD, A.; SCHÄR, P. Embryonic lethal phenotype reveals a function of TDG in maintaining epigenetic stability. **Nature**, v. 470, n. 7334, p. 419-423, 2011.

CORTELLINO, S.; XU, J.; SANNAI, M.; MOORE, R.; CARETTI, E.; CIGLIANO, A.; LE COZ, M.; DEVARAJAN, K.; WESSELS, A.; SOPRANO, D.; ABRAMOWITZ, L. K.; BARTOLOMEI, M. S.; RAMBOW, F.; BASSI, M. R.; BRUNO, T.; FANCIULLI, M.; RENNER, C.; KLEIN-SZANTO, A. J.; MATSUMOTO, Y.; KOBI, D.; DAVIDSON, I.; ALBERTI, C.; LARUE, L.; BELLACOSA, A. Thymine DNA glycosylase is essential for active DNA demethylation by linked deamination-base excision repair. **Cell**, v. 146, n. 1, p. 67-79, 2011.

COSTA, R. A. P.; ROMAGNA, C. D.; PEREIRA, J. L.; DE SOUZA-PINTO, N. C. The role of mitochondrial DNA damage in the citotoxicity of reactive oxygen species. **Journal of Bioenergetics and Biomembranes**, v. 43, n. 1, p. 25-29, 2011.

COSTA, R. A. P. **Avaliação das funções mitocondriais de células deficientes na proteína XPC, envolvida na via de reparo por excisão de nucleotídeos (NER).** 2013. 164 f. Tese (Doutorado em Fisiopatologia Médica) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2013.

CRICK, F. The double helix: a personal view. **Nature**, v. 248, n. 5451, p. 766-769, 1974.

DABOUSSI, F.; ZASLAVSKIY, M.; POIROT, L.; LOPERFIDO, M.; GOUBLE, A.; GUYOT, V.; LEDUC, S.; GALETTO, R.; GRIZOT, S.; OFICJALSKA, D.; PEREZ, C.; DELACÔTE, F.; DUPUY, A.; CHION-SOTINEL, I.; LE CLERRE, D.; LEBUHOTEL, C.; DANOS, O.; LEMAIRE, F.; OUSSEDIK, K.; CÉDRONE, F.; EPINAT, J. C.; SMITH, J.; YÁÑEZ-MUÑOZ, R. J.; DICKSON, G.; POPPLEWELL, L.; KOO, T.; VANDENDRIESSCHE, T.; CHUAH, M.K.; DUCLERT, A.; DUCHATEAU, P.; PÂQUES, F. Chromosomal context and epigenetic mechanisms control the efficacy of genome editing by rare-cutting designer endonucleases. **Nucleic Acids Research**, v. 40, n. 13, p. 6367-6379, 2012.

DAMAS, J.; CARNEIRO, J.; GONÇALVES, J.; STEWART, J. B.; SAMUELS, D. C.; AMORIM, A.; PEREIRA, F. Mitochondrial DNA deletions are associated with non-B DNA conformations. **Nucleic Acids Research**, v. 40, n. 16, 7606-7621, 2012.

DAMAS, J.; CARNEIRO, J.; AMORIM, A.; PEREIRA, F. MitoBreak: the mitochondrial DNA breakpoints database. **Nucleic Acids Research**, v. 42 (Database issue), D1261–1268, 2014.

DAS, B. B.; DEXHEIMER, T. S.; MADDALI, K.; POMMIER, Y. Role of tyrosyl-DNA phosphodiesterase (TDP1) in mitochondria. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 107, n. 46, p. 19790-19795, 2010.

DE LAAT, W. L.; APPELDOORN, E.; SUGASAWA, K.; WETERINGS, E.; JASPERS, N. G.; HOEIJMAKERS, J. H. DNA-binding polarity of human replication protein A positions nucleases in nucleotide excision repair. **Genes & Development**, v. 12, n. 16, p. 2598-2609, 1998.

DEMOTT, M. S.; ZIGMAN, S.; BAMBARA, R. A. Replication protein A stimulates long patch DNA base excision repair. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 273, n. 42, p. 27492-27498, 1998.

D'ERRICO, M.; PARLANTI, E.; TESON, M.; BERNARDES DE JESUS, B. M., DEGAN, P.; CALCAGNILE, A.; JARUGA, P.; BJØRÅS, M.; CRESCENZI, M.; PEDRINI, A. M.; EGLY,

J.-M.; ZAMBRUNO, G.; STEFANINI, M.; DIZDAROGLU, M.; DOGLIOTTI, E. New functions of XPC in the protection of human skin cells from oxidative damage. **The EMBO Journal**, v. 25, n. 18, p. 4305-4315, 2006.

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 Research, v. 61, n. 14, p. 5378-5381, 2001.

DE WEERD-KASTELEIN, E. A.; KEIJZER, W.; BOOTSMA, D. Genetic Heterogeneity of Xeroderma Pigmentosum demonstrated by Somatic Cell Hybridization. **Nature New Biology**, v. 238, p. 80-83, 1972.

DIANOV, G.; PRICE, A.; LINDAHL, T. Generation of single-nucleotide repair patches following excision of uracil residues from DNA. **Molecular and Cellular Biology**, v. 12, n. 4, p. 1605-1612, 1992.

DIANOV, G.; LINDAHL, T. Reconstitution of the DNA base excision-repair pathway. **Current Biology**, v. 4, p. 1069-1076, 1994.

DIGIOVANNA, J. J.; KRAEMER, K. H. Shining a light on xeroderma pigmentosum. **The Journal of Investigative Dermatology**, v. 132, n. 3 Pt. 2, p. 785-796, 2012.

DIONISI, O.; GALEOTTI, T.; TERRANOVA, T.; AZZI, A. Superoxide radicals and hydrogen peroxide formation in mitochondria from normal and neoplastic tissues. **Biochimica et Biophysica Acta,** v. 403, n. 2, p. 292-300, 1975.

DIZDAROGLU, M.; SCHULTE-FROHLINDE, D.; VON SONNTAG, C. Radiation chemistry of DNA, II. Strand breaks and sugar release by gamma-irradiation of DNA in aqueous solution. The effect of oxygen. **Zeitschrift für Naturforschung C**, v. 30, p. 826-828, 1975.

_____. Gamma-radiolyses of DNA in oxygenated aqueous solution. Structure of an alkali-labile site. **Zeitschrift für Naturforschung C**, v. 32, p. 1021-1022, 1977.

DIZDAROGLU, M. Free-radical-induced formation of an 8,5′-cyclo-2′-deoxyguanosine moiety in deoxyribonucleic acid. **The Biochemical Journal**, v. 238, n. 1, p. 247-254, 1986.

DODSON, M. L.; LLOYD, R. S. Mechanistic comparisons among base excision repair glycosylases. **Free Radicals in Biology & Medicine**, v. 32, n. 8, p. 678-682, 2002.

DOUWES DEKKER, P. B.; HOGENDOORN, P. C.; KUIPERS-DIJKSHOORN, N.; PRINS, F. A.; VAN DUINEN, S. G.; TASCHNER, P. E.; VAN DER MEY, A. G.; CORNELISSE, C. J. SDHD mutations in head and neck paragangliomas result in destabilization of complex II in the mitochondrial respiratory chain with loss of enzymatic activity and abnormal mitochondrial morphology. **The Journal of Pathology**, v. 201, n. 3, p. 480-486, 2003.

DRAHOTA, Z.; CHOWDHURY, S. K.; FLORYK, D.; MRACEK, T.; WILHELM, J.; RAUCHOVA, H.; LENAZ, G.; HOUSTEK, J. Glycerophosphate-dependent hydrogen peroxide production by brown adipose tissue mitochondria and its activation by ferricyanide. **Journal of Bioenergetics and Biomembranes**, v. 34, p. 105-113, 2002.

DULBECCO, R. Reactivation of Ultra-Violet-Inactivated Bacteriophage by Visible Light. **Nature**, v. 163, n. 4155, p. 949-950, 1949.

DUNCAN, B. K.; MILLER, J. H. Mutagenic deamination of cytosine residues in DNA. **Nature**, v. 287, n. 5782, p.560-561, 1980.

DUPUY, A.; VALTON, J.; LEDUC, S.; ARMIER, J.; GALETTO, R.; GOUBLE, A.; LEBUHOTEL, C.; STARY, A.; PÂQUES, F.; DUCHATEAU, P.; SARASIN, A.; DABOUSSI, F. Targeted gene therapy of xeroderma pigmentosum cells using meganuclease and TALENTM. **Public Library of Sciences One**, v. 8, n. 11, e78678, 2013.

EDENBERG, E. R.; DOWNEY, M.; TOCZYSKI, D. Polymerase stalling during replication, transcription and translation. **Current Biology**, v. 24, n. 10, p. R445–52, 2014.

ELCHURI, S.; OBERLEY, T. D.; QI, W.; EISENSTEIN, R. S.; JACKSON ROBERTS, L.; VAN REMMEN, H.; EPSTEIN, C. J.; HUANG, T. T. CuZnSOD deficiency leads to persistent and widespread oxidative damage and hepatocarcinogenesis later in life. **Oncogene**, v. 24, n. 3, p. 367-380, 2005.

EL-KHAMISY, S. F.; MASUTANI, M.; SUZUKI, H.; CALDECOTT, K. W. A requirement for PARP-1 for the assembly or stability of XRCC1 nuclear foci at sites of oxidative DNA damage. **Nucleic Acids Research**, v. 31, n. 19, p. 5526-5533, 2003.

EPE, B. Genotoxicity of singlet oxygen. **Chemical-Biological Interactions**, v. 80, n. 3, p. 239-260, 1991.

EPSTEIN, A. C.; GLEADLE, J. M.; MCNEILL, L. A.; HEWITSON, K. S.; O'ROURKE, J.; MOLE, D. R.; MUKHERJI, M.; METZEN, E.; WILSON, M. I.; DHANDA, A.; TIAN, Y. M.; MASSON, N.; HAMILTON, D. L.; JAAKKOLA, P.; BARSTEAD, R.; HODGKIN, J.; MAXWELL, P. H.; PUGH, C. W.; SCHOFIELD, C. J.; RATCLIFFE, P. J. *C. elegans* EGL-9 and mammalian homologs define a family of dioxygenases that regulate HIF by prolyl hydroxylation. **Cell**, v. 107, n. 1, p. 43-54, 2001.

EVANS, E.; MOGGS, J. G.; HWANG, J. R.; EGLY, J.-M.; WOOD, R. D. Mechanism of open complex and dual incision formation by human nucleotide excision repair factors. **The EMBO Journal**, v. 16, n. 21, p. 6559-6573, 1997.

EVANS, M. D.; DIZDAROGLU, M.; COOKE, M. S. Oxidative DNA damage and disease: induction, repair and significance. **Mutation Research**, v. 567, n. 1, p. 1-61, 2004.

FAN, L.; FUSS, J. O.; CHENG, Q. J.; ARVAI, A. S.; HAMMEL, M.; ROBERTS, V. A.; COOPER, P. K.; TAINER, J. A. XPD helicase structures and activities: insights into the cancer and aging phenotypes from XPD mutations. **Cell**, v. 133, n. 5, p. 789-800, 2008.

FANG, E. F.; SCHEIBYE-KNUDSEN, M.; BRACE, L. E.; KASSAHUN, H.; SENGUPTA, T.; NILSEN, H.; MITCHELL, J. R.; CROTEAU, D. L.; BOHR, V. A. (2014). Defective mitophagy in XPA via PARP-1 hyperactivation and NAD(+)/SIRT1 reduction. **Cell**, v. 157, n. 4, 882-896, 2014.

FIGUEIRA, T. R.; BARROS, M. H.; CAMARGO, A.; CASTILHO, R. F. FERREIRA, J. C. B.; KOWALTOWSKI, A. J.; SLUSE, F. E.; SOUZA-PINTO, N. C.; VERCESI, A. E. Mitochondria as a source of reactive oxygen and nitrogen species: from molecular mechanisms to human health. **Antioxidants & redox signaling**, v. 18, n. 16, p. 2029-2074, 2013.

FLOYD, R.A.; WEST, M. S.; ENEFF, K. L.; SCHNEIDER, J. E. Methylene blue plus light mediates 8-hydroxyguanine formation in DNA. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 273, n. 1, p. 106-111, 1989.

FONG, Y. W.; INOUYE, C.; YAMAGUCHI, T.; CATTOGLIO, C.; GRUBISIC, I.; TJIAN, R. A DNA repair complex functions as an Oct4/Sox2 coactivator in embryonic stem cells. **Cell**, v. 147, n. 1, p. 120-131, 2011.

FOX, E. J.; PRINDLE, M. J.; LOEB, L. A. Do mutator mutations fuel tumorigenesis? **Cancer Metastasis Reviews**, v. 32, n. 3-4, p. 353-361, 2013.

FROMME, J. C.; BANERJEE, A.; VERDINE, G. L. DNA glycosylase recognition and catalysis. **Current Opinion in Structural Biology**, v. 14, n. 1, p. 43-49, 2004.

GABRIELLI, D.; BELISLE, E.; SEVERINO, D.; KOWALTOWSKI, A. J.; BAPTISTA, M. S. Binding, aggregation and photochemical properties of methylene blue in mitochondrial suspensions. **Photochemistry and photobiology**, v. 79, n. 3, p. 227-232, 2004.

GANESAN, A. K.; SMITH, K. C. Dark recovery processes in *Escherichia coli* irradiated with ultraviolet light. II. Effect of uvr genes on liquid holding recovery. **Journal of Bacteriology**, v. 97, n. 3, p.1129-1133, 1969.

GARCIA, C. C.; ANGELI, J. P.; FREITAS, F. P.; GOMES, O. F.; DE OLIVEIRA, T. F.; LOUREIRO, A. P.; DI MASCIO, P.; MEDEIROS, M. H. [13C2]-Acetaldehyde promotes unequivocal formation of 1,N2-propano-2′-deoxyguanosine in human cells. **Journal of the American Chemical Society**, v. 133, p. 9140-9143, 2011.

GILLET, L.C.; SCHÄRER, O. D. Molecular mechanisms of mammalian global genome nucleotide excision repair. **Chemical Reviews**, v. 106, n. 2, p. 253-276, 2006.

GIMENEZ-ROQUEPLO, A. P.; FAVIER, J.; RUSTIN, P.; MOURAD, J. J.; PLOUIN, P. F.; CORVOL, P.; RÖTIG, A.; JEUNEMAITRE, X. The R22X mutation of the SDHD gene in hereditary paraganglioma abolishes the enzymatic activity of complex II in the mitochondrial respiratory chain and activates the hypoxia pathway. **American Journal of Human Genetics**, v. 69, n. 6, p. 1186-1197, 2001.

GOTTLIEB, E.; TOMLINSON, I. P. Mitochondrial tumour suppressors: a genetic and biochemical update. **Nature Reviews. Cancer**, v. 5, n. 11, p. 857-866, 2005.

GRADWOHL, G.; MÉNISSIER DE MURCIA, J. M.; MOLINETE, M.; SIMONIN, F.; KOKEN, M.; HOEIJMAKERS, J. H. J.; DE MURCIA, G. The second zinc-finger domain of poly(ADP-ribose) polymerase determines specificity for single-stranded breaks in DNA. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 87, n. 8, p. 2990-2994, 1990.

GROISMAN, R.; POLANOWSKA, J.; KURAOKA, I.; SAWADA, J.; SAIJO, M.; DRAPKIN, R.; KISSELEV, A. F.; TANAKA, K.; NAKATANI, Y. The ubiquitin ligase activity in the DDB2 and CSA complexes is differentially regulated by the COP9 signalosome in response to DNA damage. **Cell**, v. 113, p. 357-367, 2003.

HANAHAN, D. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. **Journal of Molecular Biology**, v. 166, n. 4, p. 557-580, 1983.

HANSFORD, R. G.; CASTRO, F. Age-linked changes in the activity of enzymes of the tricarboxylate cycle and lipid oxidation, and of carnitine content, in muscles of the rat. **Mechanisms of Ageing and Development**, v. 19, p. 191-200, 1982.

HAQ, R.; SHOAG, J.; ANDREU-PEREZ, P.; YOKOYAMA, S.; EDELMAN, H.; ROWE, G. C.; FREDERICK, D. T.; HURLEY, A. D.; NELLORE, A.; KUNG, A. L.; WARGO, J. A.; SONG, J. S.; FISHER, D. E.; ARANY, Z.; WIDLUND, H. R. Oncogenic BRAF regulates oxidative metabolism via PGC1α and MITF. **Cancer Cell**, v. 23, n. 3, p. 302-315, 2013.

HARMAN, D. Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. **Journal Gerontolology**, v. 11, n. 3, p.298-300, 1956.

_____. The biologic clock: the mitochondria? **Journal of the American Geriatric Society**, v. 20, n. 4, p. 145-147, 1972.

_____. Free radical theory of aging. **Mutation Research**, v. 275, n. 3-6, p. 257-266, 1992.

HARRIS, J. L.; JAKOB, B.; TAUCHER-SCHOLZ, G.; DIANOV, G. L.; BECHEREL, O. J.; LAVIN, M. F. Aprataxin, poly-ADP ribose polymerase 1 (PARP-1) and apurinic endonuclease 1 (APE1) function together to protect the genome against oxidative damage. **Human Molecular Genetics**, v. 18, n. 21, p. 4102-4117, 2009.

HASHIGUCHI, K.; STUART, J. A.; DE SOUZA-PINTO, N. C.; BOHR, V. A. The C-terminal alphaO helix of human Ogg1 is essential for 8-oxoguanine DNA glycosylase activity: the mitochondrial beta-Ogg1 lacks this domain and does not have glycosylase activity. **Nucleic Acids Research**, v. 32, n. 18, p. 5596-5608, 2004.

HAYAKAWA, H.; SEKIGUCHI, M. [A new repair pathway which involves direct excision of bases from DNA (tradução do autor)]. **Tanpakushitsu Kakusan Koso**, v. 24, p. 639-651, 1979.

HECHT, S. S.; UPADHYAYA, P.; WANG, M. Evolution of research on the DNA adduct chemistry of N-nitrosopyrrolidine and related aldehydes. **Chemical Research in Toxicology**, v. 24, p. 781-790, 2011.

HERRERO, A.; BARJA, G. Localization of the site of oxygen radical generation inside the complex I of heart and nonsynaptic brain mammalian mitochondria. **Journal of Bioenergetics and Biomembranes**, v. 32, p. 609-615, 2000.

HOLLANDER, M. C.; PHILBURN, R. T.; PATTERSON, A. D.; VELASCO-MIGUEL, S.; FRIEDBERG, E. C.; LINNOILA, R. I.; FORNACE, A. J. Deletion of XPC leads to lung tumors in mice and is associated with early events in human lung carcinogenesis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 102, n. 37, p. 13200–13205, 2005.

HOLMSTRÖM, K. M.; FINKEL, T. Cellular mechanisms and physiological consequences of redox-dependent signaling. **Nature Reviews. Molecular Cell Biology**, v. 15, n. 6, p. 411-421, 2014.

HORTON, T. M.; PETROS, J. A.; HEDDI, A.; SHOFFNER, J.; KAUFMAN, A. E.; GRAHAM JR., S. D.; GRAMLICH, T.; WALLACE, D. C. Novel mitochondrial DNA deletion found in a renal cell carcinoma. **Genes, chromosomes & cancer**, v. 15, n. 2, p. 95-101, 1996.

HU, J., DE SOUZA-PINTO, N. C., HARAGUCHI, K., HOGUE, B. A, JARUGA, P., GREENBERG, M. M., DIZDAROGLU, M.; BOHR, V. A. (2005). Repair of formamidopyrimidines in DNA involves different glycosylases: role of the OGG1, NTH1, and NEIL1 enzymes. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 49, p. 40544-40551, 2005.

HU, J.; HWANG, S. S.; LIESA, M.; GAN, B.; SAHIN, E.; JASKELIOFF, M.; DING, Z.; YING, H.; BOUTIN, A. T.; ZHANG, H.; JOHNSON, S.; IVANOVA, E.; KOST-ALIMOVA, M.; PROTOPOPOV, A.; WANG, Y. A.; SHIRIHAI, O. S.; CHIN, L.; DEPINHO, R. A. Antitelomerase therapy provokes ALT and mitochondrial adaptive mechanisms in cancer. **Cell**, v. 148, n. 4, p. 651-663, 2012.

HUANG, L. E.; GU, J.; SCHAU, M.; BUNN, H. F. Regulation of hypoxia-inducible factor 1alpha is mediated by an O2-dependent degradation domain via the ubiquitin-proteasome pathway. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 95, n. 14, p. 7987-7992, 1998.

HWANG, B. J.; FORD, J. M.; HANAWALT, P. C.; CHU, G. Expression of the p48 xeroderma pigmentosum gene is p53-dependent and is involved in global genomic repair. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 96, n. 2, p. 424-428, 1999.

INAMDAR, K. V.; POULIOT, J. J.; ZHOU, T.; LEES-MILLER, S. P.; RASOULI-NIA, A.; POVIRK, L. F. Conversion of phosphoglycolate to phosphate termini on 3′ overhangs of DNA double strand breaks by the human tyrosyl-DNA phosphodiesterase hTdp1. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 30, p. 27162-27168, 2002.

ISHIKAWA, K.; TAKENAGA, K.; AKIMOTO, M.; KOSHIKAWA, N.; YAMAGUCHI, A.; IMANISHI, H.; NAKADA, L.; HONMA, Y.; HAYASHI, J.-I. ROS-generating mitochondrial DNA mutations can regulate tumor cell metastasis. **Science**, v. 320, n. 5876, p. 661–664, 2008.

ISILDAR, M.; SCHUCHMANN, M. N.; SCHULTE-FROHLINDE, D.; VON SONNTAG, C. Gamma-Radiolysis of DNA in oxygenated aqueous solutions: alterations at the sugar moiety. **International journal of radiation biology and related studies in physics, chemistry, and medicine**, v. 40, p. 347-354, 1981.

ITSARA, L. S.; KENNEDY, S. R.; FOX, E. J.; YU, S.; HEWITT, J. J.; SANCHEZ-CONTRERAS, M.; CARDOZO-PELAEZ, F.; PALLANCK, L. J. Oxidative stress is not a major contributor to somatic mitochondrial DNA mutations. **Public Library of Sciences. Genetics**, v. 10, n. 2, e1003974, 2014.

IVAN, M.; KONDO, K.; YANG, H.; KIM, W.; VALIANDO, J.; OHH, M.; SALIC, A.; ASARA, J. M.; LANE, W. S.; KAELIN JR., W. G. HIFalpha targeted for VHL-mediated destruction by proline hydroxylation: implications for O_2 sensing. **Science**, v. 292, n. 5516, p. 464-468, 2001.

JACOBSON, E. L.; ANTOL, K. M.; JUAREZ-SALINAS, H.; JACOBSON, M. K. Poly(ADP-ribose) metabolism in ultraviolet irradiated human fibroblasts. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 258, p. 103–107, 1983.

JEZEK, P.; HLAVATA, L. Mitochondria in homeostasis of reactive oxygen species in cell, tissues, and organism. **International Journal of Biochemistry and Cellular Biology**, v. 37, p. 2478-2503, 2005.

JUNG, K. Y.; KODAMA, T.; GREENBERG, M. M. Repair of the major lesion resulting from C5'-oxidation of DNA. **Biochemistry**, v. 50, n. 28, p. 6273-6279, 2011.

KALYANARAMAN, B.; DARLEY-USMAR, V.; DAVIES, K. J. A.; DENNERY, P. A.; FORMAN, H. J.; GRISHAM, M. B.; MANN, G. E.; MOORE, K.; ROBERTS, L. J.; ISCHIROPOULOS, H. Measuring reactive oxygen and nitrogen species with fluorescent probes: challenges and limitations. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 52, n. 1, p. 1-6, 2012.

KAMENISCH, Y.; FOUSTERI, M.; KNOCH, J.; VON THALER, A. K.; FEHRENBACHER, B.; KATO, H.; BECKER, T.; DOLLÉ, M. E.; KUIPER, R.; MAJORA, M.; SCHALLER, M.; VAN DER HORST, G. T.; VAN STEEG, H.; RÖCKEN, M.; RAPAPORT, D.; KRUTMANN, J.; MULLENDERS, L. H.; BERNEBURG, M. Proteins of nucleotide and base excision repair pathways interact in mitochondria to protect from loss of subcutaneous fat, a hallmark of aging. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 207, n. 2, p. 379-390, 2010.

KANDELA, R. K.; BARTLETT, J. A.; INDIG, G. L. Effect of molecular structure on the selective phototoxicity of triarylmethane dyes towards tumor cells. **Photochemical & photobiological sciences**, v. 1, n. 5, p. 309-314, 2002.

KASHIYAMA, K.; NAKAZAWA, Y.; PILZ, D. T.; GUO, C.; SHIMADA, M.; SASAKI, K.; FAWCETT, H.; WING, J. F.; LEWIN, S. O.; CARR, L.; LI, T. S.; YOSHIURA, K.; UTANI, A.; HIRANO, A.; YAMASHITA, S.; GREENBLATT, D.; NARDO, T.; STEFANINI, M.; MCGIBBON, D.; SARKANY, R.; FASSIHI, H.; TAKAHASHI, Y.; NAGAYAMA, Y.; MITSUTAKE, N.; LEHMANN, A. R.; OGI, T. Malfunction of nuclease ERCC1-XPF results in diverse clinical manifestations and causes Cockayne syndrome, xeroderma pigmentosum, and Fanconi anemia. **American Journal of Human Genetics**, v. 92, n. 5, 807-819, 2013

KECK, K. Formation of cyclonucleotides during irradiation of aqueous solutions of purine nucleotides. **Zeitschrift für Naturforschung B**, v. 23, p. 1034-1043, 1968.

KELNER, A. Effect of Visible Light on the Recovery of *Streptomyces griseus* Conidia from Ultra-violet Irradiation Injury. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 35, n. 2, p. 73-79, 1949.

KHAN, S. G.; OH, K. S.; SHAHLAVI, T.; UEDA, T.; BUSCH, D. B.; INUI, H.; EMMERT, S.; IMOTO, K.; MUNIZ-MEDINA, V.; BAKER, C. C.; DIGIOVANNA, J. J.; SCHMIDT, D.; KHADAVI, A.; METIN, A.; GOZUKARA, E.; SLOR, H.; SARASIN, A.; KRAEMER, K. H. Reduced XPC DNA repair gene mRNA levels in clinically normal parents of xeroderma pigmentosum patients. **Carcinogenesis**, v. 27, n. 1, p.84-94, 2006.

KLUNGLAND, A.; LINDAHL, T. Second pathway for completion of human DNA base excision-repair: reconstitution with purified proteins and requirement for DNase IV (FEN1). **The EMBO Journal**, v. 16, n. 11, p. 3341-3348, 1997.

KLUNGLAND, A.; HÖSS, M.; GUNZ, D.; CONSTANTINOU, A.; CLARKSON, S. G.; DOETSCH, P. W.; BOLTON, P. H.; WOOD, R. D.; LINDAHL, T. Base excision repair of oxidative DNA damage activated by XPG protein. **Molecular Cell**, v. 3, n. 1, p. 33-42, 1999.

KORSHUNOV, S. S.; SKULACHEV, V. P.; STARKOV, A. A. High protonic potential actuates a mechanism of production of reactive oxygen species in mitochondria. **FEBS Letters**, v. 416, n. 1, p. 15-18, 1997.

KOVALENKO, O. A.; SANTOS, J. H. Analysis of oxidative damage by gene-specific quantitative PCR. **Current Protocols in Human Genetics**, Chapter 19, Unit 19.1, 2009.

KOWALD, A.; DAWSON, M.; KIRKWOOD, T. B. Mitochondrial mutations and ageing: can mitochondrial deletion mutants accumulate via a size based replication advantage? **Journal of Theoretical Biology**, v. 340, p. 111-118, 2014.

KOWALTOWSKI, A. J.; TURIN, J.; INDIG, G. L.; VERCESI, A. E. Mitochondrial effects of triarylmethane dyes. **Journal of bioenergetics and biomembranes**, v. 31, n. 6, p. 581-590, 1999.

KRAEMER, K. H.; LEE, M. M.; ANDREWS, A. D.; LAMBERT, W. C. The role of sunlight and DNA repair in melanoma and nonmelanoma skin cancer. The xeroderma pigmentosum paradigm. **Archives of Dermatology**, v. 130, n. 8, p. 1018-1021, 1994.

KRAYTSBERG, Y.; KUDRYAVTSEVA, E.; MCKEE, A. C.; GEULA, C.; KOWALL, N. W.; KHRAPKO, K. Mitochondrial DNA deletions are abundant and cause functional impairment in aged human substantia nigra neurons. **Nature Genetics**, v. 38, p. 518-520, 2006.

KRISHNAN, K. J.; GREAVES, L. C.; REEVE, A. K.; TURNBULL, D. The ageing mitochondrial genome. **Nucleic Acids Research**, v. 35, n. 22, p. 7399-7405, 2007.

KUCHINO, Y.; MORI, F.; KASAI, H.; INOUE, H.; IWAI, S.; MIURA, K.; OHTSUKA, E.; NISHIMURA, S. Misreading of DNA templates containing 8-hydroxydeoxyguanosine at the modified base and at adjacent residues. **Nature**, v. 327, n. 6117, p. 77-79, 1987

KUSSMAUL, L.; HIRST, J. The mechanism of superoxide production by NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I) from bovine heart mitochondria. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 103, p. 7607-7612, 2006.

KWON, J.; LEE, S. R.; YANG, K. S.; AHN, Y.; KIM, Y. J.; STADTMAN, E. R.; RHEE, S. G. Reversible oxidation and inactivation of the tumor suppressor PTEN in cells stimulated with peptide growth factors. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 101, n. 47, p. 16419-16424, 2004.

LAGERWERF, S.; VROUWE, M. G.; OVERMEER, R. M.; FOUSTERI, M. I.; MULLENDERS, L. H. DNA damage response and transcription. **DNA Repair**, v. 10, p. 743-750, 2011.

LAI, L.; LEONE, T. C.; ZECHNER, C.; SCHAEFFER, P. J.; KELLY, S. M.; FLANAGAN, D. P.; MEDEIROS, D. M.; KOVACS, A.; KELLY, D. P. Transcriptional coactivators PGC-1alpha and PGC-1beta control overlapping programs required for perinatal maturation of the heart. **Genes & Development**, v. 22, n. 14, p. 1948-1961, 2008

LAKSHMIPATHY, U.; CAMPBELL, C. Mitochondrial DNA ligase III function is independent of Xrcc1. **Nucleic Acids Research**, v. 28, n. 20, p. 3880-3886, 2000.

LAMBERT, A. J.; BUCKINGHAM, J. A.; BOYSEN, H. M.; BRAND, M. D. Diphenyleneiodonium acutely inhibits reactive oxygen species production by mitochondrial complex I during reverse, but not forward electron transport. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1777, n. 5, p. 397-403, 2008.

LANGELIER, M.-F.; PASCAL, J. M. PARP-1 mechanism for coupling DNA damage detection to poly(ADP-ribose) synthesis. **Current Opinion in Structural Biology**, v. 23, n. 1, 134-143, 2013.

LAWRENCE, R. A.; BURK, R. F. Glutathione peroxidase activity in selenium-deficient rat liver. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 71, n. 4, p. 952-958, 1976.

LEE, S. R.; YANG, K. S.; KWON, J.; LEE, C.; JEONG, W.; RHEE, S. G. Reversible inactivation of the tumor suppressor PTEN by H_2O_2. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 23, p. 20336-20342, 2002.

LEGERSKI, R. J.; PETERSON, C. Expression cloning of a human DNA repair gene involved in xeroderma pigmentosum group C. **Nature**, v. 359, n. 6390, p. 70-73, 1992.

LEITE, R. A.; MARCHETTO, M. C.; MUOTRI, A. R.; VASCONCELOS, D. D. M.; DE OLIVEIRA, Z. N. P.; MACHADO, M. C. R.; MENCK, C. F. M. Identification of XP complementation groups by recombinant adenovirus carrying DNA repair genes. **The Journal of Investigative Dermatology**, v. 129, n. 2, p. 502-506, 2009.

LENAZ, G.; BARACCA, A.; CARELLI, V.; D'AURELIO, M.; SGARBI, G.; SOLAINI, G. Bioenergetics of mitochondrial diseases associated with mtDNA mutations. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1658, n. 1-2, p. 89-94, 2004.

LE MAY, N.; MOTA-FERNANDES, D.; VÉLEZ-CRUZ, R.; ILTIS, I.; BIARD, D.; EGLY, J.-M. NER factors are recruited to active promoters and facilitate chromatin modification for transcription in the absence of exogenous genotoxic attack. **Molecular Cell**, v. 38, n. 1, p. 54-66, 2010.

LEPPARD, J. B.; DONG, Z.; MACKEY, Z. B.; TOMKINSON, A. E. (2003). Physical and Functional Interaction between DNA Ligase III and Poly(ADP-Ribose) Polymerase 1 in DNA Single-Strand Break Repair. **Molecular and Cellular Biology**, v. 23, n. 16, p. 5919-5927, 2003.

LEVIN, D. S.; MCKENNA, A. E.; MOTYCKA, T. A.; MATSUMOTO, Y.; TOMKINSON, A. E. Interaction between PCNA and DNA ligase I is critical for joining of Okazaki fragments and long-patch base-excision repair. **Current Biology**, v. 10, n. 15, p. 919-922, 2000.

LI, L.; BALES, E. S.; PETERSON, C. A.; LEGERSKI, R. J. Characterization of molecular defects in xeroderma pigmentosum group C. **Nature Genetics**, v. 5, n. 4, p. 413-417, 1993.

LI, M.; LU, L.; YANG, C.; WANG, S.; YU, X. The FHA and BRCT domains recognize ADP-ribosylation during DNA damage response. **Genes & Development**, v. 27, n. 16, 1752–1768, 2013.

LI, M.; YU, X. The role of poly(ADP-ribosyl)ation in DNA damage response and cancer chemotherapy. **Oncogene**, p. 1-8 [publicação online anterior à impressão], 2014.

LIN, J.; HANDSCHIN, C.; SPIEGELMAN, B. M. Metabolic control through the PGC-1 family of transcription coactivators. **Cell Metabolism**, v. 1, n. 6, p. 361-370, 2005.

LINDAHL, M.; MATA-CABANA, A.; KIESELBACH T. The disulfide proteome and other reactive cysteine proteomes: analysis and functional significance. **Antioxidants & redox signaling**, v. 14, n. 12, p. 2581-2642, 2011.

LINDAHL, T.; NYBERG, B. Rate of depurination of native deoxyribonucleic acid. **Biochemistry**, v.11, n. 19, p. 3610-3618, 1972.

_____. Heat-induced deamination of cytosine residues in deoxyribonucleic acid. **Biochemistry**, 1974 v. 13, n. 16, p. 3405-3410, 1974.

LINDAHL, T. An N-Glycosidase from *Escherichia coli* That Releases Free Uracil from DNA Containing Deaminated Cytosine Residues. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 71, n. 9, p. 3649-3653, 1974.

_____. DNA glycosylases, endonucleases for apurinic/apyrimidinic sites, and base excision-repair. **Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology**, v. 22, p. 135-192, 1979.

_____. DNA repair enzymes. **Annual Review of Biochemistry**, v. 51, p. 61-87, 1982.

LINNANE, A. W.; MARZUKI, S.; OZAWA, T.; TANAKA, M. Mitochondrial DNA mutations as an important contributor to ageing and degenerative diseases. **Lancet**, v. 1, n. 8639, p. 642-645, 1989.

LIU, P.; QIAN, L.; SUNG, J.-S.; DE SOUZA-PINTO, N. C.; ZHENG, L., BOGENHAGEN, D. F.; BOHR, V. A.; WILSON III, D. M.; SHEN, B.; DEMPLE, B. Removal of oxidative DNA damage via FEN1-dependent long-patch base excision repair in human cell mitochondria. **Molecular and Cellular Biology**, v. 28, n. 16, p. 4975-4987, 2008.

LOEB, L. A.; SPRINGGATE, C. F.; BATTULA, N. Errors in DNA replication as a basis of malignant changes. **Cancer Research**, v. 34, n. 9, p. 2311-2321, 1974.

LONGLEY, M. J.; PRASAD, R.; SRIVASTAVA, D. K.; WILSON, S. H.; COPELAND, W. C. Identification of 5'-deoxyribose phosphate lyase activity in human DNA polymerase gamma and its role in mitochondrial base excision repair *in vitro*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 95, n. 21, p. 12244-12248, 1998.

LOSCHEN, G.; FLOHÉ, L.; CHANCE, B. Respiratory chain linked H(2)O(2) production in pigeon heart mitochondria. **FEBS Letters**, v. 18, n. 2, p 261-264, 1971.

MAILLARD, O.; SOLYOM, S.; NAEGELI, H. An aromatic sensor with aversion to damaged strands confers versatility to DNA repair. **Public Library of Sciences. Biology**, v. 5, n. 4, e79 p. 717–728, 2007.

MAILLOUX, R. J.; MCBRIDE, S. L.; HARPER, M.-E. Unearthing the secrets of mitochondrial ROS and glutathione in bioenergetics. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 38, n. 12, p. 592-602, 2013.

MANDAL, S. M.; HEGDE, M. L.; CHATTERJEE, A.; HEGDE, P. M.; SZCZESNY, B.; BANERJEE, D.; BOLDOGH, I.; GAO, R.; FALKENBERG, M.; GUSTAFSSON, C. M.; SARKAR, P. S.; HAZRA, T. K. Role of human DNA glycosylase Nei-like 2 (NEIL2) and single strand break repair protein polynucleotide kinase 3’-phosphatase in maintenance of mitochondrial genome. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 287, n. 4, p. 2819-2829, 2012.

MARIETTA, C.; BROOKS, P. J. Transcriptional bypass of bulky DNA lesions causes new mutant RNA transcripts in human cells, **EMBO Reports**, v. 8, n. 4, p. 388-393, 2007.

MARTEIJN, J. A.; LANS, H.; VERMEULEN, V.; HOEIJMAKERS, J. H. J. Understanding nucleotide excision repair and its roles in cancer and ageing. **Nature Reviews. Molecular Cell Biology**, v. 15, n. 7, p. 465-481, 2014.

MASUTANI, C.; SUGASAWA, K.; YANAGISAWA, J.; SONOYAMA, T.; UI, M.; ENOMOTO, T.; TAKIO, K.; TANAKA, K.; VAN DER SPEK, P. J.; BOOTSMA, D. Purification and cloning of a nucleotide excision repair complex involving the xeroderma pigmentosum group C protein and a human homologue of yeast RAD23. **The EMBO Journal**, v. 13, n. 8, p. 1831-1843, 1994.

MATHERS, C. D.; LONCAR, D. Projection of global mortality and burden of disease from 2002 to 2030. **Public Library of Sciences**, v. 648, n. 3, p. 154-161, 2006.

MATSUDA, N.; SATO, S.; SHIBA, K.; OKATSU, K.; SAISHO, K.; GAUTIER, C. A.; SOU, Y. S.; SAIKI, S.; KAWAJIRI, S.; SATO, F.; KIMURA, M.; KOMATSU, M.; HATTORI, N.; TANAKA, K. PINK1 stabilized by mitochondrial depolarization recruits Parkin to damaged mitochondria and activates latent Parkin for mitophagy. **The Journal of cell biology**, v. 189, n. 2, p. 211-221, 2010.

MATTIAZZI, M.; VIJAYVERGIYA, C.; GAJEWSKI, C. D.; DEVIVO, D. C.; LENAZ, G.; WIEDMANN, M.; MANFREDI, G. The mtDNA T8993G (NARP) mutation results in an impairment of oxidative phosphorylation that can be improved by antioxidants. **Human Molecular Genetics**, v. 13, n. 3, p. 869-879, 2004.

MAYNARD, S. P.; MILLER, R. A. Fibroblasts from long-lived Snell dwarf mice are resistant to oxygen-induced *in vitro* growth arrest. **Aging Cell**, v. 5, n. 1, p. 89-96, 2006.

MAYNARD, S.; SCHURMAN, S. H.; HARBOE, C.; DE SOUZA-PINTO, N. C.; BOHR, V. A. Base excision repair of oxidative DNA damage and association with cancer and aging. **Carcinogenesis**, v. 30, n. 1, p. 2-10, 2009.

MAYNARD, S.; DE SOUZA-PINTO, N. C.; SCHEIBYE-KNUDSEN, M.; BOHR, V. A. Mitochondrial base excision repair assays. **Methods** (San Diego, California), v. 51, n. 4, p. 416-425, 2010.

MAYNE, L. V.; LEHMANN, A. R. Failure of RNA synthesis to recover after UV irradiation: an early defect in cells from individuals with Cockayne's syndrome and xeroderma pigmentosum. **Cancer Research**, v. 42, n. 4, p. 1473-1478, 1982.

MCCORD, J. M.; FRIDOVICH, I. Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocuprein (hemocuprein). **The Journal Biology Chemistry**, v. 244, n. 22, p. 6049-6055, 1969.

MCKENZIE, M.; RYAN M.Y. Assembly factors of human mitochondrial complex I and their defects in disease. **The International Union of Biochemistry and Molecular Biology Life**, v. 62, n. 7, p. 497-502, 2010.

MEIRHAEGHE, A.; CROWLEY, V.; LENAGHAN, C.; LELLIOTT, C.; GREEN, K.; STEWART, A.; HART, K.; SCHINNER, S.; SETHI, J. K.; YEO, G.; BRAND, M. D.; CORTRIGHT, R. N.; O'RAHILLY, S.; MONTAGUE, C.; VIDAL-PUIG, A. J. Characterization of the human, mouse and rat PGC1 beta (peroxisome-proliferator-activated receptor-gamma co-activator 1 beta) gene in vitro and in vivo. **The Biochemical journal**, v. 373, n. 1, p. 155-165, 2003.

MELIS, J. P. M.; WIJNHOVEN, S. W. P.; BEEMS, R. B.; ROODBERGEN, M.; VAN DEN BERG, J.; MOON, H.; FRIEDBERG, E.; VAN DER HORST, G. T. J.; HOEIJMAKERS, J. H. J.; VIJG, J.; VAN STEEG, H. Mouse models for xeroderma pigmentosum group A and group C show divergent cancer phenotypes. **Cancer Research**, v. 68, n. 5, p. 1347-1353, 2008.

MELIS, J. P. M.; KUIPER, R. V.; ZWART, E.; ROBINSON, J.; PENNINGS, J. L. A.; VAN OOSTROM, C. T.; M., LUIJTEN, M.; VAN STEEG, H. Slow accumulation of mutations in Xpc-/- mice upon induction of oxidative stress. **DNA Repair**, v. 12, n. 12, 1081-1086, 2013.

MENONI, H.; HOEIJMAKERS, J. H.; VERMEULEN, W. Nucleotide excision repair-initiating proteins bind to oxidative DNA lesions *in vivo*. **The Journal of Cell Biology**, v. 199, p. 1037-1046, 2012.

MIAO, F.; BOUZIANE, M.; DAMMANN, R.; MASUTANI, C.; HANAOKA, F.; PFEIFER, G.; O'CONNOR, T. R. 3-Methyladenine-DNA glycosylase (MPG protein) interacts with human RAD23 proteins. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 37, p. 28433–28438, 2000.

MICHIKAWA, Y.; MAZZUCCHELLI, F.; BRESOLIN, N.; SCARLATO, G.; ATTARDI, G. Aging-dependent large accumulation of point mutations in the human mtDNA control region for replication. **Science**, v. 286, p. 774-779, 1999.

MILANOWSKA, K.; KRWAWICZ, J.; PAPAJ, G.; KOSINSKI, J.; POLESZAK, K.; LESIAK, J.; OSINSKA, E.; ROTHER, K.; BUJNICKI, J. M. REPAIRtoire – a database of DNA repair pathways. **Nucleic Acids Research**, v. 39 (Database issue), p. D788-792, 2011.

MILLER, J., MIASKIEWICZ, K., OSMAN, R. Structure–function studies of DNA damage using ab initio quantum mechanics and molecular dynamics simulation. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 726, p. 71-91, 1994.

MIN, J.-H.; PAVLETICH, N. P. Recognition of DNA damage by the Rad4 nucleotide excision repair protein. **Nature**, v. 449, n. 7162, p. 570-575, 2007.

MING, M.; SHEA, C. R.; GUO, X.; LI, X.; SOLTANI, K.; HAN, W.; HE, Y.-Y. Regulation of global genome nucleotide excision repair by SIRT1 through xeroderma pigmentosum C. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 107, n. 52, p. 22623-22628, 2010.

MING, M.; FENG, L.; SHEA, C. R.; SOLTANI, K.; ZHAO, B.; HAN, W.; SMART, R. C.; TREMPUS, C. S.; HE, Y. Y. PTEN positively regulates UVB-induced DNA damage repair. **Cancer Research**, v. 71, n. 15, p. 5287-5295, 2011.

MISSURA, M.; BUTERIN, T.; HINDGES, R.; HÜBSCHER, U.; KASPÁRKOVÁ, J.; BRABEC, V.; NAEGELI, H. Double-check probing of DNA bending and unwinding by XPA-RPA: an architectural function in DNA repair. **The EMBO Journal**, v. 20, n. 13, p. 3554-3564, 2001.

MITCHELL P. Possible molecular mechanisms of the proton-motive function of cytochrome systems. **Journal Theoretical Biology**, v. 62, p. 327-367, 1976.

MOSER, J.; KOOL, H.; GIAKZIDIS, I.; CALDECOTT, K.; MULLENDERS, L. H.; FOUSTERI, M. I. Sealing of chromosomal DNA nicks during nucleotide excision repair

requires XRCC1 and DNA ligase III a in a cell-cycle-specific manner. **Molecular Cell**, v. 27, p. 311-323, 2007.

MUFTUOGLU, M.; MORI, M. P.; DE SOUZA-PINTO, N. C. Formation and repair of oxidative damage in the mitochondrial DNA. **Mitochondrion**, v. 17, p. 164-181, 2014.

MUKHOPADHYAY, P.; RAJESH, M.; YOSHIHIRO, K.; HASKÓ, G.; PACHER, P. Simple quantitative detection of mitochondrial superoxide production in live cells. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 358, n. 1, p. 203-208, 2007.

MULLER, F. L.; LIU, Y.; VAN REMMEN, H. Complex III releases superoxide to both sides of the inner mitochondrial membrane. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 279, p. 49064-49073, 2004.

MULLER, F. L.; SONG,W.; LIU, Y.; CHAUDHURI, A.; PIEKE-DAHL, S.; STRONG, R.; HUANG, T. T.; EPSTEIN, C. J.; ROBERTS II, L. J.; CSETE, M.; FAULKNER, J. A.; VAN REMMEN, H. Absence of CuZn superoxide dismutase leads to elevated oxidative stress and acceleration of age-dependent skeletal muscle atrophy. **Free Radicals in Biology & Medicine**, v. 40, n. 11, p. 1993-2004, 2006.

MULLER, F. L.; SONG, W.; JANG, Y. C.; LIU, Y.; SABIA, M.; RICHARDSON, A.; VAN REMMEN, H. Denervation-induced skeletalmuscle atrophy is associated with increasedmitochondrial ROS production. **American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology**, v. 293, n. 3, p. R1159-R1168, 2007.

MULLER-HOCKER, J. Cytochrome-c-oxidase deficient cardiomyocytes in the human heart - an age-related phenomenon. A histochemical ultracytochemical study. **American Journal of Pathology**, v. 134, p. 1167-1173, 1989.

MULLER-HOCKER, J.; SEIBEL, P.; SCHNEIDERBANGER, K.; KADENBACH, B. Different in situ hybridization patterns of mitochondrial DNA in cytochrome c oxidase-deficient extraocular muscle fibres in the elderly. **Virchows Archiv. A, Pathological Anatomy and Histopathology**, v. 422, p. 7-15, 1993.

NARDO, T.; ONEDA, R.; SPIVAK, G.; VAZ, B.; MORTIER, L.; THOMAS, P.; ORIOLI, D.; LAUGEL, V.; STARY, A.; HANAWALT, P. C.; SARASIN, A.; STEFANINI, M. A UV sensitive syndrome patient with a specific CSA mutation reveals separable roles for CSA in response to UV and oxidative DNA damage. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 106, p. 6209-6214, 2009.

NARENDRA, D. P.; JIN, S. M.; TANAKA, A.; SUEN, D. F.; GAUTIER, C. A.; SHEN, J.; COOKSON, M. R.; YOULE, R. J. PINK1 is selectively stabilized on impaired mitochondria to activate Parkin. **Public Library of Sciences Biology**, v. 8, n. 1, p. e1000298, 2010.

NG, J. M. Y.; VERMEULEN, W.; VAN DER HORST, G. T. J.; BERGINK, S.; SUGASAWA, K.; VRIELING, H.; HOEIJMAKERS, J. H. J. A novel regulation mechanism of DNA repair by damage-induced and RAD23-dependent stabilization of xeroderma pigmentosum group C protein. **Genes & Development**, v. 17, p. 1630-1645, 2003.

NILSEN, H.; OTTERLEI, M.; HAUG, T.; SOLUM, K.; NAGELHUS, T. A.; SKORPEN, F.; KROKAN, H. E. Nuclear and mitochondrial uracil-DNA glycosylases are generated by alternative splicing and transcription from different positions in the UNG gene. **Nucleic Acids Research**, v. 25, n. 4, p. 750-755, 1997.

NISHI, R.; OKUDA, Y.; WATANABE, E.; MORI, T.; IWAI, S.; MASUTANI, C.; SUGASAWA, K.; HANAOKA, F. Centrin 2 stimulates nucleotide excision repair by interacting with xeroderma pigmentosum group C protein. **Molecular Cell Biology**, v. 25, n. 13, p. 5664-5674, 2005.

NISHIOKA, K.; OHTSUBO, T.; ODA, H.; FUJIWARA, T.; KANG, D.; SUGIMACHI, K.; NAKABEPPU, Y. Expression and differential intracellular localization of two major forms of human 8-oxoguanine DNA glycosylase encoded by alternatively spliced OGG1 mRNAs. **Molecular Biology of the Cell**, v. 10, p. 1637-1652, 1999.

OHNISHI, T.; TRUMPOWER, B. L. Differential effects of antimycin on ubisemiquinone bound in different environments in isolated succinate - cytochrome c reductase complex. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 255, n. 8, p. 3278-3284, 1980.

OKANO, S.; LAN, L.; CALDECOTT, K. W.; MORI, T.; YASUI, A. Spatial and temporal cellular responses to single-strand breaks in human cells. **Molecular and Cellular Biology**, v. 23, p. 3974-3981, 2003.

OKSENYCH, V.; BERNARDES DE JESUS, B.; ZHOVMER, A.; EGLY, J. M.; COIN, F. Molecular insights into the recruitment of TFIIH to sites of DNA damage. **The EMBO Journal**, v. 28, n. 19, p. 2971-2980, 2009.

OLIVEIRA, C. S.; TURCHIELLO, R.; KOWALTOWSKI, A. J.; INDIG, G. L.; BAPTISTA, M. S. Major determinants of photoinduced cell death: Subcellular localization versus photosensitization efficiency. **Free Radicals in Biology & Medicine**, v. 51, n. 4, p. 824-833, 2011.

PARSONS, J. L.; DIANOVA, I. I.; DIANOV, G. L. APE1 is the major 3'-phosphoglycolate activity in human cell extracts. **Nucleic Acids Research**, v. 32, n. 12, p. 3531-3536. 2004.

PAYNE, C. M.; WEBER, C.; CROWLEY-SKILLICORN, C.; DVORAK, K.; BERNSTEIN, H.; BERNSTEIN, C.; HOLUBEC, H.; DVORAKOVA, B.; GAREWAL, H. Deoxycholate induces mitochondrial oxidative stress and activates NF-kappaB through multiple mechanisms in HCT-116 colon epithelial cells. **Carcinogenesis**, v. 28, n. 1, p.215-222, 2007.

PETROS, J. A.; BAUMANN, A. K.; RUIZ-PESINI, E.; AMIN, M. B.; SUN, C. Q.; HALL, J.; LIM, S.; ISSA, M. M.; FLANDERS, W. D.; HOSSEINI, S. H.; MARSHALL, F. F.; WALLACE, D. C. mtDNA mutations increase tumorigenicity in prostate cancer. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 102, n. 3, p.719-724, 2005.

PFAFFL, M. W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. **Nucleic Acids Research**, v. 29, n. 9, e45, 2001.

PFLAUM, M.; BOITEUX, S.; EPE, B. Visible light generates oxidative DNA base modifications in high excess of strand breaks in mammalian cells. **Carcinogenesis**, v. 15, n. 2, p. 297-300, 1994.

PLESCHKE, J. M.; KLECZKOWSKA, H. E.; STROHM, M.; ALTHAUS, F. R. Poly(ADP-ribose) binds to specific domains in DNA damage checkpoint proteins. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 52, p. 40974-40980, 2000.

POGOZELSKI, W. K.; TULLIUS, T. D. Oxidative strand scission of nucleic acids: routes initiated by hydrogen abstraction from the sugar moiety. **Chemical Reviews**, v. 98, p. 1089-1108, 1998.

POLYAK, K.; LI, Y.; ZHU, H.; LENGAUER, C.; WILLSON, J. K.; MARKOWITZ, S. D.; TRUSH, M. A.; KINZLER, K. W.; VOGELSTEIN, B. Somatic mutations of the mitochondrial genome in human colorectal tumours. **Nature Genetics**, v. 20, n. 3, p. 291-293, 1998.

PUEBLA-OSORIO, N.; LACEY, D. B.; ALT, F. W.; ZHU, C. Early embryonic lethality due to targeted inactivation of DNA ligase III. **Molecular and Cellular Biology**, v. 26, n. 10, p. 3935-3941, 2006.

QUILLIET, X.; CHEVALLIER-LAGENTE, O.; ZENG, L.; CALVAYRAC, R.; MEZZINA, M.; SARASIN, A.; VUILLAUME, M.; VII, P. Retroviral-mediated correction of DNA repair defect in xeroderma pigmentosum cells is associated with recovery of catalase activity. **Mutation Research**, v. 385, n. 3, p. 235-242, 1997.

RALEIGH, J.A.; KREMERS, W.; WHITEHOUSE, R. Radiation chemistry of nucleotides: 8,5′-cyclonucleotide formation and phosphate release initiated by hydroxyl radical attack on adenosine monophosphates. **Radiation Research**, v. 65, p. 414-422, 1976.

RAO, K. S. Mechanisms of Disease: DNA repair defects and neurological disease. **Nature Clinical Practice Neurology**, v. 3, n. 3, p. 162-172, 2007.

RAVANAT, J. L.; CADET, J. Reaction of singlet oxygen with 2'-deoxyguanosine and DNA. Isolation and characterization of the main oxidation products. **Chemical Research in Toxicology**, v. 8, n. 3, p. 379-388, 1995.

RAVANAT, J. L.; DI MASCIO, M. P.; MARTINEZ, G. R.; MEDEIROS, M. H. Singlet oxygen induces oxidation of cellular DNA. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 276, p. 40601-40604, 2001.

REARDON, J. T.; NICHOLS, A. F.; KEENEY, S.; SMITH, C. A.; TAYLOR, J. S.; LINN, S.; SANCAR, A. Comparative analysis of binding of human damaged DNA-binding protein (XPE) and *Escherichia coli* damage recognition protein (UvrA) to the major ultraviolet photoproducts: T[c,s]T, T[t,s]T, T[6-4]T, and T[Dewar]T. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 268, n. 28, p. 21301-2138, 1993.

REZVANI, H. R.; KIM, A. L.; ROSSIGNOL, R.; ALI, N.; DALY, M.; MAHFOUF, W.; BELLANCE, N.; TAÏEB, A.; DE VERNEUIL, H.; MAZURIER, F.; BICKERS, D. R. (2011). XPC silencing in normal human keratinocytes triggers metabolic alterations that drive the formation of squamous cell carcinomas. **Journal of Clinical Investigation**, v. 121, n. 1, p. 195-211, 2011.

RIEDL, T.; HANAOKA, F.; EGLY, J.-M. The comings and goings of nucleotide excision repair factors on damaged DNA. **The EMBO Journal**, v. 22, n. 19, p. 5293-5303, 2003.

ROBERTS, S. A.; GORDENIN, D. A. Hypermutation in human cancer genomes: footprints and mechanisms. **Nature Reviews. Cancer**, v. 14, n. 12, n. 786-800, 2014.

ROBINSON, K. M.; JANES, M. S.; PEHAR, M.; MONETTE, J. S.; ROSS, M. F.; HAGEN, T. M.; MURPHY, M. P.; BECKMAN, J. S. Selective fluorescent imaging of superoxide *in vivo*

using ethidium-based probes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 103, n. 41, p. 15038-15043, 2006.

ROMAGNA, C. D. **Estudo do papel de lesões oxidativas ao DNA mitocondrial na morte celular induzida por geradores de oxigênio singlete**. 2012. 100 f. Dissertação (Mestrado em Ciências (Bioquímica) – Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

RUBIO, M. A.; KIM, S. H.; CAMPISI, J. Reversible manipulation of telomerase expression and telomere length. Implications for the ionizing radiation response and replicative senescence of human cells. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 277, p. 28609-28617, 2002.

RYU, S. Y.; PEIXOTO, P. M.; TEIJIDO, O.; DEJEAN, L. M.; KINNALLY, K. W. Role of mitochondrial ion channels in cell death. **Biofactors**, v. 36, n. 4, p. 255-263, 2010.

SAMBROOK, J. RUSSEL, D. W. Molecular Cloning. 3rd edition, v. 3, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 2001.

SAMSON-THIBAULT, F.; MADUGUNDU, G. S.; GAO, S.; CADET, J.; WAGNER, J. R. Profiling cytosine oxidation in DNA by LC-MS/MS. **Chemical Research in Toxicology**, v. 25, n. 9, p. 1902-1911, 2012.

SANCAR, A.; LINDSEY-BOLTZ, L. A.; UNSAL-KAÇMAZ, K.; LINN, S. Molecular mechanisms of mammalian DNA repair and the DNA damage checkpoints. **Annual Reviews in Biochemistry**, v. 73, p. 39-85, 2004.

SATOH, M. S.; LINDAHL, T. Role of poly(ADP-ribose) formation in DNA repair. **Nature**, v. 356, n. 6367, p. 356-358, 1992.

SCARPULLA, R. C. Transcriptional paradigms in mammalian mitochondrial biogenesis and function. **Physiological reviews**, v. 88, n. 2, p. 611-638, 2008.

SCHÄRER, O. D. Achieving broad substrate specificity in damage recognition by binding accessible nondamaged DNA. **Molecular Cell**, v. 28, n. 2, p. 184-186, 2007.

_____. Nucleotide excision repair in eukaryotes. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 5, n. 10, p. a012609, 2013.

SCHEIBYE-KNUDSEN, M.; RAMAMOORTHY, M.; SYKORA, P.; MAYNARD, S.; LIN, P.-C.; MINOR, R. K.; WILSON, D. M.; COOPER, M.; SPENCER, R.; DE CABO, R.; CROTEAU, D. L.; BOHR, V. A. Cockayne syndrome group B protein prevents the accumulation of damaged mitochondria by promoting mitochondrial autophagy. **The Journal of Experimental Medicine,** v. 209, n. 4, p. 855-869, 2012.

SCHEIBYE-KNUDSEN, M.; SCHEIBYE-ALSING, K.; CANUGOVI, C.; CROTEAU, D.L.; BOHR, V.A. A novel diagnostic tool reveals mitochondrial pathology in human diseases and aging. **Aging (Albany, N.Y.)**, v. 5, n. 3, p. 192-208, 2013.

SCHON, E. A.; DIMAURO, S.; HIRANO, M. Human mitochondrial DNA: roles of inherited and somatic mutations. **Nature Reviews. Genetics**, v. 13, n. 12, p. 878-890, 2012.

SCHWER, B.; NORTH, B. J.; FRYE, R. A.; OTT, M.; VERDIN, E. The human silent information regulator (Sir)2 homologue hSIRT3 is a mitochondrial nicotinamide adenine dinucleotide-dependent deacetylase. **The Journal of cell biology**, v. 158, n. 4, p. 647-657, 2002.

SELAK, M. A.; ARMOUR, S. M.; MACKENZIE, E. D.; BOULAHBEL, H.; WATSON, D. G.; MANSFIELD, K. D.; PAN, Y.; SIMON, M. C.; THOMPSON, C. B.; GOTTLIEB, E. Succinate links TCA cycle dysfunction to oncogenesis by inhibiting HIF-alpha prolyl hydroxylase. **Cancer Cell**, v. 7, n. 1, p. 77-85, 2005.

SELBY, C.P.; SANCAR, A. Cockayne syndrome group B protein enhances elongation by RNA polymerase II. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 94, p. 11205-11209, 1997.

SEOANE, M.; MOSQUERA-MIGUEL, A.; GONZALEZ, T.; FRAGA, M.; SALAS, A.; COSTOYA, J. A. The mitochondrial genome is a "genetic sanctuary" during the oncogenic process. **Public Library of Sciences One**, v. 6, n. 8, p. e23327, 2011.

SETLOW, R. B.; CARRIER, W. L. The disappearance of thymine dimers from DNA: an error-correcting mechanism. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 51, n. 2, p. 226-231, 1964.

SETLOW, R. B. Cyclobutane-type pyrimidine dimers in polynucleotides. **Science**, v. 153, n. 3734, p. 379-386, 1966.

SEVERINO, D.; JUNQUEIRA, H. C.; GUGLIOTTI, M.; GABRIELLI, D. S.; BAPTISTA, M. S. Influence of negatively charged interfaces on the ground and excited state properties of methylene blue. **Photochemistry and Photobiology**, v. 77, n. 5, p. 459-468, 2003.

SHARMA, N. K.; LEBEDEVA, M.; THOMAS, T.; KOVALENKO, O. A.; STUMPF, J. D.; SHADEL, G. S.; SANTOS, J. H. Intrinsic mitochondrial DNA repair defects in Ataxia Telangiectasia. **DNA Repair**, v. 13, p. 22-31, 2014.

SHIDARA, Y.; YAMAGATA, K.; KANAMORI, T.; NAKANO, K.; KWONG, J. Q.; MANFREDI, G.; ODA, H.; OHTA, S. Positive contribution of pathogenic mutations in the mitochondrial genome to the promotion of cancer by prevention from apoptosis. **Cancer Research**, v. 65, n. 5, p. 1655-1663, 2005.

SHIMA, A.; BAUGNET-MAHIEU, L.; GOUTIER, R. On the Increased Precursor Incorporation into the DNA of Rat Liver Mitochondria Irradiated *in vitro*. **Biophysik**, v. 252, n. 9, p. 243-252, 1973.

SHIMIZU, Y.; IWAI, S.; HANAOKA, F.; SUGASAWA, K. Xeroderma pigmentosum group C protein interacts physically and functionally with thymine DNA glycosylase. **The EMBO Journal**, v. 22, n. 1, p. 164-173, 2003.

SHIMIZU, Y.; UCHIMURA, Y.; DOHMAE, N.; SAITOH, H.; HANAOKA, F.; SUGASAWA, K. Stimulation of DNA Glycosylase Activities by XPC Protein Complex: Roles of Protein-Protein Interactions. **Journal of Nucleic Acids**, v. 2010, pii: 805698, p. 1-12, 2010.

SHIVJI, M. K.; PODUST, V. N.; HUBSCHER, U.; WOOD, R. D. Nucleotide excision repair DNA synthesis by DNA polymerase epsilon in the presence of PCNA, RFC, and RPA. **Biochemistry** v. 34, n. 15, p. 5011-5017, 1995.

SHUBSDA, M. F.; GOODISMAN, J.; DABROWIAK, J. C. Quantitation of ethidium-stained closed circular DNA in agarose gels. **Journal of Biochemical and Biophysical Methods**, v. 34, p. 73-79, 1997.

SINGHAL, R. K.; PRASAD, R.; WILSON, S. H. DNA polymerase beta conducts the gap-filling step in uracil-initiated base excision repair in a bovine testis nuclear extract. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 270, n. 2, 949-957, 1995.

STARKOV, A. A.; FISKUM, G.; CHINOPOULOS, C.; LORENZO, B. J.; BROWNE, S. E.; PATEL, M. S.; BEAL, M. F. Mitochondrial alpha-ketoglutarate dehydrogenase complex generates reactive oxygen species. **Journal of Neuroscience**, v. 24, p. 7779-7788, 2004.

STIERUM, R. H.; DIANOV, G. L.; BOHR, V. A. Single-nucleotide patch base excision repair of uracil in DNA by mitochondrial protein extracts. **Nucleic Acids Research**, v. 27, n. 18, p. 3712-3719, 1999.

SUGASAWA, K.; NG, J. M.; MASUTANI, C.; IWAI, S.; VAN DER SPEK, P. J.; EKER, A. P.; HANAOKA, F.; BOOTSMA, D.; HOEIJMAKERS, J. H. Xeroderma Pigmentosum Group C Protein Complex Is the Initiator of Global Genome Nucleotide Excision Repair. **Molecular Cell**, v. 2, n. 2, p. 223-232, 1998.

SUGASAWA, K.; AKAGI, J.; NISHI, R.; IWAI, S.; HANAOKA, F. Two-step recognition of DNA damage for mammalian nucleotide excision repair: Directional binding of the XPC complex and DNA strand scanning. **Molecular Cell**, v. 36, n. 4, p. 642-653, 2009.

SUGIMURA, T. Poly(adenosine diphosphate ribose). **Progress in nucleic acid research and molecular biology**, v. 13, p. 127-151, 1973.

SUGO, N.; ARATANI, Y.; NAGASHIMA, Y.; KUBOTA, Y.; KOYAMA, H. Neonatal lethality with abnormal neurogenesis in mice deficient in DNA polymerase beta. **The EMBO Journal**, v. 19, n. 6, p. 1397-1404, 2000.

TAHARA, E. B.; BARROS, M. H.; OLIVEIRA, G. A.; NETTO, L. E.; KOWALTOWSKI, A. J. Dihydrolipoyl dehydrogenase as a source of reactive oxygen species inhibited by caloric restriction and involved in *Saccharomyces cerevisiae* aging. **The FASEB Journal**, v. 21, p. 274-283, 2007.

TAKAO, M.; ABURATANI, H.; KOBAYASHI, K.; YASUI, A. Mitochondrial targeting of human DNA glycosylases for repair of oxidative DNA damage. **Nucleic Acids Research**, v. 26, p. 2917-2922, 1998.

TAKASHIMA, H.; BOERKOEL, C. F.; JOHN, J.; SAIFI, G. M.; SALIH, M. A.; ARMSTRONG, D.; MAO, Y.; QUIOCHO, F. A.; ROA, B. B.; NAKAGAWA, M.; STOCKTON, D. W.; LUPSKI, J. R. Mutation of TDP1, encoding a topoisomerase I-dependent DNA damage repair enzyme, in spinocerebellar ataxia with axonal neuropathy. **Nature Genetics**, v. 32, n. 2, p. 267-272, 2002.

TANG, J. Y.; HWANG, B. J.; FORD, J. M.; HANAWALT, P. C.; CHU, G. Xeroderma pigmentosum p48 gene enhances global genomic repair and suppresses UV-induced mutagenesis. **Molecular Cell**, v. 5, n. 4, p. 737-744, 2000.

TANTIN, D.; KANSAL, A.; CAREY, M. Recruitment of the putative transcription repair coupling factor CSB/ERCC6 to RNA polymerase II elongation complexes. **Molecular and Cellular Biology**, v. 17, p. 6803–6814, 1997.

TAYLOR, R. W.; TURNBULL, D. M. Mitochondrial DNA mutations in human disease. **Nature Reviews. Genetics**, v. 6, n. 5, p. 389-402, 2005.

TEBBS, R. S.; FLANNERY, M. L.; MENESES, J. J.; HARTMANN, A.; TUCKER, J. D.; THOMPSON, L. H.; CLEAVER, J. E.; PEDERSEN, R. A. Requirement for the Xrcc1 DNA base excision repair gene during early mouse development. **Developmental Biology**, v. 208, n. 2, p. 513-529, 1999.

TELL, G.; DAMANTE, G.; CALDWELL, D.; KELLEY, M. R. The intracellular localization of APE1/Ref-1: more than a passive phenomenon? **Antioxidants & redox signaling**, v. 7, n. 3-4, p. 367-384, 2005.

TONOLLI, P. N. **O papel do fator de transcrição mitocondrial A (TFAM) na proteção do DNA mitocondrial contra lesões oxidadas**. 2013. 70 f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) – Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

TRETTER, L.; ADAM-VIZI, V. Generation of reactive oxygen species in the reaction catalyzed by alpha-ketoglutarate dehydrogenase. **Journal of Neuroscience**, v. 24, p. 7771-7778, 2004.

TROUNCE, I.; NEILL, S.; WALLACE, D. C. Cytoplasmic transfer of the mtDNA nt 8993 T→G (ATP6) point mutation associated with Leigh syndrome into mtDNAless cells demonstrates cosegregation with a decrease in state III respiration and ADP/O ratio. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 91, p. 8334-8338, 1994.

TRUMPOWER, B. L. Cytochrome bc1 complexes of microorganisms. **Microbiology Reviews**, v. 54, n. 2, p. 101–129, 1990.

TURRENS, J. F.; BOVERIS, A. Generation of superoxide anion by the NADH dehydrogenase of bovine heart mitochondria. **The Biochemical Journal**, v. 191, p. 421-427, 1980.

TURRENS, J. F. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. **Journal of Physiology**, v. 552, (Pt 2), p. 335-344, 2003.

UCHIDA, A.; SUGASAWA, K.; MASUTANI, C.; DOHMAE, N.; ARAKI, M.; YOKOI, M.; OHKUMA, Y.; HANAOKA, F. The carboxy-terminal domain of the XPC protein plays a crucial role in nucleotide excision repair through interactions with transcription factor IIH. **DNA Repair**, v. 1, n. 6, p. 449-461, 2002.

VALENTIN-VEGA, Y. A.; KASTAN, M. B. A new role for ATM: regulating mitochondrial function and mitophagy. **Autophagy**, v. 8, n. 5, 840-841, 2012.

VAN DEN BOOM, V.; CITTERIO, E.; HOOGSTRATEN, D.; ZOTTER, A.; EGLY, J.-M.; VAN CAPPELLEN, W. A.; HOEIJMAKERS, J. H. J.; HOUTSMULLER, A. B.; VERMEULEN, W. DNA damage stabilizes interaction of CSB with the transcription elongation machinery. **The Journal of Cell Biology**, v. 166, n. 1, p. 27-36, 2004.

VAN GOOL, A. J.; CITTERIO, E.; RADEMAKERS, S.; VAN OS, R.; VERMEULEN, W.; CONSTANTINOU, A.; EGLY, J. M.; BOOTSMA, D.; HOEIJMAKERS, J.H., The Cockayne syndrome B protein, involved in transcription-coupled DNA repair, resides in an RNA polymerase II-containing complex. **The EMBO Journal**, v. 16, p. 5955-5965, 1997.

VAN LOON, B.; SAMSON, L. D. Alkyladenine DNA glycosylase (AAG) localizes to mitochondria and interacts with mitochondrial single-stranded binding protein (mtSSB). **DNA Repair**, v. 12, n. 3, p. 177-187, 2013.

VENEMA J.; VAN HOFFEN, A.; KARCAGI, V.; NATARAJAN, A. T.; VAN ZEELAND, A. A.; MULLENDERS, L. H. Xeroderma pigmentosum complementation group C cells remove pyrimidine dimers selectively from the transcribed strand of active genes. **Molecular and Cellular Biology**, v. 11, n. 8, p. 4128-4133, 1991.

VINOTHKUMAR, K. R.; ZHU, J.; HIRST, J. Architecture of mammalian respiratory complex I. **Nature**, v. 515, p. 80-84, 2014.

VIVES-BAUZA, C.; ZHOU, C.; HUANG, Y.; CUI, M.; DE VRIES, R. L.; KIM, J.; MAY, J.; TOCILESCU, M. A.; LIU, W.; KO, H. S.; MAGRANÉ, J.; MOORE, D. J.; DAWSON, V. L.; GRAILHE, R.; DAWSON, T. M.; LI, C.; TIEU, K.; PRZEDBORSKI, S. PINK1-dependent recruitment of Parkin to mitochondria in mitophagy. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 107, n. 1, p. 378-383, 2010.

VOLKER, M.; MONE, M. J.; KARMAKAR, P.; VAN HOFFEN, A.; SCHUL, W.; VERMEULEN, W., HOEIJMAKERS, J. H. J.; VAN DRIEL, R.; VAN ZEELAND, A. A.; MULLENDERS, L. H. F. Sequential Assembly of the Nucleotide Excision Repair Factors *In vivo*, **Molecular Cell**, v. 8, p. 213-224, 2001.

VON SONNTAG, C. The Chemical Basis of Radiation Biology. Taylor & Francis, 1987.

VUILLAUME, M., CALVAYRAC, R., BEST-BELPOMME, M., TARROUX, P., HUBERT, M., DECROIX, Y., SARASIN, A. Deficiency in the Catatase Activity of Xeroderma Pigmentosum Cell and Simian Virus 40-transformed Human Cell Extracts1. **Cancer Research**, v. 46, n. 2, p. 538-544, 1986

WANAGAT, J.; AHMADIEH, N.; BIELAS, J. H.; ERICSON, N. G.; VAN REMMEN, H. Skeletal muscle mitochondrial DNA deletions are not increased in CuZn-superoxide dismutase deficient mice. **Experimental Gerontology**, v. 61, p. 15-19, 2015.

WAKASUGI, M.; REARDON, J. T.; SANCAR, A. The non-catalytic function of XPG protein during dual incision in human nucleotide excision repair. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 272, n. 25, p. 16030-16034, 1997.

WAKASUGI, M.; SANCAR, A. Assembly, subunit composition, and footprint of human DNA repair excision nuclease. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 95, n. 12, p. 6669-6674, 1998.

_____. Order of assembly of human DNA repair excision nuclease. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 274, n. 26, p. 18759-18768, 1999.

WAKASUGI, M.; SHIMIZU, M.; MORIOKA, H.; LINN, S.; NIKAIDO, O.; MATSUNAGA, T. Damaged DNA-binding protein DDB stimulates the excision of cyclobutane pyrimidine dimers *in vitro* in concert with XPA and replication protein A. **The Journal Biology Chemistry**, v. 276, n. 18, p. 15434-15440, 2001.

WALLACE, D. C. Mitochondrial genetics: a paradigm for aging and degenerative diseases? Science, v. 256, n. 5057, p. 628-632, 1992.

WANAGAT, J.; AHMADIEH, N.; BIELAS, J. H.; ERICSON, N. G.; VAN REMMEN, H. Skeletal muscle mitochondrial DNA deletions are not increased in CuZn-superoxide dismutase deficient mice. **Experimental Gerontology**, v. 61, p. 15-19, 2015.

WEISSMAN, L.; DE SOUZA-PINTO, N. C.; STEVNSNER, T.; BOHR, V. A. DNA repair, mitochondria, and neurodegeneration. **Neuroscience**, v. 145, n. 4, p. 1318-1329, 2007.

WIEBAUER, K.; JIRICNY, J. Mismatch-specific thymine DNA glycosylase and DNA polymerase beta mediate the correction of G.T mispairs in nuclear extracts from human cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 87, n. 15, p. 5842-5845, 1990.

WOO, D. K.; GREEN, P. D.; SANTOS, J. H.; D'SOUZA, A. D.; WALTHER, Z.; MARTIN, W. D.; CHRISTIAN, B. E.; CHANDEL, N. S.; SHADEL, G. S. Mitochondrial genome instability and ROS enhance intestinal tumorigenesis in APC(Min/+) mice. **American Journal of Pathology**, v. 180, n. 1, p. 24-31, 2012.

WU, H.; ZHANG, Y. Reversing DNA methylation: mechanisms, genomics, and biological functions. **Cell**, v. 156, n. 1-2, 45-68, 2014.

XANTHOUDAKIS, S.; SMEYNE, R. J.; WALLACE, J. D.; CURRAN, T. The redox/DNA repair protein, Ref-1, is essential for early embryonic development in mice. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 93, n. 17, p. 8919-23, 1996.

XIA, D.; YU, C.; KIM, H.; XIA, J.; KACHURIN, A. M.; ZHANG, L.; YU, L.; DEISENHOFER, J. Crystal Structure of the Cytochrome bc 1 Complex from Bovine Heart Mitochondria. **Science**, v. 277, p. 60-66, 1997.

XIE, Y.; YANG, H.; CUNANAN, C.; OKAMOTO, K.; SHIBATA, D.; PAN, J.; BARNES, D. E.; LINDAHL, T.; MCILHATTON, M.; FISHEL, R.; MILLER, J. H. Deficiencies in mouse *Myh* and *Ogg1* result in tumor predisposition and G to T mutations in codon 12 of the K-ras oncogene in lung tumors. **Cancer Research**, v. 64, n. 9, p. 3096-3102, 2004.

YANKOVSKAYA, V.; HORSEFIELD, R.; TÖRNROTH, S.; LUNA-CHAVEZ, C.; MIYOSHI, H.; LÉGER, C.; BYRNE, B.; CECCHINI, G.; IWATA, S. Architecture of succinate dehydrogenase and reactive oxygen species generation. **Science**, v. 299, n. 5607, p. 700-704, 2003.

YOU, C.; DAI, X.; YUAN, B.; WANG, J.; WANG, J.; BROOKS, P. J.; NIEDERNHOFER, L. J.; WANG, Y. A quantitative assay for assessing the effects of DNA lesions on transcription. **Nature Chemical Biology**, v. 8, n. 10, 817-822, 2012.

YOU, C.; SWANSON, A. L.; DAI, X.; YUAN, B.; WANG, J.; WANG, Y. Translesion synthesis of 8,5′-cyclopurine-2'-deoxynucleosides by DNA polymerases η, ι, and ζ. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 288, n. 40, 28548-28556, 2013.

YOULE, R. J.; NARENDRA, D. P. Mechanisms of mitophagy. **Nature Reviews. Molecular Cell Biology**, v. 12, n. 1, p. 9-14, 2011.

YU, C. A.; NAGAOKA, S.; YU, L.; KING, T. E. Evidence for the existence of a ubiquinone protein and its radical in the cytochromes b and c1 region in the mitochondrial electron transport chain. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 82, n. 4, p.1070-1078, 1978.

ZANG, L. Y.; MISRA, H. P. Generation of reactive oxygen species during the monoamine oxidase-catalyzed oxidation of the neurotoxicant, 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-

tetrahydropyridine. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 268, n. 22, p. 16504-16512, 1993.

ZHANG, S.; VILLALTA, P. W.; WANG, M.; HECHT, S. S. Analysis of crotonaldehyde- and acetaldehyde-derived 1, N(2)-propanodeoxyguanosine adducts in DNA from human tissues using liquid chromatography electrospray ionization tandem mass spectrometry. **Chemical Research in Toxicology**, v. 19, p. 1386-1392, 2006.

_____. Detection and quantitation of acrolein-derived 1,N2-propanodeoxyguanosine adducts in human lung by liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry. **Chemical Research in Toxicology**, v. 20, p. 565-571, 2007.

ZHARKOV, D. O. Base excision DNA repair. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 65, n. 10, p. 1544-1565, 2008.

ZHOU, M.; DIWU, Z.; PANCHUK-VOLOSHINA, N.; HAUGLAND R. P. A stable nonfluorescent derivative of resorufin for the fluorometric determination of trace hydrogen peroxide: applications in detecting the activity of phagocyte NADPH oxidase and other oxidases. **Analytical biochemistry**, v. 253, n. 2, p. 162-168, 1997.

ZIELONKA, J.; VASQUEZ-VIVAR, J.; KALYANARAMAN, B. Detection of 2-hydroxyethidium in cellular systems: a unique marker product of superoxide and hydroethidine. **Nature protocols**, v. 3, n. 1, p. 8-21, 2008.

APÊNDICES

Mitochondrion 17 (2014) 164–181

Contents lists available at ScienceDirect

Mitochondrion

journal homepage: www.elsevier.com/locate/mito

Review

Formation and repair of oxidative damage in the mitochondrial DNA

Meltem Muftuoglu [a], Mateus P. Mori [b], Nadja C. de Souza-Pinto [b,*]

[a] Department of Molecular Biology and Genetics, Acibadem University, Atasehir, 34752 Istanbul, Turkey
[b] Depto. de Bioquímica, Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, 05508-000 Brazil

ARTICLE INFO

Article history:
Received 10 April 2013
Received in revised form 18 March 2014
Accepted 18 March 2014
Available online 3 April 2014

Keywords:
Mitochondrial DNA
DNA repair
BER
Aging
Oxidative stress

ABSTRACT

The mitochondrial DNA (mtDNA) encodes for only 13 polypeptides, components of 4 of the 5 oxidative phosphorylation complexes. But despite this apparently small numeric contribution, all 13 subunits are essential for the proper functioning of the oxidative phosphorylation circuit. Thus, accumulation of lesions, mutations and deletions/insertions in the mtDNA could have severe functional consequences, including mitochondrial diseases, aging and age-related diseases. The DNA is a chemically unstable molecule, which can be easily oxidized, alkylated, deaminated and suffer other types of chemical modifications, throughout evolution the organisms that survived were those who developed efficient DNA repair processes. In the last two decades, it has become clear that mitochondria have DNA repair pathways, which operate, at least for some types of lesions, as efficiently as the nuclear DNA repair pathways. The mtDNA is localized in a particularly oxidizing environment, making it prone to accumulate oxidatively generated DNA modifications (ODMs). In this article, we: i) review the major types of ODMs formed in mtDNA and the known repair pathways that remove them; ii) discuss the possible involvement of other repair pathways, just recently characterized in mitochondria, in the repair of these modifications; and iii) address the role of DNA repair in mitochondrial function and a possible cross-talk with other pathways that may potentially participate in mitochondrial genomic stability, such as mitochondrial dynamics and nuclear-mitochondrial signaling. Oxidative stress and ODMs have been increasingly implicated in disease and aging, and thus we discuss how variations in DNA repair efficiency may contribute to the etiology of such conditions or even modulate their clinical outcomes.

© 2014 Elsevier B.V. and Mitochondria Research Society. All rights reserved.

Contents

1. Introduction . . . 165
2. Oxidatively generated DNA modifications (ODMs) . . . 165
   2.1. Damage to the sugar moiety . . . 166
   2.2. Damage to the DNA nucleobase . . . 167
      2.2.1 ODMs on pyrimidines . . . 167
      2.2.2 ODMs on purines . . . 167
   2.3. Indirect ODMs . . . 168
3. ODMs in mitochondria in normal and pathological conditions . . . 169
4. DNA repair pathways for ODMs in mitochondria . . . 169
   4.1. Mitochondrial base excision repair . . . 170
   4.1.1. Mitochondrial SP-BER . . . 171
      A. Recognition and incision by DNA glycosylases . . . 171
      B. AP-site processing . . . 172
      C. DNA synthesis . . . 172
      D. Ligation . . . 172
      4.1.2 Mitochondrial LP-BER . . . 172
      4.1.3 Mitochondrial single strand break repair . . . 173
   4.2. Organization of mtDNA BER . . . 173

* Corresponding author at: Av. Prof. Lineu Prestes, 748, Bloco 10S, sala 1065, Cidade Universitária, São Paulo, SP 05508-000, Brazil. Tel.: +55 11 3091 1387.
E-mail address: nadja@iq.usp.br (N.C. Souza-Pinto).

http://dx.doi.org/10.1016/j.mito.2014.03.007
1567-7249/© 2014 Elsevier B.V. and Mitochondria Research Society. All rights reserved.

5. MtDNA repair and mitochondrial genomic stability . . . 173
6. Mechanism of formation of mtDNA deletions . . . 175
7. Perspectives for mtDNA repair in health and disease . . . 176
Acknowledgments . . . 177
Appendix A. Supplementary data . . . 177
References . . . 177

1. Introduction

All eukaryotic cells have, or had in some point in their evolutionary history, mitochondria, which evolved from α-proteobacteria (Andersson and Kurland, 1999). These organelles are essential in cellular homeostasis, as they have many and diverse functions. Besides playing a central role in energy metabolism, they control cell fate after stress through their role in apoptosis and necrosis; are important sites of reactive oxygen species (ROS) generation (Kowaltowski et al., 2009); participate in intracellular signaling; and even in immune response (West et al., 2011). But most remarkably, after close to 2 billion years of symbiosis and reductionist selective pressure, they still conserve a vestigial genome, reminiscent of the genome from their free-living ancestor (Gray et al., 2001; Lang et al., 1997). Indeed, many authors favor the idea that the emergence of eukaryotes was only possible by the establishment of an efficient energy-converting organelle, such as the mitochondrion (Vellai et al., 1998).

The mitochondrial DNA (mtDNA) of most organisms is a circular molecule, ranging in size from a few hundred kilobases (kb) in some plants (Kubo and Newton, 2008) to only 16.5 kb in humans (Anderson et al., 1981). The human mtDNA encodes 13 polypeptides, 22 tRNAs and 2 rRNAs, and has only around 600 non-coding nucleotides (www.mitomap.org) (Anderson et al., 1981; Andrews et al., 1999), which make its gene density extremely high. Moreover, the two strands of the mtDNA (H and L, for heavy and light, due to a bias in guanine content) are transcribed polycistronically, primarily from a single promoter each (P_H and P_L, respectively) (Bonawitz et al., 2006). A consequence of these features is that accumulation of lesions in the mtDNA can easily impact gene expression, either due to aborted transcription at blocking DNA lesions or because the chance that modification will hit a coding nucleotide is quite high. In this review, we will present experimental evidence that both events take place in conditions of oxidative stress and may contribute to mitochondrial and cellular dysfunction, and, consequently to the emergence of diseases.

The mitochondrial proteome is estimated to range from 800 to around 1200 distinct proteins (Basu et al., 2006). From these, only a few are encoded in the mtDNA. In mammals, the 13 polypeptides transcribed from the mtDNA are ND-1, -2, -3, -4, -4L, -5, and -6 of complex I; cytochrome b of complex III; COI, II and III of complex IV; and ATP6 and ATP8 of complex V.

The mtDNA is organized in a nucleoprotein complex known as the mitochondrial nucleoid, which is covalently associated with the inner side of the inner mitochondrial membrane. Proteomic analysis from yeast and mammalian nucleoids revealed that the nucleoid is composed of DNA binding proteins such as the single-strand binding protein (mtSSB) and the mitochondrial transcription factor A (TFAM); proteins involved in mtDNA maintenance, such as the DNA polymerase gamma and helicases (twinkle and SUV2, in human mitochondria (Wang and Bogenhagen, 2006)), but also proteins involved in energy metabolism, such as aconitase (in yeast mitochondria (Chen et al., 2005b)), adenine nucleotide translocator 1, the lipoyl-containing E2 subunits of pyruvate dehydrogenase and branched chain alpha-keto acid dehydrogenase (in *Xenopus* mitochondria (Bogenhagen et al., 2003)). This association of the mtDNA was postulated to function as a sensor, linking mtDNA maintenance and the metabolic state of the cell (Chen et al., 2005b). In such organization, the mtDNA appears to be tightly bound by proteins. TFAM was originally described as an mtDNA transcription factor, but it has a prominent structural role in mtDNA packing. Co-immunoprecipitation experiments with human placental mtDNA indicated that most mtDNA is bound to TFAM (Alam et al., 2003), and TFAM alone can promote mtDNA packing into a nucleoid-like structure (Kaufman et al., 2007). Recently, two groups have shown that TFAM binding induces as dramatic U-turn like bending in the mtDNA, although the functional importance of this effect seems to be specific to promoter activation and recruitment of transcription machinery (Ngo et al., 2011; Rubio-Cosials et al., 2011). This feature, however, may have important implications for mtDNA damage and repair, as TFAM binding could limit the access to genotoxic agents and intermediates, but also to DNA repair proteins. We have recently showed that TFAM binding to an oligonucleotide containing a DNA lesion inhibits DNA repair activities on the substrate, and that removing the bound TFAM from the substrate alleviates the inhibition (Canugovi et al., 2010).

Recent results indicate that each nucleoid contains only one mtDNA molecule (Kukat et al., 2011), but each mitochondrion often has more than one nucleoid. During mitochondrial network remodeling, through fusion and fission, the intra-mitochondrial contents from the fusing organelles are mixed, including their nucleoids. Although individual nucleoids do not appear to exchange mtDNA molecules between them, heterologous nucleoids can provide functional complementation via the free diffusion of transcripts through the mitochondrial matrix (Gilkerson et al., 2008). Moreover, nucleoids are mobile, and cell fusion experiments demonstrated that they can repopulate mitochondria without mitochondrial DNA (ρ^0) (Legros et al., 2004). These results suggest a scenario in which nucleoid dynamics, especially during mitochondrial fusion/fission events, can play an important role in the bioenergetic capacity of the mitochondria and in cellular function (Gilkerson, 2009). Considering that several nucleoid proteins, such as TFAM and aconitase, have been shown to impact on mtDNA damage accumulation (Chen et al., 2007), it is now becoming important to further dissect the relationship between nucleoid structure/dynamics and mtDNA damage accumulation/repair.

The mitochondrial electron transport chain (ETC) can be a significant source of superoxide anion radical ($O_2^{\bullet -}$), which is swiftly dismutated in the matrix into hydrogen peroxide by Mn-superoxide dismutase (MnSOD) (Kowaltowski et al., 2009). Thus, it has long been believed that the mitochondrial matrix is a more oxidizing environment than other subcellular compartments. In fact, recent data using a redox-sensitive yellow fluorescent protein specifically targeted to different cellular compartments has shown that the mitochondrial matrix has a GSH/GSSG ratio over 2 times lower than that of the cytosol, due to higher levels of ROS in the matrix versus cytosol (Hu et al., 2008). As the mtDNA sits in this environment, it becomes a prime target to oxidation by ROS. Moreover, because of the charge difference between the matrix and the surrounding area (the matrix is more negative due to proton pumping by the ETC) positively charged lipophilic compounds tend to accumulate inside mitochondria, and this increased local concentration could favor their reactivity with the mtDNA.

2. Oxidatively generated DNA modifications (ODMs)

Despite the almost intuitive notion that the DNA is a relatively stable biomolecule, both in vitro and in vivo data show that the

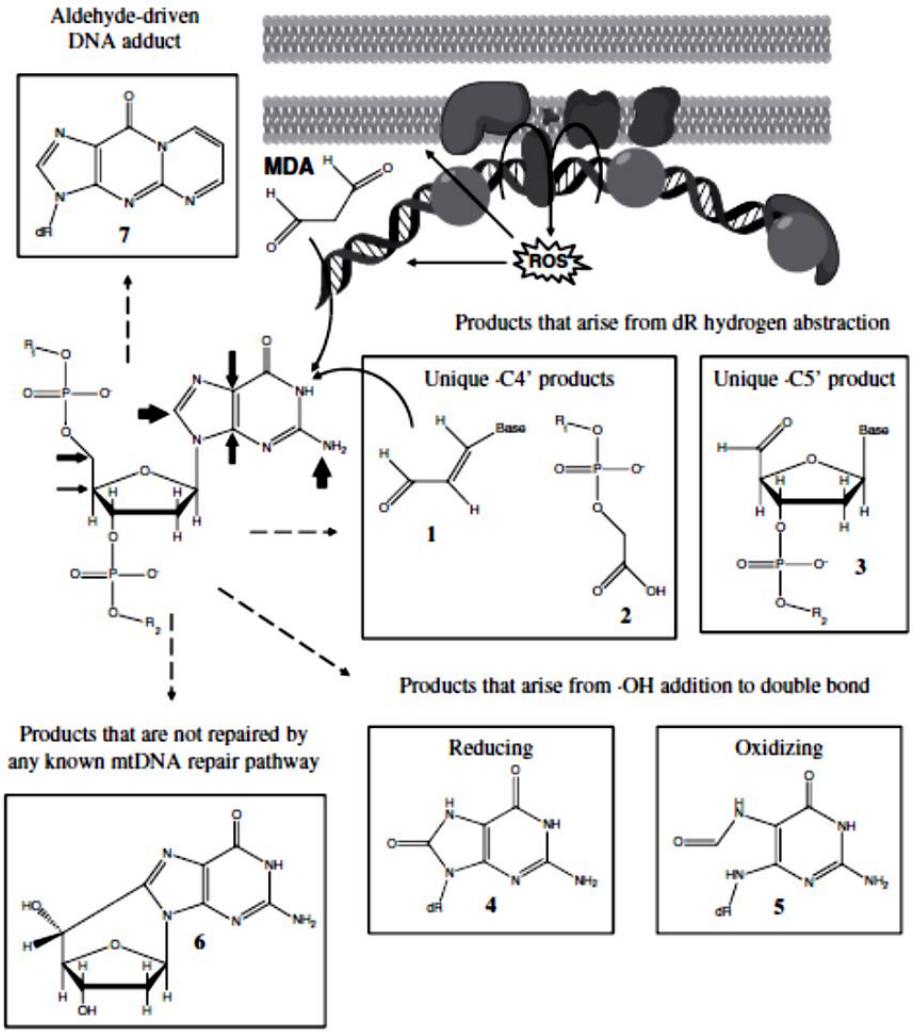


Fig. 1. Chemical diversity of oxidatively generated DNA modifications (ODMs). •OH is the only ROS that reacts with DNA, readily adding to nucleobases double bonds and abstracting hydrogen less efficiently. Filled arrows indicate site, and thickness the probability of •OH attack. 1) base propenal, 2) 3′-phosphoglycolate and 3) 5′-aldehyde represent unique products that arise from H abstraction from the 2-deoxyribose moiety, which most often lead to DNA strand incision. 4) 8-oxo-7,8-dihydroguanine (8-oxoGua) and 5) 2,6-diamino-4-hydroxy-5-formamidopyrimidine (FapyGua) represent two guanine oxidation products; both of them arise from •OH addition at C8, while the redox conditions determine which pathway the intermediate will follow. 6) (5′R)-8,5′-cyclo-2′-deoxyguanosine (cdGuo) represents a product from •C5′ radical addition to C8 double bond of guanine; to date, no mtDNA repair pathway for this lesion has been identified. 7) pyrimido[1,2α]purine-10(3H)one (M1G) represents an indirect ODM product originated from MDA or base propenal. Although M1G is considered a bulky adduct it was found to be repaired by AAG-initiated BER.

DNA is subjected to several kinds of chemical modifications including spontaneous deamination and base loss, non-enzymatic alkylation and enzymatic methylation, adduct formation with aromatic molecules, intra- and inter-strand cross links, protein–DNA adduct formation, and oxidation (De and Van, 2004; Lindahl, 1993). Among those, oxidatively generated DNA modifications (ODMs) are one of the most common and diverse types of modifications, with over 100 different modifications already identified in vitro. Thus, the purpose of this section is to discuss ODMs that are relevant to living organisms amidst the plethora of ODMs identified and theoretically predicted. Fig. 1 depicts a schematic representation of the most common types of ODMs which will be further discussed here.

2.1. Damage to the sugar moiety

In the DNA, of the three major ROS detected in biological systems [$O_2^{\bullet-}$, hydrogen peroxide (H_2O_2) and hydroxyl radical (•OH)], only the highly reactive •OH is able to attack the 2′-deoxyribose (dR) residue (Cadet et al., 2010a). Indeed, the sugar moiety does not represent a major target for radical attack. Nonetheless, due to the sugar-phosphate backbone exposure to the solvent in double-stranded DNA (dsDNA), early experiments suggest that •OH reaction with the sugar, via hydrogen abstraction, accounts for 20% of all damage to the dsDNA molecule (Breen and Murphy, 1995; Scholes et al., 1969; von Sonntag, 1987). This is a high proportion considering that hydrogen abstraction occurs approximately one order of magnitude less efficiently than

addition to double bond ($k = 10^9\ M^{-1}\ s^{-1}$ vs $k \geq 10^{10}\ M^{-1}\ s^{-1}$) during •OH attack (Pryor, 1988). Nonetheless, because the nucleobases in the double helix are sterically hindered, the probability of addition to their double bonds decreases, reflecting the increased proportion of sugar attack (Masuda et al., 1980).

From all five carbons of dR, C4′ is by far the most studied, hence the notion that it is the main target to radical attack (Breen and Murphy, 1995). Indeed, some authors argue that because early studies relied on the use of the radiomimetic drug bleomycin and metal complexes, these could lead to a biased analysis and conclusions (Aydogan et al., 2002; Balasubramanian et al., 1998). However, all five articles mentioned in a review by Breen and Murphy (1995) studied products formed upon γ-irradiation of DNA (Beesk et al., 1979; Dizdaroglu et al., 1975a,b; Henner et al., 1983b; Janicek et al., 1985), while Balasubramanian et al. (1998) relied on the widely used Fenton reaction system for •OH foot printing, which employs $[Fe(EDTA)^{-2}]/H_2O_2$/ascorbate (Udenfriend et al., 1954). What is now generally accepted is that hydrogen abstraction probability correlates with its accessibility to solvent in B-DNA conformation (Aydogan et al., 2002; Balasubramanian et al., 1998; Miller et al., 1994; Sy et al., 1997). Irrespectively to which carbon of the dR is more often attacked, a common feature to all five •OH-initiated carbon-centered sugar radicals is that almost every molecular rearrangement pathway leads to a strand break (Breen and Murphy, 1995; Pogozelski and Tullius, 1998), with exception of the C1′ hydrogen atom abstraction giving rise to 2-deoxyribonolactone and the C2′ aerobic pathway that gives rise to erythrose (Sugiyama et al., 1993).

The opening of the sugar-phosphate backbone can give rise to different types of non-canonical DNA ends, such as 3′-phosphate termini, 3′-phosphoglycolate and 5′-2-deoxyribose-phosphate (dRP) (Breen and Murphy, 1995). These 3′ and 5′ ends are refractory to DNA polymerase and ligase activities and have to be metabolized by DNA repair pathways for correct processing of the breaks, as will be discussed in Section 4.

Under anaerobic conditions, C5′ centered sugar radicals can add to the C8 double bound of its own purine, giving rise to purine 8,5′-cyclo-2′-deoxyribonucleosides (8,5′-cdP) (Keck, 1968; Raleigh et al., 1976). Because radical attack is randomly driven, the •C5′ addition to the C8 gives rise to both 5′*S* and 5′*R*-diasteromers forms in DNA (Dizdaroglu, 1986). Indeed, (5′-*R*)-8,5′-cyclodeoxyguanosine and (5′-*S*)-8,5′-cyclodeoxyguanosine were detected in γ-irradiated human cells (Dizdaroglu et al., 1987). The formation of 8,5′-cdP is strongly inhibited under aerobic conditions because O_2 reacts at diffusion rate with the •C5′, generating a C5′-peroxyl radical (Dizdaroglu et al., 1975a, 1977; Isildar et al., 1981). Inside the mitochondria, because O_2 is promptly available the formation of the C′5-peroxyl radical would compete with the C8 attack, what could be interpreted as a defense system to the mitochondrial genome. 8,5′-cdP has been detected in genomic DNA from cells in culture exposed to oxidants and in several mouse tissues (Jaruga et al., 2010; Kirkali et al., 2009); however, thus far, they have not been detected in mtDNA. Due to the extra covalent bond between the base and the sugar, these lesions are repaired by the nucleotide excision repair (NER) pathway (Brooks et al., 2000), which has not been found in mitochondria to date (Weissman et al., 2007). Thus, one can speculate that accumulation of these lesions could have severe impact for mtDNA stability.

2.2. Damage to the DNA nucleobase

Considering the extremely high reaction rate constant of •OH towards π-bonds, it is not unexpected that addition to DNA bases provides the major contribution to ODMs. For pyrimidines, C5 and C6 represent the main targets, while C4, C5 and C8 suffer the majority of •OH addition in purines; both of them at rate constants comparable to the diffusion controlled rate ($k = 3–10 \times 10^9\ M^{-1}\ s^{-1}$) (von Sonntag, 1987). Giving the plethora of oxidatively generated DNA base modifications, we will focus on those identified in cellular DNA (Cadet et al., 2010a), emphasizing those found in mtDNA.

2.2.1. ODMs on pyrimidines

In pyrimidines, •OH preferentially adds to C5 rather than to C6, mainly because it stands as the carbon with the highest electron density (Pryor, 1988; von Sonntag, 1987). In thymine, under anaerobic conditions, C5-OH-C6-yl radical is oxidized at C6 and an hydroxyl anion (OH^-) is added to the resulting C5-OH-C6 + cation, generating four *cis* and *trans* diastereomers of 5,6-dihydroxy-5,6-dihydrothymine or thymine glycol (ThyGly). Likewise, C5-OH-C6-yl radical from cytosine also undergoes oxidation and addition to yield cytosine glycol (CytGly) (Breen and Murphy, 1995). ThyGly is a relative stable product, and has been detect in DNA in vivo (Evans et al., 2004), cytosine glycol is quite labile, deaminating to uracil glycol (UraGly) (Ekert, 1962), which may undergo dehydration yielding 5-hydroxyuracil (5-OHUra). Alternatively, CytGly may dehydrate prior to deamination, generating 5-hydroxycytosine (5-OHCyt), which is more resistant to deamination (Ekert, 1962). Under aerobic conditions, O_2 add to C6 centered radicals to yield C5-OH-C6 peroxyl radicals, which can be reduced to their related hydroperoxides (Wagner, 1994; Wagner et al., 1994). Both 6-hydroperoxy-5-hydroxy-5,6-dihydrothymine (5-OH-6-OOH) and 6-hydroperoxy-5-hydroxy-5,6-dihydrocytosine dehydrate to give labile intermediates. The cytosine-derived hydroperoxide dehydrated giving rise to the 5-hydroxy-6-oxo-cytosine intermediate that deaminates to 5,6-dihydroxyuracil (5-diOH-Ura). If not reduced, C5-OH-C6 peroxyl radicals eliminate $O_2^{\bullet -}$ followed by trapping of a water molecule to give ThyGly and CytGly (the former deaminate to UraGly) (Teoule, 1987; von Sonntag, 1987).

On the other hand, the minor C6-OH-C5-yl pyrimidine radicals have distinct redox properties, been reduced and protonated to give 6-hydroxy-5,6-dihydrothymine or 6-hydroxy-5,6-dihydrocytosine—the latter having been dehydrated back to cytosine (Breen and Murphy, 1995). Unlike C6-centered radicals (which is reducing, hence, itself is oxidized), the aerobic pathway of ODMs arising from 6-OH-5-yl pyrimidine radicals can be interpreted as a straightforward one-way road. Both pyrimidine C6-OH-C5 peroxyl radicals are reduced to their equivalent hydroperoxides, although cytosine hydroperoxides are likely to have extremely low half-life (Wagner and Cadet, 2010). Most likely, 5-hydroperoxy-6-hydroxy-5,6-dihydrothymine (5-OOH-6-OH) and 5-hydroperoxy-6-hydroxy-5,6-dihydrocytosine interconvert to aldehyde at C6, via open-chain tautomer (5-OOH-6-oxo-cytosine further deaminates to give 5-OOH-6-oxo-uracil). The hydroperoxide aldehydes formed decompose via α-cleavage of the C5–C6 (Sawaki and Ogata, 1977) and the C5-ketal derivative regenerate ring-closed form, namely, 5-hydroxy-5-methylhydantoin (5-OH-5-meHyd) and 5-hydroxyhydantoin (5-OHHyd).

In thymine, besides addition to C5 or C6, •OH is able to abstract hydrogen from the C5 methyl group, giving rise to 5-methyleneuracil radical (with an allyl radical group). The major product formed from the allyl radical under anaerobic and aerobic conditions is 5-(uracilyl) methyl radical (5-HmUra). Under oxygenated conditions, O_2 rapidly adds to the allyl radical and the resulting peroxyl radical formed is reduced to give 5-(hydroperoxymethyl)uracil (5-HpmUra). It has been suggested that 5-HpmUra may generate singlet oxygen ($^1O_2$) in the presence of redox-active compounds found in biological systems, such as HOCl and Fe^{2+} and Cu^{2+} ions (Prado et al., 2009). If that occurs in vivo is still matter of debate. This is of special interest concerning the reactivity of $^1O_2$ towards guanine (Gua) (described in detail below).

2.2.2. ODMs on purines

Purines (particularly guanine) are the most electron-rich components within the basic DNA components (Steenken, 1989). Not unexpectedly, they present the highest reactivity toward •OH and can react with $^1O_2$ (Steenken and Jovanovic, 1997). Surprisingly though, there are only two

major products that arise from each purine radical and other two minor products. Notwithstanding having three carbon atoms to add at, C8 addition is the main intermediate to ODMs derived from purine. Differently than observed in pyrimidines, the C8-OH intermediate radical exhibits redox ambivalence (Steenken et al., 2001): i) the initial C8-OH-N7-yl radical may be reduced (due to its electrophilicity) by intracellular thiols, i.e. gain an electron and a proton or; ii) can rearrange to C8-OH-C4-yl, being oxidized (due to its nucleophilicity), i.e. losing an electron and a proton. Both guanine and adenine C8-OH-N7-yl radical lead to formamidopyrimidines through reduction followed by ring opening, or the reverse, to yield 2,6-diamino-4-hydroxy-5-formamidopyrimidine (FapyGua) and 4,6-diamino-5-formamidopyrimidine (FapyAde), respectively. In turn, C8-OH-C4-yl radical oxidation may proceed anaerobically (by electron and proton loss) or aerobically through addition of O_2 generating C8-OH-C4 peroxyl radical, to give 8-oxo-7,8-dihydroguanine (8-oxoGua) and 8-oxo-7,8-dihydroadenine (8-oxoAde).

Although C4–C5 double-bond was once thought to be the major site of •OH addition, which would go dehydration to yield C5-centered guanine radical (•C5-Gua) (Candeias and Steenken, 2000), Chatgilialoglu and co-workers demonstrated that, at least in nucleoside, hydrogen abstraction of 2-amino group of guanine accounts for 65% of •OH attack, which then goes tautomerization giving rise to •C5-Gua (Chatgilialoglu et al., 2009). If not reduced by endogenous thiols regenerating canonical Gua, •C5-Gua can add O_2^- ($k = 4.7 \times 10^8$ $M^{-1}s^{-1}$ in DNA duplex), then reduce to its related 5-hydroperoxy-4,5-dihydroguanine (5-OOHGua). Afterwards, 5-OOHGua undergoes a series of rearrangement originating 2-amino-5-[2′-deoxy-β-*d*-erythro-pentofuranosyl)amino-4*H*-imidazol-4-one (imidazolone), which is further converted by hydrolysis and rearrangement to 2,2-diamino-4-[(2′-deoxy-β-*d*-erythro-pentofuranosyl)amino]-5(2*H*)-oxazolone (oxazolone) (Cadet et al., 1994). Some authors speculated that these ODMs could be a much more sensitive marker of oxidative stress, since they stand as products of further 8-oxoGua oxidation (Cadet et al., 1994; Matter et al., 2006); however, in streptozotocin-induced diabetic rats, no difference in the levels of these modifications was detected between treated and control animals in nuclear DNA (nDNA) (Matter et al., 2006). If the same is found in the mtDNA it could be of special interest for future evaluation.

Guanine is unique in that it reacts with $^1O_2$, producing 8-oxoGua. Due to its electron-rich conjugated double bonds, $^1O_2$ adds across the imidazole ring giving rise to 4,8-endoperoxide guanine, which rearranges into 8-hydroperoxyguanine (8-OOH-G). The resulting guanine hydroperoxide reduces into the prevalent 8-oxoGua (or its tautomer 8-OHGua) (Ravanat et al., 2001).

2.3. Indirect ODMs

Several byproducts from ROS-initiated processes can react with DNA components, generating cytotoxic or mutagenic lesion, such as those that arise from reactive nitrogen species (RNS) and from lipid peroxidation products (Cadet et al., 2010b; Esterbauer et al., 1990).

In vertebrates, the signaling molecule nitric oxide (NO•) can react with $O_2^{\bullet-}$ forming the strong oxidant peroxynitrite ($ONOO^-$). Although, some physiological roles of NO are actually performed by $ONOO^-$, unbalance between generation and degradation clearly leads to toxic effects in cells (for a comprehensive review (Pacher et al., 2007)). Peroxynitrite can damage both the 2-deoxyribose moiety and the nucleobase, especially guanine (detailed mechanism in Ref. (Niles et al., 2006)).

Evidence for DNA strand break arising from $ONOO^-$ attack at the sugar moiety derives from plasmid relaxation assay and detection of base propenal release (Kennedy et al., 1997; Salgo et al., 1995; Yermilov et al., 1996). Thence the most probable mechanism is hydrogen abstraction at C-4′ of the 2-deoxyribose due to the presence of the unique base propenal as product of DNA strand scission under aerobic conditions. Furthermore, peroxynitrite can nitrate guanine in C8 to give 8-nitroguanine (8-NO_2Gua) and 5-nitro-4-guanidinohydantoin (Niles et al., 2001; Yermilov et al., 1995a). Of these, only 8-NO_2Gua was detect in DNA in vivo (Spencer et al., 1996), although 8-NO_2Gua was shown to depurinate within few hours generating apurinic sites (Yermilov et al., 1995b). Additionally, peroxynitrite leads to purine deamination generating xanthine from guanine and hypoxanthine from adenine, not only in cells treated directly with $ONOO^-$ (Spencer et al., 1996, but also in LPS- and IFN-γ-induced NO synthase activation in macrophages, demonstrating that these ODMs are very likely to occur during inflammatory process (deRojas-Walker et al., 1995).

Interestingly, during one-electron oxidation of Gua, the resulting guanine radical cation (·Gua^+) may suffer nucleophilic addition of: i) water, generating C8-OH-7-yl (and proceed as detailed in Section 1.2) or; ii) amino side-chain group of lysine in a context of trilysine peptide (KKK), resulting in a cross-link (Gua–K) (Perrier et al., 2006). It has been suggested that this type of lesion would be quite prevalent between DNA and DNA binding proteins, since most of them are rich in lysine content. If the nuclear packing proteins histones, that are known to be enriched with K residues, are the most probable responsible for generation of Gua–K in the nucleus, TFAM certainly is in the mitochondria. Moreover, because TFAM holds two KKK cluster, this feature establishes to this mtDNA packing protein the status of main participant in DNA–protein cross-link formation.

Particularly in mitochondria, reactive hydroperoxides, ketonic and aldehydic derivatives from lipid peroxidation may easily react with mtDNA. Considering the wide range of ODMs that •OH is able to generate, a potentially wider range of oxidatively generated DNA adducts may arise from these lipid peroxidation byproducts, with a total of 69 structurally distinct DNA adducts identified so far (Hecht et al., 2011). Among these, some are induced by highly reactive aldehydes formed i) from lipid peroxidation; ii) from thromboxane and prostaglandin biosynthesis; iii) as intermediates during metabolic detoxification of nitroamines and ethanol; and iv) directly from fuel combustion and tobacco smoke. The extensively characterized prostaglandin synthesis and lipid peroxidation breakdown product, malondialdehyde (MDA), and the byproduct of •C4′-initiated DNA strand incision, base propenal, react with guanine to yield the pyrimido[1,2α]purine-10(3H)one (M1Gua) (Cadet et al., 2010a; Dedon et al., 1998). The mechanism of formation is thought to proceed via addition of MDA to C2 amino group of guanine (N^2-amino) followed by cyclization at N1 and dehydration. Nonetheless, ring-opening of M1Gua to N^2-(3-oxo-1-propenyl)-guanine (N^2-OPGua) occurs spontaneously in duplex DNA when M1Gua is paired with cytosine, but not with thymine (Mao et al., 1999). The mechanism proposed by the authors takes into account the formation of a transient Schiff base intermediate via C4-amino group of cytosine and exocyclic C8, followed by hydrolytic regeneration of cytosine and formation of N^2-OPGua. Interestingly, the acyclic N^2-OPGua is stable in duplex DNA paired either with C or T, but undergoes cyclization rapidly in single-stranded DNA (Mao et al., 1999).

Three reactive aldehydes—the α,β-unsaturated aldehydes crotonaldehyde and acrolein, and acetaldehyde—induce the formation of structurally different forms of 1,N^2-propanoguanine adducts (1,N^2-propanoGua) in DNA of rodents and humans (Chung et al., 1989; Garcia et al., 2011; Zhang et al., 2006, 2007). Crotonaldehyde unsaturation undergoes Michael addition at C2 amino group to yield N^2-(1-methyl-3-oxo-propyl)-guanine. The adduct undergo ring closure through its aldehydic carbon and N1 forming 1,N^2-(1-hydroxy-3-methyl)propanoguanine [1,N^2-(1-OH-3-m)pGua] (Chung et al., 1989). Acetaldehyde can also form 1,N^2-(1-OH-3-m)pGua via two successive reactions (Garcia et al., 2011). Etheno adducts formation has been ascribed originally to epoxyaldehydes resulting from further oxidation of lipid peroxidation byproducts (Chung et al., 1996). However, it has also been shown that lipid hydroperoxide reactivity towards DNA nucleobases is higher than epoxyaldehydes (Blair, 2008). Four etheno adduct derived from cytosine, guanine and adenine were detected in vivo: i) 3,N^4-etheno-2′-deoxycytidine; ii) 1,N^6-etheno-2′-

deoxyadenosine; iii) N^2,3-etheno-2′-deoxyguanosine and; iv) 1,N^2-etheno-2′-deoxyguanosine. There are multiple mechanisms of formation of etheno adducts, which will not be expanded in this session (for epoxyaldehyde driven etheno adduct formation. (Petrova et al., 2007).

3. ODMs in mitochondria in normal and pathological conditions

The fact that mitochondria are a major source of intracellular ROS led to the widespread notion that the mtDNA accumulated more ODMs than nDNA. Initial measurements in cellular DNA seemed to support this idea. Richter et al. (1988) published the first quantification, by HPLC-EC detection, of 8-oxodGuo in mtDNA showing that their levels were extensive (1 per 8000 bases) and higher than in nDNA (Richter et al., 1988). Two subsequent studies soon contested those values as being overestimated, as measurements using other methods found much smaller values, although these studies the authors did not compare with nDNA (Hegler et al., 1993; Higuchi and Linn, 1995). The high levels found in the earlier studies were attributed to artifact oxidation during DNA isolation and sample preparation. Using GC–MS detection, Anson and colleagues analyzed the levels of 10 oxidized nucleobases in liver from young and old rats, and did not find a significant difference between nDNA and mtDNA in any adduct measured, including 8-oxodGuo (Anson et al., 1999). However, this study relied on sample derivatization procedures that were later demonstrated to induce formation of 8-oxoGua and others ODMs (Dizdaroglu et al., 2002). In spite of this observation a posteriori, the original data concerning 5-OHCyt, 5-OHUra, 5-HmUra and 8-oxoAde can still be considered reliable, since formic acid hydrolysis at high temperature (120 °C) does not generate spurious ODMs (Senturker and Dizdaroglu, 1999). These results, however, differed from those published by Zastawny et al. (1998) using pig liver, where they found 4× more 8-oxoGua in mtDNA, and up to 40× more 5-OHHyd and 5-OH-5-meHyd in liver mtDNA when compared to nDNA (Zastawny et al., 1998). Using HPLC-EC and an improved DNA isolation method, Hamilton and colleagues found about 6× higher levels of 8-oxoGua in mouse liver mtDNA vs nDNA (Hamilton et al., 2001a). These conflicting results have generated confusion in the literature, and the issue has not been extensively revisited since.

Mitochondrial dysfunction has been implicated in the pathophysiology of several diseases, including heart diseases (Lemieux and Hoppel, 2009), metabolic syndromes/diabetes/obesity (Gurzov and Eizirik, 2011), neurodegenerative diseases (Alzheimer's, Parkinson's and Hungtinton's diseases) (Lin and Beal, 2006), cancer (Chandra and Singh, 2011) and normal aging (Prolla et al., 2010). In all cases, a role for oxidative stress and increased ROS production has been postulated as a main event leading to mitochondrial dysfunction (Fernandez-Checa et al., 2010; Halestrap and Pasdois, 2009; Wanagat et al., 2010) and accumulation of ODMs in mtDNA has been proposed. Nonetheless, the direct measurement of ODMs in mtDNA requires a relatively large amount of sample and sensitive analytical techniques, and thus such reports have been scarce in the literature. Wang and colleagues quantified oxidized bases in nDNA and mtDNA from post-mortem brain samples from normal subjects and patients suffering from mild cognitive impairment (MCI), the earliest detectable form of Alzheimer's disease. They found elevated levels of 8-oxoGua, 8-oxoAde and FapyGua in nDNA from MCI subjects, but only elevated FapyGua in mtDNA from the same patients (Wang et al., 2006). Using a fluorescent-labeled antibody, Nakabeppu and colleagues found increased immunoreactivity in the cytoplasm of nigrostriatal dopaminergic neurons of Parkinson's disease (PD) patients (Shimura-Miura et al., 1999). Similar results were found in a mouse model of PD, of animals injected with MPTP/MPP^+ (Chen et al., 2005a). These results, however, should be taken cautiously, as the use of antibodies to detect oxidized bases has been strongly questioned. But although these results are still largely correlative, and restricted by their methodological limitations, they provide evidence that ODMs accumulate in mtDNA in neurodegenerative diseases in which mitochondrial dysfunction is a common feature; it remains, however, to be determined, if these lesions contribute to the pathophysiology of the diseases.

MtDNA oxidation has been detected as a result of hypoxia-reoxygenation in animal models. In a rat model of kidney ischemia–reperfusion, increased cytoplasmic immunoreactivity (using an antimouse-8-oxoGua antibody (MOG-020), obtained from JICA, Shizuoka, Japan) was detected 6 h after reperfusion and preceded the necrosis of proximal tubular cells in the outer medulla region of the kidney, suggesting a role in loss of viability (Tsuruya et al., 2003). In a model of respiratory hypoxia, increased 8-oxoGua immunoreactivity (using an mouse anti-8-oxoGua antibody, from QED Bioscience, San Diego, CA, USA) was observed in hippocampus and cerebellum, indicating accumulation of ODMs induced by hypoxic conditions (Lee et al., 2002). Moreover, increased perinuclear 8-oxoGua immunoreactivity was observed in epithelial cells of the lung in mice exposed to hyperoxia (Roper et al., 2004), suggesting that mtDNA ODMs may play a causative role in lung diseases.

In cellular models of diseases, increased oxidatively generated mtDNA damage has also been detected. Increased 8-oxoGua has been found in mtDNA of cells exposed to nickel (Xu et al., 2011); in cultured neurons exposed to high frequency radiofrequency radiation (Xu et al., 2010); in a Down syndrome cellular model of elevated Cu, Zn-SOD activity (Lee et al., 2001); and in fibroblasts co-cultured with activated neutrophils, as a model for inflammation (Shen et al., 2000). However, most experimental support for the hypothesis that oxidized bases accumulate in mtDNA in disease conditions is indirect evidence coming from studies of mtDNA repair activities in cellular and animal models. Lower activity of the 8-oxoguanine DNA glycosylase (OGG1), which removes 8-oxoGua (see below) was detected in mitochondria from breast (Mambo et al., 2002), lung (Karahalil et al., 2010; Mambo et al., 2005) and prostate cancer cell lines (Trzeciak et al., 2004). Since OGG1 is the major DNA glycosylase for oxidized purines in mitochondria (de Souza-Pinto et al., 2001a), these results imply that there is an accumulation of these modifications in mtDNA in these cell lines. Although the relevance of this accumulation in the sequence of molecular events that lead to cellular transformation is still not very clear, results showing that the levels of 8-oxoGua in mtDNA from radiosensitive squamous cell carcinoma cell lines after γ irradiation were higher than in mtDNA from radio-resistant counterparts (Ueta et al., 2008), suggested an important role for mtDNA damage in survival. The radio-resistant cell lines expressed significantly higher levels of OGG1, TFAM and the mitochondrial DNA polymerase γ (pol γ), showing a direct relationship between mtDNA repair, damage accumulation and cell fate after DNA damage (Ueta et al., 2008).

Taken together, the results discussed in this section suggest that mtDNA ODMs accumulate in several human diseases. However, a limitation for more studies has been the amount of biological sample needed for isolation of enough mtDNA for analytical techniques. In this regard, advances in such techniques to accommodate the use of lower amounts of sample would allow for great progress in this area and efforts in this direction are needed.

4. DNA repair pathways for ODMs in mitochondria

As described above, ROS can generate a variety of DNA lesions, including oxidized DNA bases, abasic sites, and single strand breaks (SSBs), and if this damage in nDNA and/or mtDNA are not repaired, they can accumulate to high levels and lead to cellular dysfunction and disease. Thus, mtDNA repair pathways are required to maintain mitochondrial genome integrity (Fig. 2). As the different types of DNA modifications have distinct structural and physical–chemical properties, each class of DNA lesions are repaired by specific repair process. Table 1 lists the most common types of modifications and the repair pathways known to metabolize those lesions.

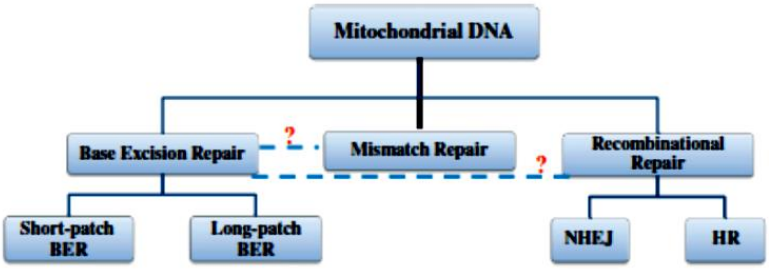


Fig. 2. Known excision repair pathways in mitochondria. Possible interactions between pathways for the repair of ODMs are discussed in the text and indicated as "?" in the figure 4. NHEJ: Non-homologous end joining, HR: Homologous recombination.

The first DNA repair pathway identified, and now well characterized, in mammalian mitochondria is the base excision repair (BER) pathway. BER evolved specifically to repair small covalent modifications that do not perturb significantly the double helix conformation. This pathway repairs most ODMs, as well as alkylations and deaminations of DNA bases (for a comprehensive review of BER biochemistry see (Dianov et al., 2001; Svilar et al., 2011)). SSBs are repaired by a cognate pathway, know as single strand break repair (SSBR), which shares most of its enzymatic activities with the later steps of BER (Caldecott, 2008); thus, repair of these lesions will be discussed in the context of BER.

Base mismatches and small (1–4 nucleotides) insertion/deletion loops are corrected by the post-replicative mismatch repair (MMR) pathway (Kunkel and Erie, 2005). Nuclear MMR is highly conserved from bacteria to man, and most human proteins involved in MMR are homologues to the bacterial mutS, mutL and mutH. In yeast, a mitochondrial-specific mutS homologue, MSH1, was identified (Reenan and Kolodner, 1992) and the protein was shown to have ATPase activity and bind mismatches (Chi and Kolodner, 1994a,b). In vivo evidence for the existence of an active MMR pathway in yeast mitochondrial was obtained when it was demonstrated that poly (GT) tracts were unstable in mtDNA and this effect was suppressed by MSH1 (Sia et al., 2000).

On the other hand, higher eukaryotes do not have an MSH1 homologue, initially suggesting that mammalian mitochondria lacked MMR activity. The first evidence that mammalian mitochondria are proficient in this repair pathway was the demonstration that human mitochondrial extracts supported mismatch correction in an in vitro assay (Mason et al., 2003). Following that, we demonstrated that mitochondrial MMR does not require the nuclear MMR proteins, MSH2, MSH6 and MHL1, but requires the multi-functional protein YB-1, which localizes to mitochondria and binds mismatched DNA (de Souza-Pinto et al., 2009a). Moreover, YB-1 depletion led to increased mtDNA mutagenesis and decreased respiration (de Souza-Pinto et al., 2009a), implicating this protein, and MMR, in maintaining mitochondrial function.

Table 1
Most common DNA-damaging agents, examples of DNA lesions, and the major repair pathways responsible for each type of modifications.

DNA damaging agents	DNA lesions	Major DNA repair pathway
X-rays Reactive oxygen species Alkylating agents Spontaneous reaction	Abasic sites Oxidized base modifications Single strand breaks	Base excision repair
Replication errors	Mismatches Insertions Deletions	Mismatch repair
Ionizing radiation UV-light Radio-mimetic agents	Interstrand crosslinks Double strand breaks	Recombinational repair
UV-light Polycyclic aromatic hydrocarbons	6-4 photoproducts Cyclobutane pyrimidine dimer Bulky adducts	Nucleotide excision repair

Although some types of ODMs could result in base mismatches, like an 8-oxoGua/Ade mispair, there is only very little evidence that MMR participates in repair of ODMs (Fig. 2). In yeast, Kaniak and colleagues demonstrated that mtDNA mutagenesis in a mutant lacking *Ogg1* is decreased by ectopic expression of *Msh1* (Kaniak et al., 2009), indicating a role for this protein in preventing accumulation of oxidized bases. Moreover, the *Trypanosoma cruzi* MSH2 proteins were shown to localize both to the nucleus and to the mitochondrion, and to be involved in oxidative stress resistance (Campos et al., 2011). However, these studies did not address whether MSH 1 and 2 participate in oxidative stress resistance through their roles in MMR or through an alternative, not yet known, biochemical function. This issue needs to be further investigated, as some studies have suggested that agents that induce oxidative stress are selectively lethal to tumors bearing defects in MMR (Martin et al., 2009). Likewise, it remains to be determined whether these cytotoxic effects are due to accumulation of ODMs in the nuclear or in the mtDNA.

Double strand breaks (DSBs) are repaired by homologous recombination (HR), which is thought to be an error-free repair, or non-homologous end joining (NHEJ), an error-prone pathway (McKinnon and Caldecott, 2007). An end-joining activity was first identified in mammalian mitochondrial extracts using in vitro assays (Lakshmipathy and Campbell, 1999a). This activity was attributed to Ligase III (Lakshmipathy and Campbell, 1999b) and to a variant Ku80 protein (Coffey and Campbell, 2000); both proteins are canonical DSBR factors in the nucleus as well. More recently, the recombination protein RAD51 has been found in mammalian mitochondria; this protein accumulated in mitochondria after oxidative stress and associated with mtDNA in an oxidative stress-dependent fashion (Sage et al., 2010). These results, again, do not elucidate whether the protein's role in oxidative stress resistance is associated with its function in homologous recombination or another biochemical role. We have recently shown that RAD52, another HR factor, interacts physically and functionally with OGG1, a BER enzyme, and modulates its activity (de Souza-Pinto et al., 2009b). RAD52 knockdown cells are sensitive to oxidizing agents and accumulate elevated levels of 8-oxoGua, indicating that this interaction is important in the repair of ODMs. As OGG1 localizes to both the nucleus and the mitochondria (see below), it remains to be determined whether this interaction is also important in mtDNA maintenance. In this context, it is possible that several DNA repair factors have alternative roles in oxidative stress resistance through interactions with other repair proteins/pathways (Fig. 2).

4.1. Mitochondrial base excision repair

BER is a multistep process and takes place in both nucleus and mitochondria with a similar mechanism (Fig. 3). Most often the mitochondrial BER (mtBER) proteins are unique isoforms or specific splice variants from a common gene with the nuclear isoforms (Nilsen et al., 1997; Nishioka et al., 1999); however post-translationally modified versions of the nuclear proteins are also observed (Chattopadhyay et al.,

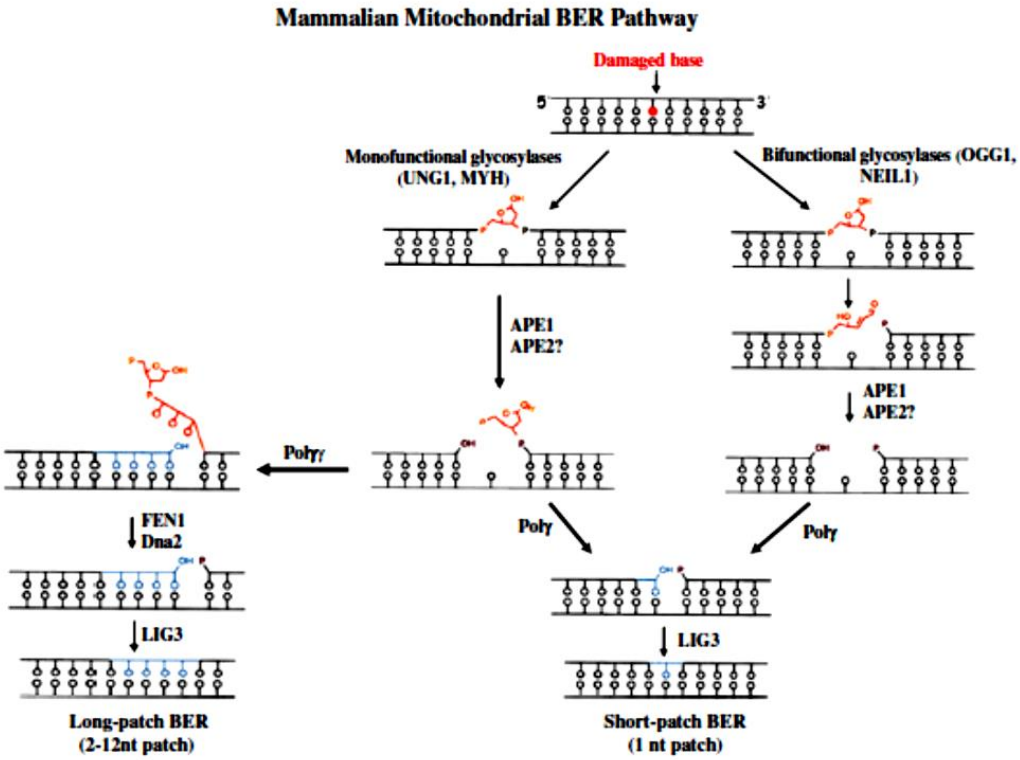


Fig. 3. Schematic representation of the mammalian mitochondrial BER pathway. The 3′ or 5′-intermediates generated during processing of the abasic site are indicated in red; the newly incorporated single nucleotide (in SP-BER) or repair patch (4–6 nt in LP-BER) are indicated in blue.

2006; Nakabeppu, 2001). Briefly, both nuclear BER (nBER) and mtBER include four distinct steps; the pathway is initiated by a specific DNA glycosylase, which recognizes the modified or inappropriate base and cleaves the *N*-glycosidic bond, creating an abasic (AP) site. The resulting AP site is then processed either by an AP endonuclease or by the associated AP-lyase activity of the DNA glycosylases, which creates a strand break with a 3′-OH end and a 5′-dRP residue. Repair then proceeds with the removal of the 5′-dRP residue and gap filling by DNA polymerases (polβ in the nucleus and pol γ in mitochondria). The resulting nick is sealed by DNA ligase. The sequence of events described above illustrates the short-patch BER (SP-BER), which involves the removal of the DNA lesion and the incorporation of a single nucleotide. SP-BER is well characterized in both nucleus and mitochondria.

The BER pathway is divided into two sub-pathways, according to the number of new nucleotides incorporated into the repair patch. SP-BER involves the incorporation of only one new nucleotide to replace the one containing the damaged base. Long-patch BER (LP-BER), on the other hand, involves the incorporation of 2 to 12 nucleotides during BER synthesis (Svilar et al., 2011). LP-BER is recruited when the 5′ end is modified or refractory to the dRP lyase activity of polβ. DNA polβ then inserts more nucleotides, promoting the displacement of the fragment containing the modified end; this activity creates a 3′-stranded flap structure, and the displaced strand is then that is removed by flap endonuclease-1 (FEN1) (Klungland and Lindahl, 1997), and then DNA ligase I seals the break completing the repair. Other DNA polymerases, possibly Pol δ and Pol ε, may also be involved in LP-BER. Until recently, it was believed that mammalian mitochondria did not have LP-BER activities. Work by three independent groups have demonstrated, almost simultaneously that mitochondria can perform LP-BER (Akbari et al., 2008; Liu et al., 2008; Szczesny et al., 2008). Mitochondrial LP-BER, and the proteins identified in mitochondrial LP-BER are described below.

4.1.1. Mitochondrial SP-BER

A. Recognition and incision by DNA glycosylases

SP-BER is initiated by lesion specific DNA glycosylases that recognize and cleave modified or inappropriate DNA bases. Several DNA glycosylases, and splice variants of nuclear DNA glycosylases have been identified in mammalian mitochondria; for example 8-oxoguanine DNA glycosylase 1 isoforms α (OGG1α) and β (OGG1β), uracil DNA glycosylase (UDG, also termed UNG), a homolog of the *E. coli* DNA glycosylase mutY (MYH), a mammalian ortholog of *E. coli* endonuclease III (nth) (NTH1) *N*-methylpurine DNA glycosylase (MPG or AAG from Alkyladenine DNA glycosylase) and homologues of the *E. coli* DNA glycosylase Fpg/Nei, NEIL1, NEIL2 and NEIL3 (Mandal et al., 2012; Svilar et al., 2011).

OGG1 is the primary enzyme for the repair of oxidized purines in both nuclear and mtDNA. OGG1 is a bifunctional enzyme, which also possess AP-lyase activity to cleave DNA at AP sites. The human *OGG1* gene produces two major distinct transcripts via alternative splicing: *α-OGG1* and *β-OGG1* (Nishioka et al., 1999; Takao et al., 1998). OGG1α contains a unique C-terminal domain that harbors a strong nuclear localization signal (NLS), sorts mainly to the nucleus and a lesser extent to the mitochondria. OGG1β has a longer, and more hydrophobic, C-terminal than OGG1α, and localizes to the mitochondria via a shared N-terminal mitochondrial targeting sequence (MTS) with OGG1α. Recombinant OGG1β has no detectable DNA glycosylase

activity (Hashiguchi et al., 2004), what suggests that OGG1α accounts for both the nuclear and mitochondrial 8-oxoGua repair activities.

MYH (MutY-homologue) is a monofunctional DNA glycosylase that recognizes adenine mispaired with 8-oxoGua, but excises the adenine, leaving the 8-oxoGua intact (Michaels et al., 1990). Nuclear and mitochondrial adenine DNA glycosylases are generated by alternatively spliced forms of the human *MYH* gene (hMYH) (Ohtsubo et al., 2000). The *hMYH* gene produces three major transcripts with unique 5′ mRNA sequences, i.e. α, β and γ, each of which is alternatively spliced to create as many as 10 different splice variants. The p52/53 isoform is found both in nucleus while the p57 is found mainly in mitochondria p57. The p52 nuclear species has been suggested to be the product of the hMYHβ1, β3 or γ2 transcript(s). The mitochondrial MYH is predicted to be generated by the hMYHα1 transcript (Ohtsubo et al., 2000).

NTH1 (Endo III-homologue) is a bifunctional glycosylase (DNA glycosylase/AP lyase) that excises a wide range of pyrimidine lesions, including ThyGly, 5-OHCyt, FapyGua and FapyAde. The hNTH1 protein is localized almost exclusively to the nucleus, likely due to the presence of a weak MTS (Luna et al., 2000; Takao et al., 1998). Notably, no alternative splicing of the hNTH1 gene has been reported so far, and the disparate protein isoforms of hNTH1 generated by multiple translation–initiation sites do not exhibit differences in localization (Takao et al., 1998). However, ThyGly and FapyAde incision activity was greatly reduced in liver mitochondrial extracts from NTH1 knockout mice, suggesting that the enzyme is functionally active in mitochondria from mammals (Hu et al., 2005).

Two isoforms of UDG are encoded by alternative splicing and transcription from different positions in the *UNG* gene (Nilsen et al., 1997). UNG1 is the mitochondrial and UNG2 is the nuclear form of the *UNG*-gene. These enzymes remove uracil from DNA, generated by spontaneous deamination of cytosine. The mitochondrial and nuclear isoforms of UDG share a common catalytic domain, but have different N-terminal sequences for subcellular sorting. In addition to excising uracil from U:G > U:A base pairs, the UNG proteins have the ability to remove oxidized cytosine from DNA as well, including isodialuric acid, alloxan and 5-OH-Ura (Dizdaroglu et al., 1996; Nilsen et al., 1997).

Mammalian homologues of the bacterial *nei* glycosylase (nei-like DNA glycosylases, NEILs 1, 2, and 3) have recently been identified, which excise primarily FapyAde, but also other ODMs, although with some restraint depending on the DNA base opposite to the modification (Grin and Zharkov, 2011; Grin et al., 2010; Takao et al., 2002). Futhermore, NEIL1 is especially crucial in removing ODMs in the context of lesions in single-stranded DNA (Bandaru et al., 2002; Hazra et al., 2002; Rosenquist et al., 2003). NEIL1 was found to localize to mouse liver mitochondria, where it is likely to provide the residual incision activity of substrates containing Fapys in extracts from mice lacking both OGG1 and NTH1 (Hu et al., 2005). Recently, NEIL2 was also found in human mitochondrial extracts, suggesting a role for this protein in repair of ODMs and SSBs in mtDNA (Mandal et al., 2012).

B. AP-site processing

Following base excision by a DNA glycosylase, the resulting abasic site is processed by APE endonuclease (APE1). Bifunctional DNA glycosylases, like OGG1, hMYH and NTH1 have β-elimination activity, which could generate a 5′dRP-containig single strand break; however it is likely that APE1 competes for the abasic site, displacing the DNA glycosylase (Hill et al., 2001). The APE1 protein is found both in nuclei and mitochondria (Tell et al., 2005), and recent evidence suggests that the mitochondrial form is an N-terminal truncation of the full-length APE1 (Chattopadhyay et al., 2006). APE2, a second mammalian homologue of bacterial exonuclease III, is also localized in mitochondria but its contribution to BER is not clear yet (Hadi et al., 2002; Tsuchimoto et al., 2001).

On the other hand, NEIL1 and NEIL2 have β,δ-elimination activity, generating 3′-phosphate at the SSB site (Das et al., 2006; Wiederhold et al., 2004). The 3′-phosphate completely blocks polymerase progression, and thus needs to be removed before nucleotide incorporation can take place. In the nucleus, polynucleotide kinase 3′-phosphatase (PNKP) (Habraken and Verly, 1983; Pheiffer and Zimmerman, 1982), was identified as the phosphatase responsible for removing these groups to restore the 3′-hydroxyl terminus. Recently, PNKP was also found in human mitochondria, and its inactivation or depletion led to accumulation of ODMs the mitochondrial genome (Mandal et al., 2012; Tahbaz et al., 2012). These recent results suggest that this APE-independent BER sub-pathway may have a role in protecting mitochondria against oxidative stress-induced DNA damage. However, it is still unclear what the contribution of this pathway is to the overall genome maintenance in the organelle.

DNA strand breaks with a 3′-phosphate are also a common product of hydrogen atom abstraction, which then requires undergoing PNKP-dependent repair, as discussed above. Some other unique DNA scission products that arise from •OH-mediated hydrogen atom abstraction are known to also be refractory to DNA polymerase (DNA Pol) activity and to need further processing. The prevalent 3′-phosphoglycolate, which arises from ˙C-4′-initiated aerobic DNA cleavage mechanism, also needs to undergo processing to become an appropriate substrate for subsequent biochemical reaction of the DNA repair system (Henner et al., 1983a; Wiseman and Halliwell, 1996). In turn, the downstream product of H-5′ abstraction in the presence of thiol in aerobic condition, a 5′-aldehyde termini, is refractory to dRP lyase activity of DNA Pol due to its remaining base attach at the sugar moiety. However, it has been shown that pol β can strand displace the 5′-aldehyde-containing strand up to four nucleotides, stimulated by FEN1 (Jung et al., 2011).

C. DNA synthesis

Once the AP site has been processed by APE1 or AP-lyase/PNKP, the following step in the BER pathway is catalyzed by a DNA polymerase, which inserts the correct nucleotide in the generated gap. Mitochondria have a single DNA polymerase, pol γ, which assumes sole responsibility for DNA synthesis in all replication, recombination, and repair transactions involving mtDNA. During the SP-BER, one single nucleotide is incorporated into the gap by pol γ. Pol γ has both polymerase and dRP lyase activity and is therefore the major enzyme for the repair synthesis step in BER (Copeland and Longley, 2003; Longley et al., 1998).

D. Ligation

The final step in SP-BER is sealing of the remaining single-strand nick. In mitochondria, this molecular process is performed by a variant of the nuclear DNA ligase III (LIG3). In particular, the human *LIG3* gene encodes both nuclear and mitochondrial enzymes, which arise from the use of alternative translation–initiation start sites in a single mRNA transcript (Lakshmipathy and Campbell, 1999b). Interestingly, the mitochondrial DNA LIG3 protein apparently functions without the scaffolding protein XRCC1 (Lakshmipathy and Campbell, 2000), a key single-strand break repair factor required for the stability of nuclear DNA LIG3α via its direct physical association (Caldecott et al., 1994). Recently, an essential role for DNA LIG3 in mtDNA maintenance was demonstrated by two independent groups (Gao et al., 2011; Simsek et al., 2011). The severe mtDNA loss and mitochondrial dysfunction observed in transgenic cells lines and animals lacking only the mitochondrial isoform of DNA LIG3 (but not the nuclear isoform) may indicate that this enzyme has a more prominent role in mtDNA maintenance than just its role in BER.

4.1.2. Mitochondrial LP-BER

Considering that the mtDNA is continuously exposed to ROS, it is likely that oxidized AP sites and 2-deoxyribonolactone (dL) are generated in mtDNA at a significant rate. These modifications can inhibit mtDNA replication and SP-BER by covalently trapping pol γ (Liu et al., 2008). These lesions, thus, require processing via a LP-BER pathway, in which the blocking end is removed as part of an oligonucleotide

displaced during repair synthesis (Prasad et al., 2001). Recently, three independent groups identified LP-BER activity in mammalian mitochondria (Akbari et al., 2008; Liu et al., 2008; Szczesny et al., 2008), demonstrating that this sub-pathway operates in parallel with SP-BER. During LP-BER, DNA synthesis displaces the 5′-end containing strand, forming a flap-like structure which needs to be processed by a structure-specific endonuclease before the repair patch can be sealed by a DNA ligase. FEN1 is a structure specific endonuclease which is required for Okazaki fragments processing. In the nucleus, FEN1 is the major catalytic activity involved in LP-BER. FEN1 was also found in human (Liu et al., 2008; Szczesny et al., 2008) and mouse (Kalifa et al., 2009; Szczesny et al., 2008) mitochondria, and implicated in mitochondrial LP-BER using different lesions, such as tetrahydrofuran (an artificial analog of abasic site) and dL. It is noteworthy that nuclear LP-BER utilizes other replication associated proteins, namely PCNA, DNA pol δ and DNA pol ε, and DNA ligase I. To date, only FEN1 has been found in mitochondria, but further studies are needed to investigate the role of other protein partners in mitochondrial LP-BER, possibly mtDNA replication associated proteins, in a manner analogous to that seen in the nucleus.

Studies have also demonstrated the existence of FEN1 independent LP-BER pathway in mitochondria. Dna2, another helicase/nuclease involved in Okazaki fragment processing in the nucleus (Balakrishnan and Bambara, 2011), was also found to localize in mitochondria where it can stimulate pol γ DNA synthesis, resulting in the formation of an RNA primer flap. In addition, Dna2 interacts with FEN1 in mitochondria, and play a role in the processing of the 5′ flap structure alone or together with FEN1 (Duxin et al., 2009; Kalifa et al., 2009; Zheng et al., 2008). It is suggested that both Dna2 and FEN1 are involved in mitochondrial LP-BER (Fig. 3).

4.1.3. Mitochondrial single strand break repair

Besides being generated as a direct result from ROS attack, SSBs are also produced as an intermediate during BER and can accumulate if the individual BER steps are uncoupled (Ma et al., 2008). If not repaired, SSBs cause replication and transcription stalling and can be converted to DSBs, which are extremely cytotoxic lesions. SSBs are repaired by SSBR, which shares many enzymatic activities with BER. In nucleus, the breaks are initially recognized and bound by poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) (Pachkowski et al., 2009; Strom et al., 2011), which attracts the ligase III/XRCC1 complex (Chalmers, 2004). After this, SSBR utilizes many of proteins involved in BER. The localization of PARP1 in mitochondria and its involvement in mtDNA repair is yet a controversial issue. PARP1 was found in a complex with mitofilin (Rossi et al., 2009), and poly(ADP-ribosyl)ated proteins were found in mitochondria after traumatic brain injury (Lai et al., 2008). Other studies, however, failed to find PARP in mitochondria, and suggested a spatial segregation between poly(ADP-ribose) synthesizing and degrading enzymes between the nucleus and the mitochondria (Poitras et al., 2007). It is suggested that the localization of PARP1 in mitochondria could be tissue specific, cell cycle or DNA damage specific (reviewed in detail in (Sykora et al., 2012)).

Unrepaired SSBs, especially those containing refractive 5′ termini, can also be substrates for unfruitful ligation attempts by DNA LIG3. Aborted DNA-ligation events often contain a 5′-adenylated intermediated (Ahel et al., 2006). These intermediates are strong blocks for ligation and are removed by Aprataxin, a nucleotide hydrolase/transferase, which is mutated in patients suffering from a form of ataxia with oculomotor apraxia (Ahel et al., 2006). Aprataxin was found in mitochondria from human cells (Sykora et al., 2011), and its depletion SH-SY5Y neuroblastoma cells and primary skeletal muscle myoblasts resulted in mitochondrial dysfunction and mtDNA depletion, indicating a role for this enzyme in mtDNA maintenance.

Fig. 4 summarizes the main substrates for the major enzymes involved in mtBER, as discussed above.

4.2. Organization of mtDNA BER

The mtDNA is localized in the mitochondrial matrix and mitochondrial BER takes place in this compartment. However, as the mtDNA is anchored in the inner side of the inner membrane, in the nucleoid complex, mtDNA BER also seems to be organized in a complex that localizes with the inner mitochondrial membrane. Using a fractionation scheme which separated membrane and soluble fractions of human mitochondria, we demonstrated that most BER activities co-fractionated with TFAM and with the membrane fraction (Stuart et al., 2005). This association was resistant to low concentration of detergent, but released by increasing salt concentration, suggesting that electrostatic interactions between proteins maintained the association of the BER activities with the nucleoid. We also found that the nucleotide excision repair factor Cockayne Syndrome complementation group B (CSB), which is required for transcription coupled repair in the nucleus (Hanawalt and Spivak, 2008), is involved in this association between BER proteins and the mitochondrial membrane, as in cells lacking CSB, this association is looser and the BER activities are released from the membrane fraction with lower salt concentration (Aamann et al., 2010). Interestingly, Boesch and colleagues found that the length of the repair synthesis patch (single- vs long-patch) differs in the soluble and the membrane-associated fraction (Boesch et al., 2010). The authors suggest that coordinate interactions of the different partners needed for BER is only found at sites where the DNA is associated with the membrane, demonstrating the biological importance of this spatial organization of the mtDNA BER complex.

5. MtDNA repair and mitochondrial genomic stability

Genetic stability requires coordination of a network of pathways including DNA repair, recombination and apoptosis. Damage left unrepaired in either nuclear or mtDNA may lead to mutagenic events which play a causative role in the various diseases associated with aging, cancer, and neurodegeneration. In mtDNA, the chance that mutations may have phenotypic consequences is even higher than in the nDNA, as the mtDNA has no intron and thus virtually all mutations occur in coding sequences. The only non-coding sequence in the mtDNA is the D-loop, which is essential for replication and transcription, and mutations in this region could have severe functional consequences as well. In fact, the D-loop is thought to be a hot-spot for mutations, which are found at high levels in this region in aged tissues (Michikawa et al., 1999) and in cancer (Chatterjee et al., 2006). In this context, processes that prevent mutation accumulation, such as DNA repair and selective degradation of highly damaged mtDNA molecules, can have a profound impact on mitochondrial genomic stability. As BER seems, so far, to be the most active repair pathway in mitochondria, its efficiency and regulation play important roles in this process.

Mutations arise from replication of unrepaired (and non-blocking) DNA modifications. In almost all organisms studied so far, pol γ is the sole mitochondrial DNA polymerase, responsible for both replication and repair of the mtDNA (Falkenberg et al., 2007). The first direct evidence that ODMs could lead to mutations in the mtDNA was the observation that in vitro, *Xenopus laevis* pol γ can insert dA opposite an 8-oxoGua template, but only in approximately 27% of the extended products (Pinz et al., 1995). This selectivity for keeping the 8-oxoGua in the *anti* conformation (and thus limiting base pairing with dATP, the mutagenic base pairing) seems to rely on steric impairment provided by Tyr955, an amino acid mutated in a progressive external ophthalmoplegia-associated form of pol γ (Van et al., 2001). In fact, the Y955C pol γ mutant displays relaxed discrimination when either incorporating 8-oxodGTP or during translesion synthesis opposite 8-oxoGua (Graziewicz et al., 2007), suggesting that pol γ variants can have increased mutagenic effects.

It is important, however, to keep in mind that ROS can generate different kinds of ODMs in DNA, and the mutagenicity of many of these

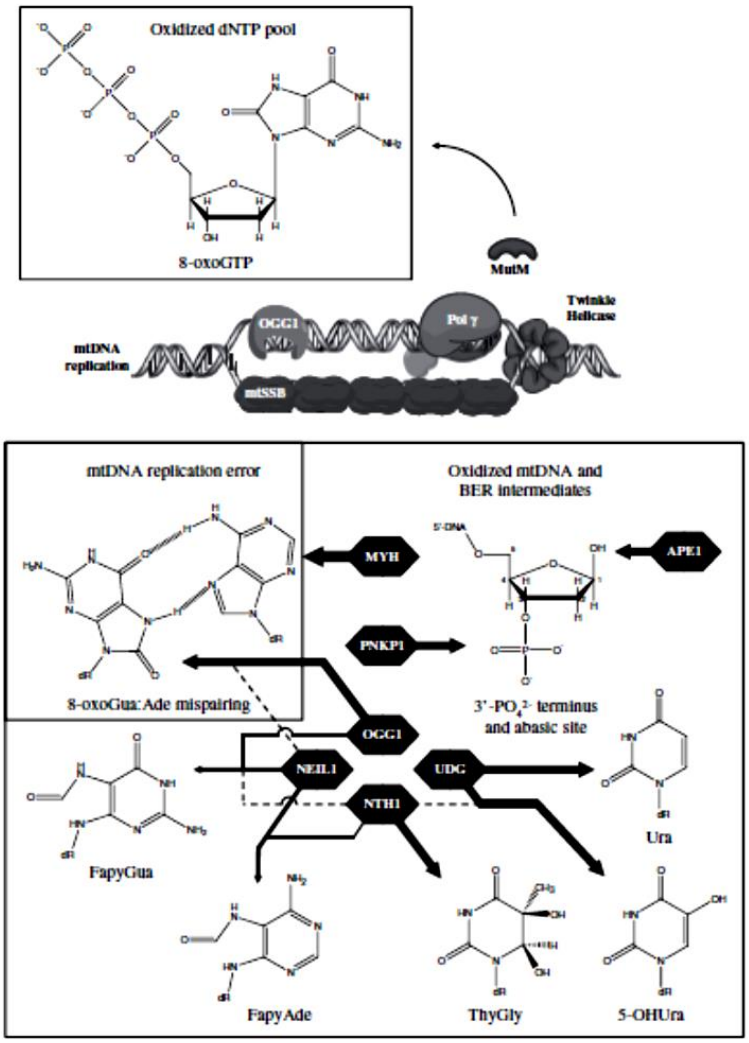


Fig. 4. Substrate specificity and activity of mitochondrial DNA repair proteins. MTH protein antimutagenic effect is due to 8-oxoGTP clearance from the dNTP pool used for replication; a mitochondrial dUTPase has been identified, but is less characterized. Several DNA glycosylases have been identified in mitochondria, and present overlapping substrate specificity. OGG1 recognizes and excises 8-oxoGua and FapyGua. NEIL1 shows a broad substrate affinity, ranging from 8-oxoGua, Fapys, ThyGly, 5-OHCyt and 5-OHUra. NTH1 removes ThyGly, 5-OHCyt and 5-OHUra, and also Fapys, with FapyAde being more efficiently recognized than FapyGua. UDG removes Ura from Ura:Gua mismatch and others Cyt and Ura ODMs. MYH removes Ade from 8-oxoGua:Ade mismatch. PNKP1 processes 3'-phosphate- termini generated after the 2'-deoxyribose attack. APE1 is the major abasic site endonuclease, and as its affinity for abasic site is extremely high, it can displace bifunctional DNA glycosylases from abasic site due to preferential substrate specificity.

modifications has not yet been directly addressed, particularly in mitochondria. Among these, the ring-opened Fapys have received increased attention, as they have been shown to accumulate in mtDNA in mice lacking the OGG1 and NTH1 DNA glycosylases (Hu et al., 2005). In simian kidney cells, FapyGua was found to be slightly more mutagenic than 8-oxoGua, whereas FapyAde and 8-oxoAde were only weakly mutagenic (Kalam et al., 2006). For a more comprehensive review on these lesions and their possible biological roles, we refer the reader to (Dizdaroglu et al., 2008).

Oxidation of the nucleotide pool also contributes to mutagenesis. While 8-oxodGTP is incorporated into the template by pol γ with a specificity constant approximately 10,000-fold lower than that for dGTP, once incorporated, 96% of the time 8-oxodGMP is extended by continued polymerization rather than being excised by the proofreading exonuclease (Hanes et al., 2006). The biological importance of this effect is supported by the ubiquitous existence of a specific phosphatase for oxidized nucleotide, the mutT protein in bacteria and the mutT homologue (MTH) in eukaryotes. Studies using depletion or overexpression approaches have revealed a pivotal role for MTH in preventing mutagenesis and cell death (reviewed in (Nakabeppu et al., 2010)). Moreover, mice defective in MTH1 displayed elevated levels of spontaneous lung, gastric and ovarian tumors (Tsuzuki et al., 2001), and germline MTH1 mutations were found in patients with multiple colorectal adenomas (Sieber et al., 2003). MTH1 is found in mammalian mitochondria (Kang et al., 1995), where it prevents mitochondrial dysfunction after H_2O_2 treatment (Yoshimura et al., 2003).

Impaired expression of the MTH1 protein was also observed in spinal motor neurons of amyotrophic lateral sclerosis patients (Kikuchi et al., 2002), but more studies are needed to better establish a causative role for accumulation of oxidized dNTPs in mtDNA mutagenesis and mitochondrial dysfunction.

High level of oxidatively generated DNA damage can be particularly deleterious in post-mitotic tissue, such as the heart and the brain, as self-renew through cell proliferation is quite limited in these tissues. In neurons, in particular, efficient mtBER may be even more important for function, as these cells rely primarily on mitochondria for ATP production. Earlier studies from our group demonstrated that mtBER capacity is organ-specific and brain has the lowest capacity (Karahalil et al., 2002). When nuclear and mtBER activities were evaluated in five distinct mouse brain regions, a significant age-dependent decrease in mitochondrial DNA glycosylases, OGG1, UDG and NTH, activities was observed for all regions (Imam et al., 2006). Another study of rat cerebral cortices showed that mtBER activities gradually declined with age, and this decline in activity parallels decreased expression of repair enzymes, such as OGG1 and pol γ (Chen et al., 2002).

The free radical theory of aging proposes that aging may be, in part, due to free radical-dependent cellular damage accumulation. As mitochondrial dysfunction plays a critical role in this process, it is of great interest to understand whether the mtDNA repair mechanisms play an important role in the aging process and age-associated diseases. Levels of 8-oxoGua increase with age in the nuclear (Fraga et al., 1990) and in the mtDNA (Hamilton et al., 2001b; Hudson et al., 1998) in animal models. However, BER activities in mitochondria from rats (Souza-Pinto et al., 1999) and mice (de Souza-Pinto et al., 2001b) do not follow the same pattern, as OGG1 activity was found to increase with age in liver and heart. However, 8-oxoGua removal rate may, in fact, decrease with age in some tissues, as Szczesny and colleagues showed that that although the total OGG1 activity is higher in old mitochondria, a large fraction of the enzyme is stuck to the membrane in the precursor form, which could not be translocated to and processed in the mitochondrial matrix (Szczesny et al., 2003). Moreover, tissue variation in mtBER activity was also observed with age (Szczesny et al., 2010). Thus, the issue still needs to be further investigated to better our understanding of how BER is regulated with age in different cell types, and how this impacts mitochondrial function and the age-associated phenotypes.

Inherited premature aging syndromes have been very useful models to understand the normal aging process in humans. Although these syndromes are caused by single-gene mutations, they recapitulate several phenotypes of normal aging and provide mechanistic insights into the pathways deregulated during aging. The segmental premature aging syndrome Cockayne syndrome (CS) shows a progressive neurological dysfunction; cells deficient in the protein mutated in the complementation group B (CSB) show impaired mitochondrial repair of 8-oxoGua (Stevnsner et al., 2002). Recently, we and others demonstrated that CSB is found in mitochondria and play a role in mtBER (Aamann et al., 2010; Kamenisch et al., 2010), likely modulating BER association with the mitochondrial membrane. The CSB protein has also been shown to be a direct accessory factor to BER enzymes, such as APE1 (Wong et al., 2007) and NEIL1 (Muftuoglu et al., 2009), what suggests that the proteins may also have additional roles in modulating mtBER efficiency.

As the 13 mitochondrially encoded proteins are essential for proper functioning and assembly of oxidative phosphorylation (OXPHOS) complexes I, III and IV and of the ATP-synthase, instability of the mtDNA is expected to impair mitochondrial function, and the role of mtDNA repair in this process has just recently began to be investigated. It is clear that DNA lesions can impair correct gene expression and recent studies have found evidence for that in conditions in which ODMs accumulate in mtDNA. For example, in a rat model of failing heart after myocardial infarct, Ide and colleagues (Ide et al., 2001) found a significant impairment of mtDNA gene expression, which correlated with lower enzymatic activity of complexes I, III and IV, and with generation of $O_2^{\cdot-}$ and •OH, suggesting that mtDNA ODMs resulted in lower transcription. Several other groups reported similar findings in other experimental systems, such as decrease mtDNA transcription in liver mitochondria from a mouse model of sepsis (Suliman et al., 2003), and impaired mtDNA replication and transcription in neurons treated with cisplatin (Podratz et al., 2011). Moreover, chronic exposure to arsenic, a known inducer of ROS (Park, Park et al., 2003; Gupta et al., 2003), leads to mtDNA damage and mutagenesis and an increase in the expression of TFAM (Singh et al., 2011).

In addition to effects on gene expression, ODMs-induced transcriptional mutagenesis can also contribute to mitochondrial genomic instability. In bacteria, transcription through DNA templates containing 8-oxoGua and uracil lead to mutated transcripts (Bregeon et al., 2003). Using a luciferase-reporter system, Bregeon et al. (2009) demonstrated that 8-oxoGua is also transcriptionally mutagenic in mammalian cells, where the mutated RNAs were expressed into mutant proteins (Bregeon et al., 2009), demonstrating the potential for direct phenotypical changes resulting from transcription of DNA containing ODMs. No similar analyses has been done yet for the mitochondrial transcription machinery, although the human mitochondrial RNA pol has been shown to arrest at an aldehyde adduct of DNA, known as M1Gua (Cline et al., 2010). Thus, it is very likely that ODMs in mtDNA result in both transcriptional arrest and mutagenesis, which in turn causes impaired activity of the OXPHOS complexes.

An important consequence of impaired OXPHOS activity is increased generation of ROS (Kowaltowski et al., 2009), and this process could lead to a vicious cycle in which mtDNA instability caused by ODMs resulted in increased mitochondrial oxidative stress and more ODMs in mtDNA. These events had been long postulated to play pivotal roles in aging and tumorigenesis, but just recently experimental evidence directly linking mtDNA mutations with altered ROS production and carcinogenesis has appeared in the literature. A mutation in the ND5 subunit of Complex I resulted in enhanced tumorigenesis through ROS generation and activation of the Akt signaling pathway (Sharma et al., 2011). Mitochondrial genome instability, due to Tfam heterozygosis, also contributes to colon cancer development in an $APC^{+/-}$ mouse model via enhanced ROS production (Woo et al., 2012); and mitochondrial mutations have been shown to regulate metastasis in breast cancer (Imanishi et al., 2011) and in UV-induced skin tumors (Jandova et al., 2012. On the other hand, in a model of gliomagenesis, Seoane et al. (2011) found that although mitochondrial dysfunction and ROS generation are observed during oncogenic transformation, mtDNA mutations do not accumulate despite increasing nDNA instability (Seoane et al., 2011). The authors suggest that the mtDNA molecule plays an essential role in the control of the cellular adaptive survival response to tumor-induced oxidative stress, and that the integrity of mtDNA seems to be a necessary element for responding to the increased ROS production associated with the oncogenic process. These apparently contradictory results point out to the need of more investigation into these relationships in different pathological conditions and models as well as during normal aging, as mtDNA mutation accumulation during aging seem to results from clonal expansion of early appearing mutations (Payne et al., 2011).

6. Mechanism of formation of mtDNA deletions

Mitochondrial DNA deletions (ΔmtDNA), particularly large-scale deletions, are a common cause of human mitochondrial diseases and also one of the possible causes of aging (Holt et al., 1988) (Bender et al., 2006; Moraes et al., 1989; Wanagat et al., 2001) (Kraytsberg et al., 2006). Over 100 different mtDNA deletions have been identified in samples from normal subjects and patients suffering from classical mitochondrial diseases and various types of cancer (http://www.mitomap.org). Among these, a 4977-bp deletion, from nucleotides 8483 to 13,459 (Schon et al., 1989), is one of the most frequently observed ΔmtDNA in human tissues, and thus it has been named "common"

deletion (Cortopassi et al., 1992; Lee et al., 1994; Schon et al., 1989). The 4977-bp common deletion occurs between two 13-bp direct repeats at positions 13,447–13,459 and 8469–8482 and removes all or part of the genes encoding four complex I subunits, one complex IV subunit, two complex V subunits and five tRNA genes.

It has been proposed that the loss of mtDNA-encoded proteins and tRNA genes required for protein synthesis leads to mitochondrial dysfunction and cell death (Cortopassi et al., 1992; Lee et al., 1994; Peng et al., 2006; Schon et al., 1989). However, as the mtDNA exists in multiple copies within cells, in order to cause mitochondrial and cellular dysfunction, a deleted form of mtDNA must accumulate above a critical threshold that varies from tissue to tissue, based on energy requirements (Cree et al., 2009; Taylor and Turnbull, 2005). Nonetheless, some experimental evidence indicates that mtDNA with large deletions accumulate faster compared with mtDNA with small deletions, likely due to replicative advantages, as they would replicate faster (Diaz et al., 2002; Fukui and Moraes, 2009). Nonetheless, accumulation of small ΔmtDNA is also associated with clinical syndromes (reviewed in (Pitceathly et al., 2012)).

The molecular mechanism leading to ΔmtDNA formation and accumulation in human cells are still poorly understood. There are two proposed mechanisms for the formation of ΔmtDNA: i) ΔmtDNA are generated during replication by slipped-strand homology in repetitive sequences, or ii) ΔmtDNA are generated during repair of DSBs. The asynchronous strand displacement replication of the mtDNA begins at the D-loop, at the origin of heavy strand (O_H). As replication of the heavy strand (H-strand) proceeds, the parental H-strand is displaced as a single-stranded "loop". When a single stranded repeat of the H-strand mispairs with newly exposed single stranded L-strand repeat, a downstream loop of H-strand is generated. The single stranded H-strand loop is susceptible to strand breaks and degradation. The free ends of the H-strand are then ligated and replication of the H-strand continues. When synthesis of H-strand reaches to the origin of light strand (O_L), replication of L-strand begins in the opposite direction until both strands have been fully replicated. Thus, asynchronous strand replication results in the synthesis of one wild type and one deleted mtDNA molecule. This model accounts for the generation of ΔmtDNA with direct repeats or homology-dependent recombination (Krishnan et al., 2008; Shoffner et al., 1989).

The DNA repair model proposes that deletions result from incomplete DSB repair or replication fork collapse at unrepaired strand-breaks. DSBs can be generated in mtDNA by several mechanisms, including ˙OH-mediated oxidation of two nucleotides closely positioned in opposite strands, known as clustered lesions. In nDNA of normal human fibroblasts, ionizing radiation-induced clustered DNA lesions are poorly repaired and result in chromosome breakage (Asaithamby et al., 2011). Krishnan et al. (2008) suggested that the high number of ΔmtDNA observed in substantia nigra neurons result from DSBs generated by ROS-induced clustered lesions or through increased replication stalling at unrepaired lesions (Krishnan et al., 2008). During repair of DSBs, single stranded regions are generated by exonuclease activity, which subsequently anneal with micro-domains containing direct repeats. This event could lead to mtDNA molecules with a deleted portion, but accounts only for homology-dependent recombination (Krishnan et al., 2008). On the other hand, Fukui and Moraes (2009) suggest that in post-mitotic tissues, DSBs in mtDNA could lead to both homology-dependent and -independent recombination. They proposed that NHEJ could play a role in homology-independent recombination. Exonucleases may degrade single strand ends generated by DSB, with the intermediates undergoing NHEJ in a stochastic manner, generating ΔmtDNA without the involvement of direct repeats. Thus, it is likely that the biochemical characterization of NHEJ mechanism in mitochondria will provide valuable evidence into the mechanism of ΔmtDNA generation (Fukui and Moraes, 2009).

The first evidences suggesting that ROS could cause mtDNA deletions showed a positive correlation between increase mtDNA deletions and markers of oxidative stress in normal aging (Wei et al., 1996), in an accelerated aging mouse model (Fujibayashi et al., 1998) and in a rat model of diabetes (Kakimoto et al., 2002). Experiments showing that mtDNA deletions, particularly the common deletion, accumulated in cells treated with t-butyl hydroperoxide (Dumont et al., 2000) or exposed to ionizing radiation (Prithivirajsingh et al., 2004) provided a direct link between oxidative stress and the induction of mtDNA deletions. In cells treated with UVA, the formation of common deletion was directly attributed to singlet oxygen, as less deletion was detected in cells irradiated in presence of singlet oxygen quenchers, and more deletions in cells irradiated in deuterium oxide (Berneburg et al., 1999).

The contribution of mtDNA deletions to oxidative stress-induced mitochondrial dysfunction has not been clearly understood yet. However, as mtDNA deletions have been proposed to drive the aging phenotype (Vermulst et al., 2008), dissecting the targets and molecular events that result in deletions after oxidatively induced mtDNA damage is an important challenge of the field.

7. Perspectives for mtDNA repair in health and disease

It is by now quite well documented that the mtDNA is a major target for damage, especially for oxidatively generated modifications, and that mtDNA damage may be extensive in some pathological conditions, like some types of cancer and neurodegeneration. Nonetheless, only few ODMs have been quantified in mtDNA, and in most cases only 8-oxoGua has been analyzed. On the other hand, mitochondrial dysfunction is observed in several other pathologies, and mtDNA damage and accumulation of mutations have not been comprehensively investigated in many of those, including in conditions that significantly impact public health, such as obesity, diabetes and cardiovascular disease. As methods to quantify these lesions become more sensitive, and ultrasensitive methods to detect other modifications, such as etheno- and propano-adducts (Garcia et al., 2010), become available, efforts should be made into this aspect, as this information could contribute a lot to understanding the role of these modifications in the molecular events that culminate in the clinical manifestation of the diseases. It is important to move on from the correlative studies to a more mechanistic approach, in which we also take into consideration that the functional consequences of each specific ODM may vary significantly, as it may vary according to cell type as well.

Similarly, our understanding of mtDNA repair pathways is still limited, as so far, only BER has been extensively characterized. Although the experimental evidence amounted so far indicate that a canonical nucleotide excision repair pathway probably does not exist in mitochondria, it is likely that other repair pathways operate in this organelle. In this regard, ours and other groups are working to better characterize repair of DSBs and mismatches/insertion deletions loops in these organelles. We need to gain a better understanding of how these pathways operate at the molecular level, and also of how their efficiency is regulated in normal conditions, and in response to different stresses. For instance, the peroxisome proliferator-activated receptor γ coactivator 1α (PGC-1α), which regulates mitochondrial biogenesis and energy metabolism, also controls the expression of ROS-detoxifying enzymes in response to oxidative stress (St-Pierre et al., 2006), suggesting that this signaling pathway may be involved in a general cellular stress response. If so, would that response include up-regulation of DNA repair in mitochondria? Likewise, it remains to be determined whether other signaling pathways that control cellular bioenergetics, such as the Akt/PI3K pathway, also modulate mitochondrial DNA repair. As we better understand how these molecular events are related, and what roles they have in cellular dysfunction, we will then be able to propose new, mechanism-based interventions for prevention and management of important diseases, with great impact in public health.

Acknowledgments

The authors thank Dr. Paolo Di Mascio, University of São Paulo, for the critical reading of this manuscript. MPM is supported by a Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) fellowship; NCS-P is supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP, processo 2010/51906-1), and is a member of the INCT de Processos Redox em Biomedicina–Redoxoma (FAPESP/CNPq/CAPES).

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at http://dx.doi.org/10.1016/j.mito.2014.03.007.

References

Aamann, M.D., Sorensen, M.M., Hvitby, C., Berquist, B.R., Muftuoglu, M., Tian, J., de Souza-Pinto, N.C., Scheibye-Knudsen, M., Wilson Iii, D.M., Stevnsner, T., Bohr, V.A., 2010. Cockayne syndrome group B protein promotes mitochondrial DNA stability by supporting the DNA repair association with the mitochondrial membrane. FASEB J. 24, 2334–2346.

Ahel, I., Rass, U., El-Khamisy, S.F., Katyal, S., Clements, P.M., McKinnon, P.J., Caldecott, K.W., West, S.C., 2006. The neurodegenerative disease protein aprataxin resolves abortive DNA ligation intermediates. Nature 443, 713–716.

Akbari, M., Visnes, T., Krokan, H.E., Otterlei, M., 2008. Mitochondrial base excision repair of uracil and AP sites takes place by single-nucleotide insertion and long-patch DNA synthesis. DNA Repair (Amst) 7, 605–616.

Alam, T.I., Kanki, T., Muta, T., Ukaji, K., Abe, Y., Nakayama, H., Takio, K., Hamasaki, N., Kang, D., 2003. Human mitochondrial DNA is packaged with TFAM. Nucleic Acids Res. 31, 1640–1645.

Anderson, S., Bankier, A.T., Barrell, B.G., de Bruijn, M.H., Coulson, A.R., Drouin, J., Eperon, I. C., Nierlich, D.P., Roe, B.A., Sanger, F., Schreier, P.H., Smith, A.J., Staden, R., Young, I.G., 1981. Sequence and organization of the human mitochondrial genome. Nature 290, 457–465.

Andersson, S.G., Kurland, C.G., 1999. Origins of mitochondria and hydrogenosomes. Curr. Opin. Microbiol. 2, 535–541.

Andrews, R.M., Kubacka, I., Chinnery, P.F., Lightowlers, R.N., Turnbull, D.M., Howell, N., 1999. Reanalysis and revision of the Cambridge reference sequence for human mitochondrial DNA. Nat. Genet. 23, 147.

Anson, R.M., Senturker, S., Dizdaroglu, M., Bohr, V.A., 1999. Measurement of oxidatively induced base lesions in liver from Wistar rats of different ages. Free Radic. Biol. Med. 27, 456–462.

Asaithamby, A., Hu, B., Chen, D.J., 2011. Unrepaired clustered DNA lesions induce chromosome breakage in human cells. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 108, 8293–8298.

Aydogan, B., Marshall, D.T., Swarts, S.G., Turner, J.E., Boone, A.J., Richards, N.G., Bolch, W.E., 2002. Site-specific OH attack to the sugar moiety of DNA: a comparison of experimental data and computational simulation. Radiat. Res. 157, 38–44.

Balakrishnan, L., Bambara, R.A., 2011. The changing view of Dna2. Cell Cycle 10, 2620–2621.

Balasubramanian, B., Pogozelski, W.K., Tullius, T.D., 1998. DNA strand breaking by the hydroxyl radical is governed by the accessible surface areas of the hydrogen atoms of the DNA backbone. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 95, 9738–9743.

Bandaru, V., Sunkara, S., Wallace, S.S., Bond, J.P., 2002. A novel human DNA glycosylase that removes oxidative DNA damage and is homologous to Escherichia coli endonuclease VIII. DNA Repair (Amst) 1, 517–529.

Basu, S., Bremer, E., Zhou, C., Bogenhagen, D.F., 2006. MiGenes: a searchable interspecies database of mitochondrial proteins curated using gene ontology annotation. Bioinformatics 22, 485–492.

Beesk, F., Dizdaroglu, M., Schulte-Frohlinde, D., von, S.C., 1979. Radiation-induced DNA strand breaks in deoxygenated aqueous solutions. The formation of altered sugars as end groups. Int. J. Radiat. Biol. Relat. Stud. Phys. Chem. Med. 36, 565–576.

Bender, A., Krishnan, K.J., Morris, C.M., Taylor, G.A., Reeve, A.K., Perry, R.H., Jaros, E., Hersheson, J.S., Betts, J., Klopstock, T., Taylor, R.W., Turnbull, D.M., 2006. High levels of mitochondrial DNA deletions in substantia nigra neurons in aging and Parkinson disease. Nat. Genet. 38, 515–517.

Berneburg, M., Grether-Beck, S., Kurten, V., Ruzicka, T., Briviba, K., Sies, H., Krutmann, J., 1999. Singlet oxygen mediates the UVA-induced generation of the photoaging-associated mitochondrial common deletion. J. Biol. Chem. 274, 15345–15349.

Blair, I.A., 2008. DNA adducts with lipid peroxidation products. J. Biol. Chem. 283, 15545–15549.

Boesch, P., Ibrahim, N., Dietrich, A., Lightowlers, R.N., 2010. Membrane association of mitochondrial DNA facilitates base excision repair in mammalian mitochondria. Nucleic Acids Res. 38, 1478–1488.

Bogenhagen, D.F., Wang, Y., Shen, E.L., Kobayashi, R., 2003. Protein components of mitochondrial DNA nucleoids in higher eukaryotes. Mol. Cell. Proteomics 2, 1205–1216.

Bonawitz, N.D., Clayton, D.A., Shadel, G.S., 2006. Initiation and beyond: multiple functions of the human mitochondrial transcription machinery. Mol. Cell 24, 813–825.

Breen, A.P., Murphy, J.A., 1995. Reactions of oxyl radicals with DNA. Free Radic. Biol. Med. 18, 1033–1077.

Bregeon, D., Doddridge, Z.A., You, H.J., Weiss, B., Doetsch, P.W., 2003. Transcriptional mutagenesis induced by uracil and 8-oxoguanine in Escherichia coli. Mol. Cell 12, 959–970.

Bregeon, D., Peignon, P.A., Sarasin, A., 2009. Transcriptional mutagenesis induced by 8-oxoguanine in mammalian cells. PLoS Genet. 5, e1000577.

Brooks, P.J., Wise, D.S., Berry, D.A., Kosmoski, J.V., Smerdon, M.J., Somers, R.L., Mackie, H., Spoonde, A.Y., Ackerman, E.J., Coleman, K., Tarone, R.E., Robbins, J.H., 2000. The oxidative DNA lesion 8,5′-(S)-cyclo-2′-deoxyadenosine is repaired by the nucleotide excision repair pathway and blocks gene expression in mammalian cells. J. Biol. Chem. 275, 22355–22362.

Cadet, J., Berger, M., Buchko, G.W., Joshi, P.C., Raoul, S., Ravanat, J.L., 1994. 2,2-Diamino-4-[(3,5-di-O-acetyl-2-deoxy-beta-D-erythro- pentofuranosyl)amino]-5-(2H)-oxazolone: a novel and predominant radical oxidation product of 3′,5′-Di-O-acetyl-2′-deoxyguanosine. J. Am. Chem. Soc. 116, 7403–7404.

Cadet, J., Douki, T., Ravanat, J.L., 2010a. Oxidatively generated base damage to cellular DNA. Free Radic. Biol. Med. 49, 9–21.

Cadet, J., Douki, T., Ravanat, J.L., 2010b. Oxidatively generated base damage to cellular DNA. Free Radic. Biol. Med. 49, 9–21.

Caldecott, K.W., 2008. Single-strand break repair and genetic disease. Nat. Rev. Genet. 9, 619–631.

Caldecott, K.W., McKeown, C.K., Tucker, J.D., Ljungquist, S., Thompson, L.H., 1994. An interaction between the mammalian DNA repair protein XRCC1 and DNA ligase III. Mol. Cell. Biol. 14, 68–76.

Campos, P.C., Silva, V.G., Furtado, C., Machado-Silva, A., Darocha, W.D., Peloso, E.F., Gadelha, F.R., Medeiros, M.H., Lana, G.C., Chen, Y., Barnes, R.L., Passos-Silva, D.G., McCulloch, R., Machado, C.R., Teixeira, S.M., 2011. *Trypanosoma cruzi* MSH2: functional analyses on different parasite strains provide evidences for a role on the oxidative stress response. Mol. Biochem. Parasitol. 176, 8–16.

Candeias, L.P., Steenken, S., 2000. Reaction of HO• with guanine derivatives in aqueous solution: formation of two different redox-active OH-adduct radicals and their unimolecular transformation reactions. Properties of G(-H)•. Chemistry 6, 475–484.

Canugovi, C., Maynard, S., Bayne, A.C., Sykora, P., Tian, J., de Souza-Pinto, N.C., Croteau, D.L., Bohr, V.A., 2010. The mitochondrial transcription factor A functions in mitochondrial base excision repair. DNA Repair (Amst) 9, 1080–1089.

Chalmers, A.J., 2004. Poly(ADP-ribose) polymerase-1 and ionizing radiation: sensor, signaller and therapeutic target. Clin. Oncol. (R.Coll.Radiol.) 16, 29–39.

Chandra, D., Singh, K.K., 2011. Genetic insights into OXPHOS defect and its role in cancer. Biochim. Biophys. Acta 1807, 620–625.

Chatgilialoglu, C., D'Angelantonio, M., Guerra, M., Kaloudis, P., Mulazzani, Q.G., 2009. A reevaluation of the ambident reactivity of the guanine moiety towards hydroxyl radicals. Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 48, 2214–2217.

Chatterjee, A., Mambo, E., Sidransky, D., 2006. Mitochondrial DNA mutations in human cancer. Oncogene 25, 4663–4674.

Chattopadhyay, R., Wiederhold, L., Szczesny, B., Boldogh, I., Hazra, T.K., Izumi, T., Mitra, S., 2006. Identification and characterization of mitochondrial abasic (AP)-endonuclease in mammalian cells. Nucleic Acids Res. 34, 2067–2076.

Chen, D., Cao, G., Hastings, T., Feng, Y., Pei, W., O'Horo, C., Chen, J., 2002. Age-dependent decline of DNA repair activity for oxidative lesions in rat brain mitochondria. J. Neurochem. 81, 1273–1284.

Chen, L.J., Gao, Y.Q., Li, X.J., Shen, D.H., Sun, F.Y., 2005a. Melatonin protects against MPTP/MPP+-induced mitochondrial DNA oxidative damage in vivo and in vitro. J. Pineal Res. 39, 34–42.

Chen, X.J., Wang, X., Butow, R.A., 2007. Yeast aconitase binds and provides metabolically coupled protection to mitochondrial DNA. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 104, 13738–13743.

Chen, X.J., Wang, X., Kaufman, B.A., Butow, R.A., 2005b. Aconitase couples metabolic regulation to mitochondrial DNA maintenance. Science 307, 714–717.

Chi, N.W., Kolodner, R.D., 1994a. Purification and characterization of MSH1, a yeast mitochondrial protein that binds to DNA mismatches. J. Biol. Chem. 269, 29984–29992.

Chi, N.W., Kolodner, R.D., 1994b. The effect of DNA mismatches on the ATPase activity of MSH1, a protein in yeast mitochondria that recognizes DNA mismatches. J. Biol. Chem. 269, 29993–29997.

Chung, F.L., Chen, H.J., Nath, R.G., 1996. Lipid peroxidation as a potential endogenous source for the formation of exocyclic DNA adducts. Carcinogenesis 17, 2105–2111.

Chung, F.L., Young, R., Hecht, S.S., 1989. Detection of cyclic 1, N2-propanodeoxyguanosine adducts in DNA of rats treated with N-nitrosopyrrolidine and mice treated with crotonaldehyde. Carcinogenesis 10, 1291–1297.

Cline, S.D., Lodeiro, M.F., Marnett, L.J., Cameron, C.E., Arnold, J.J., 2010. Arrest of human mitochondrial RNA polymerase transcription by the biological aldehyde adduct of DNA, M1dG. Nucleic Acids Res. 38, 7546–7557.

Coffey, G., Campbell, C., 2000. An alternate form of Ku80 is required for DNA end-binding activity in mammalian mitochondria. Nucleic Acids Res. 28, 3793–3800.

Copeland, W.C., Longley, M.J., 2003. DNA polymerase gamma in mitochondrial DNA replication and repair. ScientificWorldJournal 3, 34–44.

Cortopassi, G.A., Shibata, D., Soong, N.W., Arnheim, N., 1992. A pattern of accumulation of a somatic deletion of mitochondrial DNA in aging human tissues. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 89, 7370–7374.

Cree, L.M., Samuels, D.C., Chinnery, P.F., 2009. The inheritance of pathogenic mitochondrial DNA mutations. Biochim. Biophys. Acta 1792, 1097–1102.

Das, A., Wiederhold, L., Leppard, J.B., Kedar, P., Prasad, R., Wang, H., Boldogh, I., Karimi-Busheri, F., Weinfeld, M., Tomkinson, A.E., Wilson, S.H., Mitra, S., Hazra, T.K., 2006. NEIL2-initiated, APE-independent repair of oxidized bases in DNA: evidence for a repair complex in human cells. DNA Repair (Amst) 5, 1439–1448.

de Souza-Pinto, N.C., Eide, L., Hogue, B.A., Thybo, T., Stevnsner, T., Seeberg, E., Klungland, A., Bohr, V.A., 2001a. 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. 61, 5378–5381.

de Souza-Pinto, N.C., Hogue, B.A., Bohr, V.A., 2001b. DNA repair and aging in mouse liver: 8-oxodG glycosylase activity increase in mitochondrial but not in nuclear extracts. Free Radic. Biol. Med. 30, 916–923.

de Souza-Pinto, N.C., Mason, P.A., Hashiguchi, K., Weissman, L., Tian, J., Guay, D., Lebel, M., Stevnsner, T.V., Rasmussen, L.J., Bohr, V.A., 2009a. Novel DNA mismatch-repair activity involving YB-1 in human mitochondria. DNA Repair (Amst) 8, 704–719.

de Souza-Pinto, N.C., Maynard, S., Hashiguchi, K., Hu, J., Muftuoglu, M., Bohr, V.A., 2009b. The recombination protein RAD52 cooperates with the excision repair protein OGG1 for the repair of oxidative lesions in mammalian cells. Mol. Cell. Biol. 29, 4441–4454.

De, B.R., Van, L.N., 2004. Endogenous DNA damage in humans: a review of quantitative data. Mutagenesis 19, 169–185.

Dedon, P.C., Plastaras, J.P., Rouzer, C.A., Marnett, L.J., 1998. Indirect mutagenesis by oxidative DNA damage: formation of the pyrimidopurinone adduct of deoxyguanosine by base propenal. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 95, 11113–11116.

deRojas-Walker, T., Tamir, S., Ji, H., Wishnok, J.S., Tannenbaum, S.R., 1995. Nitric oxide induces oxidative damage in addition to deamination in macrophage DNA. Chem. Res. Toxicol. 8, 473–477.

Dianov, G.L., Souza-Pinto, N., Nyaga, S.G., Thybo, T., Stevnsner, T., Bohr, V.A., 2001. Base excision repair in nuclear and mitochondrial DNA. Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol. 68, 285–297.

Diaz, F., Bayona-Bafaluy, M.P., Rana, M., Mora, M., Hao, H., Moraes, C.T., 2002. Human mitochondrial DNA with large deletions repopulates organelles faster than full-length genomes under relaxed copy number control. Nucleic Acids Res. 30, 4626–4633.

Dizdaroglu, M., 1986. Free-radical-induced formation of an 8,5′-cyclo-2′-deoxyguanosine moiety in deoxyribonucleic acid. Biochem. J. 238, 247–254.

Dizdaroglu, M., Dirksen, M.L., Jiang, H.X., Robbins, J.H., 1987. Ionizing-radiation-induced damage in the DNA of cultured human cells. Identification of 8,5-cyclo-2-deoxyguanosine. Biochem. J. 241, 929–932.

Dizdaroglu, M., Jaruga, P., Birincioglu, M., Rodriguez, H., 2002. Free radical-induced damage to DNA: mechanisms and measurement. Free Radic. Biol. Med. 32, 1102–1115.

Dizdaroglu, M., Karakaya, A., Jaruga, P., Slupphaug, G., Krokan, H.E., 1996. Novel activities of human uracil DNA N-glycosylase for cytosine-derived products of oxidative DNA damage. Nucleic Acids Res. 24, 418–422.

Dizdaroglu, M., Kirkali, G., Jaruga, P., 2008. Formamidopyrimidines in DNA: mechanisms of formation, repair, and biological effects. Free Radic. Biol. Med. 45, 1610–1621.

Dizdaroglu, M., Schulte-Frohlinde, D., von, S.C., 1975a. Radiation chemistry of DNA, II. Strand breaks and sugar release by gamma-irradiation of DNA in aqueous solution. The effect of oxygen. Z. Naturforsch. C 30, 826–828.

Dizdaroglu, M., Schulte-Frohlinde, D., von, S.C., 1977. gamma-Radiolyses of DNA in oxygenated aqueous solution. Structure of an alkali-labile site. Z. Naturforsch. C 32, 1021–1022.

Dizdaroglu, M., von, S.C., Schulte-Frohlinde, D., 1975b. Letter: strand breaks and sugar release by gamma-irradiation of DNA in aqueous solution. J. Am. Chem. Soc. 97, 2277–2278.

Dumont, P., Burton, M., Chen, Q.M., Gonos, E.S., Frippiat, C., Mazarati, J.B., Eliaers, F., Remacle, J., Toussaint, O., 2000. Induction of replicative senescence biomarkers by sublethal oxidative stresses in normal human fibroblast. Free Radic. Biol. Med. 28, 361–373.

Duxin, J.P., Dao, B., Martinsson, P., Rajala, N., Guittat, L., Campbell, J.L., Spelbrink, J.N., Stewart, S.A., 2009. Human Dna2 is a nuclear and mitochondrial DNA maintenance protein. Mol. Cell. Biol. 29, 4274–4282.

Ekert, B., 1962. Effect of gamma-rays on thymine in de-aerated aqueous solutions. Nature 194, 278–279.

Esterbauer, H., Eckl, P., Ortner, A., 1990. Possible mutagens derived from lipids and lipid precursors. Mutat. Res. 238, 223–233.

Evans, M.D., Dizdaroglu, M., Cooke, M.S., 2004. Oxidative DNA damage and disease: induction, repair and significance. Mutat. Res. 567, 1–61.

Falkenberg, M., Larsson, N.G., Gustafsson, C.M., 2007. DNA replication and transcription in mammalian mitochondria. Annu. Rev. Biochem. 76, 679–699.

Fernandez-Checa, J.C., Fernandez, A., Morales, A., Mari, M., Garcia-Ruiz, C., Colell, A., 2010. Oxidative stress and altered mitochondrial function in neurodegenerative diseases: lessons from mouse models. CNS.Neurol.Disord.Drug. Targets 9, 439–454.

Fraga, C.G., Shigenaga, M.K., Park, J.W., Degan, P., Ames, B.N., 1990. Oxidative damage to DNA during aging: 8-hydroxy-2′-deoxyguanosine in rat organ DNA and urine. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 87, 4533–4537.

Fujibayashi, Y., Yamamoto, S., Waki, A., Konishi, J., Yonekura, Y., 1998. Increased mitochondrial DNA deletion in the brain of SAMP8, a mouse model for spontaneous oxidative stress brain. Neurosci. Lett. 254, 109–112.

Fukui, H., Moraes, C.T., 2009. Mechanisms of formation and accumulation of mitochondrial DNA deletions in aging neurons. Hum. Mol. Genet. 18, 1028–1036.

Gao, Y., Katyal, S., Lee, Y., Zhao, J., Rehg, J.E., Russell, H.R., McKinnon, P.J., 2011. DNA ligase III is critical for mtDNA integrity but not Xrcc1-mediated nuclear DNA repair. Nature 471, 240–244.

Garcia, C.C., Angeli, J.P., Freitas, F.P., Gomes, O.F., de Oliveira, T.F., Loureiro, A.P., Di Mascio P., Medeiros, M.H., 2011. [13C2]-Acetaldehyde promotes unequivocal formation of 1, N2-propano-2′-deoxyguanosine in human cells. J. Am. Chem. Soc. 133, 9140–9143.

Garcia, C.C., Freitas, F.P., Di Mascio, P., Medeiros, M.H., 2010. Ultrasensitive simultaneous quantification of 1, N2-etheno-2′-deoxyguanosine and 1, N2-propano-2′-deoxyguanosine in DNA by an online liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry assay. Chem. Res. Toxicol. 23, 1245–1255.

Gilkerson, R.W., 2009. Mitochondrial DNA nucleoids determine mitochondrial genetics and dysfunction. Int. J. Biochem. Cell Biol. 41, 1899–1906.

Gilkerson, R.W., Schon, E.A., Hernandez, E., Davidson, M.M., 2008. Mitochondrial nucleoids maintain genetic autonomy but allow for functional complementation. J. Cell Biol. 181, 1117–1128.

Gray, M.W., Burger, G., Lang, B.F., 2001. The origin and early evolution of mitochondria. Genome Biol. 2 (REVIEWS1018).

Graziewicz, M.A., Bienstock, R.J., Copeland, W.C., 2007. The DNA polymerase gamma Y955C disease variant associated with PEO and parkinsonism mediates the incorporation and translesion synthesis opposite 7,8-dihydro-8-oxo-2′-deoxyguanosine. Hum. Mol. Genet. 16, 2729–2739.

Grin, I.R., Dianov, G.L., Zharkov, D.O., 2010. The role of mammalian NEIL1 protein in the repair of 8-oxo-7,8-dihydroadenine in DNA. FEBS Lett. 584, 1553–1557.

Grin, I.R., Zharkov, D.O., 2011. Eukaryotic endonuclease VIII-like proteins: new components of the base excision DNA repair system. Biochemistry (Mosc) 76, 80–93.

Gupta, S., Yel, L., Kim, D., Kim, C., Chiplunkar, S., Gollapudi, S., 2003. Arsenic trioxide induces apoptosis in peripheral blood T lymphocyte subsets by inducing oxidative stress: a role of Bcl-2. Mol. Cancer Ther. 2, 711–719.

Gurzov, E.N., Eizirik, D.L., 2011. Bcl-2 proteins in diabetes: mitochondrial pathways of beta-cell death and dysfunction. Trends Cell Biol. 21, 424–431.

Habraken, Y., Verly, W.G., 1983. The DNA 3′-phosphatase and 5′-hydroxyl kinase of rat liver chromatin. FEBS Lett. 160, 46–50.

Hadi, M.Z., Ginalski, K., Nguyen, L.H., Wilson III, D.M., 2002. Determinants in nuclease specificity of Ape1 and Ape2, human homologues of *Escherichia coli* exonuclease III. J. Mol. Biol. 316, 853–866.

Halestrap, A.P., Pasdois, P., 2009. The role of the mitochondrial permeability transition pore in heart disease. Biochim. Biophys. Acta 1787, 1402–1415.

Hamilton, M.L., Guo, Z., Fuller, C.D., Van, R.H., Ward, W.F., Austad, S.N., Troyer, D.A., Thompson, I., Richardson, A., 2001a. A reliable assessment of 8-oxo-2-deoxyguanosine levels in nuclear and mitochondrial DNA using the sodium iodide method to isolate DNA. Nucleic Acids Res. 29, 2117–2126.

Hamilton, M.L., Van, R.H., Drake, J.A., Yang, H., Guo, Z.M., Kewitt, K., Walter, C.A., Richardson, A., 2001b. Does oxidative damage to DNA increase with age? Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 98, 10469–10474.

Hanawalt, P.C., Spivak, G., 2008. Transcription-coupled DNA repair: two decades of progress and surprises. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 9, 958–970.

Hanes, J.W., Thal, D.M., Johnson, K.A., 2006. Incorporation and replication of 8-oxo-deoxyguanosine by the human mitochondrial DNA polymerase. J. Biol. Chem. 281, 36241–36248.

Hashiguchi, K., Stuart, J.A., de Souza-Pinto, N.C., Bohr, V.A., 2004. The C-terminal alpha0 helix of human Ogg1 is essential for 8-oxoguanine DNA glycosylase activity: the mitochondrial beta-Ogg1 lacks this domain and does not have glycosylase activity. Nucleic Acids Res. 32, 5596–5608.

Hazra, T.K., Izumi, T., Boldogh, I., Imhoff, B., Kow, Y.W., Jaruga, P., Dizdaroglu, M., Mitra, S., 2002. Identification and characterization of a human DNA glycosylase for repair of modified bases in oxidatively damaged DNA. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 99, 3523–3528.

Hecht, S.S., Upadhyaya, P., Wang, M., 2011. Evolution of research on the DNA adduct chemistry of N-nitrosopyrrolidine and related aldehydes. Chem. Res. Toxicol. 24, 781–790.

Hegler, J., Bittner, D., Boiteux, S., Epe, B., 1993. Quantification of oxidative DNA modifications in mitochondria. Carcinogenesis 14, 2309–2312.

Henner, W.D., Grunberg, S.M., Haseltine, W.A., 1983a. Enzyme action at 3′ termini of ionizing radiation-induced DNA strand breaks. J. Biol. Chem. 258, 15198–15205.

Henner, W.D., Rodriguez, L.O., Hecht, S.M., Haseltine, W.A., 1983b. gamma Ray induced deoxyribonucleic acid strand breaks. 3′ Glycolate termini. J. Biol. Chem. 258, 711–713.

Higuchi, Y., Linn, S., 1995. Purification of all forms of HeLa cell mitochondrial DNA and assessment of damage to it caused by hydrogen peroxide treatment of mitochondria or cells. J. Biol. Chem. 270, 7950–7956.

Hill, J.W., Hazra, T.K., Izumi, T., Mitra, S., 2001. Stimulation of human 8-oxoguanine-DNA glycosylase by AP-endonuclease: potential coordination of the initial steps in base excision repair. Nucleic Acids Res. 29, 430–438.

Holt, I.J., Harding, A.E., Morgan-Hughes, J.A., 1988. Deletions of muscle mitochondrial DNA in patients with mitochondrial myopathies. Nature 331, 717–719.

Hu, J., de Souza-Pinto, N.C., Haraguchi, K., Hogue, B.A., Jaruga, P., Greenberg, M.M., Dizdaroglu, M., Bohr, V.A., 2005. Repair of formamidopyrimidines in DNA involves different glycosylases: role of the OGG1, NTH1, and NEIL1 enzymes. J. Biol. Chem. 280, 40544–40551.

Hu, J., Dong, L., Outten, C.E., 2008. The redox environment in the mitochondrial intermembrane space is maintained separately from the cytosol and matrix. J. Biol. Chem. 283, 29126–29134.

Hudson, E.K., Hogue, B.A., Souza-Pinto, N.C., Croteau, D.L., Anson, R.M., Bohr, V.A., Hansford, R.G., 1998. Age-associated change in mitochondrial DNA damage. Free Radic. Res. 29, 573–579.

Ide, T., Tsutsui, H., Hayashidani, S., Kang, D., Suematsu, N., Nakamura, K., Utsumi, H., Hamasaki, N., Takeshita, A., 2001. Mitochondrial DNA damage and dysfunction associated with oxidative stress in failing hearts after myocardial infarction. Circ. Res. 88, 529–535.

Imam, S.Z., Karahalil, B., Hogue, B.A., Souza-Pinto, N.C., Bohr, V.A., 2006. Mitochondrial and nuclear DNA-repair capacity of various brain regions in mouse is altered in an age-dependent manner. Neurobiol. Aging 27, 1129–1136.

Imanishi, H., Hattori, K., Wada, R., Ishikawa, K., Fukuda, S., Takenaga, K., Nakada, K., Hayashi, J., 2011. Mitochondrial DNA mutations regulate metastasis of human breast cancer cells. PLoS ONE 6, e23401.

Isildar, M., Schuchmann, M.N., Schulte-Frohlinde, D., von, S.C., 1981. gamma-Radiolysis of DNA in oxygenated aqueous solutions: alterations at the sugar moiety. Int. J. Radiat. Biol. Relat. Stud. Phys. Chem. Med. 40, 347–354.

Jandova, J., Shi, M., Norman, K.G., Stricklin, G.P., Sligh, J.E., 2012. Somatic alterations in mitochondrial DNA produce changes in cell growth and metabolism supporting a tumorigenic phenotype. Biochim. Biophys. Acta 1822, 293–300.

Janicek, M.F., Haseltine, W.A., Henner, W.D., 1985. Malondialdehyde precursors in gamma-irradiated DNA, deoxynucleotides and deoxynucleosides. Nucleic Acids Res. 13, 9011–9029.

Jaruga, P., Xiao, Y., Vartanian, V., Lloyd, R.S., Dizdaroglu, M., 2010. Evidence for the involvement of DNA repair enzyme NEIL1 in nucleotide excision repair of (5'R)- and (5'S)-8,5'-cyclo-2'-deoxyadenosines. Biochemistry 49, 1053–1055.

Jung, K.Y., Kodama, T., Greenberg, M.M., 2011. Repair of the major lesion resulting from C5'-oxidation of DNA. Biochemistry 50, 6273–6279.

Kakimoto, M., Inoguchi, T., Sonta, T., Yu, H.Y., Imamura, M., Etoh, T., Hashimoto, T., Nawata, H., 2002. Accumulation of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine and mitochondrial DNA deletion in kidney of diabetic rats. Diabetes 51, 1588–1595.

Kalam, M.A., Haraguchi, K., Chandani, S., Loechler, E.L., Moriya, M., Greenberg, M.M., Basu, A.K., 2006. Genetic effects of oxidative DNA damages: comparative mutagenesis of the imidazole ring-opened formamidopyrimidines (Fapy lesions) and 8-oxo-purines in simian kidney cells. Nucleic Acids Res. 34, 2305–2315.

Kalifa, L., Beutner, G., Phadnis, N., Sheu, S.S., Sia, E.A., 2009. Evidence for a role of FEN1 in maintaining mitochondrial DNA integrity. DNA Repair (Amst) 8, 1242–1249.

Kamenisch, Y., Fousteri, M., Knoch, J., von Thaler, A.K., Fehrenbacher, B., Kato, H., Becker, T., Dolle, M.E., Kuiper, R., Majora, M., Schaller, M., van der Horst, G.T., van, S.H., Rocken, M., Rapaport, D., Krutmann, J., Mullenders, L.H., Berneburg, M., 2010. Proteins of nucleotide and base excision repair pathways interact in mitochondria to protect from loss of subcutaneous fat, a hallmark of aging. J. Exp. Med. 207, 379–390.

Kang, D., Nishida, J., Iyama, A., Nakabeppu, Y., Furuichi, M., Fujiwara, T., Sekiguchi, M., Takeshige, K., 1995. Intracellular localization of 8-oxo-dGTPase in human cells, with special reference to the role of the enzyme in mitochondria. J. Biol. Chem. 270, 14659–14665.

Kaniak, A., Dzierzbicki, P., Rogowska, A.T., Malc, E., Fikus, M., Ciesla, Z., 2009. Msh1p counteracts oxidative lesion-induced instability of mtDNA and stimulates mitochondrial recombination in *Saccharomyces cerevisiae*. DNA Repair (Amst) 8, 318–329.

Karahalil, B., Bohr, V.A., de Souza-Pinto, N.C., 2010. Base excision repair activities differ in human lung cancer cells and corresponding normal controls. Anticancer Res. 30, 4963–4971.

Karahalil, B., Hogue, B.A., de Souza-Pinto, N.C., Bohr, V.A., 2002. Base excision repair capacity in mitochondria and nuclei: tissue-specific variations. FASEB J. 16, 1895–1902.

Kaufman, B.A., Durisic, N., Mativetsky, J.M., Costantino, S., Hancock, M.A., Grutter, P., Shoubridge, E.A., 2007. The mitochondrial transcription factor TFAM coordinates the assembly of multiple DNA molecules into nucleoid-like structures. Mol. Biol. Cell 18, 3225–3236.

Keck, K., 1968. Formation of cyclonucleotides during irradiation of aqueous solutions of purine nucleotides. Z. Naturforsch. B 23, 1034–1043.

Kennedy, L.J., Moore J.t., K., Caulfield, J.L., Tannenbaum, S.R., Dedon, P.C., 1997. Quantitation of 8-oxoguanine and strand breaks produced by four oxidizing agents. Chem. Res. Toxicol. 10, 386–392.

Kikuchi, H., Furuta, A., Nishioka, K., Suzuki, S.O., Nakabeppu, Y., Iwaki, T., 2002. Impairment of mitochondrial DNA repair enzymes against accumulation of 8-oxo-guanine in the spinal motor neurons of amyotrophic lateral sclerosis. Acta Neuropathol. 103, 408–414.

Kirkali, G., de Souza-Pinto, N.C., Jaruga, P., Bohr, V.A., Dizdaroglu, M., 2009. Accumulation of (5'S)-8,5'-cyclo-2'-deoxyadenosine in organs of Cockayne syndrome complementation group B gene knockout mice. DNA Repair (Amst) 8, 274–278.

Klungland, A., Lindahl, T., 1997. Second pathway for completion of human DNA base excision-repair: reconstitution with purified proteins and requirement for DNase IV (FEN1). EMBO J. 16, 3341–3348.

Kowaltowski, A.J., de Souza-Pinto, N.C., Castilho, R.F., Vercesi, A.E., 2009. Mitochondria and reactive oxygen species. Free Radic. Biol. Med. 47, 333–343.

Kraytsberg, Y., Kudryavtseva, E., McKee, A.C., Geula, C., Kowall, N.W., Khrapko, K., 2006. Mitochondrial DNA deletions are abundant and cause functional impairment in aged human substantia nigra neurons. Nat. Genet. 38, 518–520.

Krishnan, K.J., Reeve, A.K., Samuels, D.C., Chinnery, P.F., Blackwood, J.K., Taylor, R.W., Wanrooij, S., Spelbrink, J.N., Lightowlers, R.N., Turnbull, D.M., 2008. What causes mitochondrial DNA deletions in human cells? Nat. Genet. 40, 275–279.

Kubo, T., Newton, K.J., 2008. Angiosperm mitochondrial genomes and mutations. Mitochondrion 8, 5–14.

Kukat, C., Wurm, C.A., Spahr, H., Falkenberg, M., Larsson, N.G., Jakobs, S., 2011. Super-resolution microscopy reveals that mammalian mitochondrial nucleoids have a uniform size and frequently contain a single copy of mtDNA. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. A. 108, 13534–13539.

Kunkel, T.A., Erie, D.A., 2005. DNA mismatch repair. Annu. Rev. Biochem. 74, 681–710.

Lai, Y., Chen, Y., Watkins, S.C., Nathaniel, P.D., Guo, F., Kochanek, P.M., Jenkins, L.W., Szabo, C., Clark, R.S., 2008. Identification of poly-ADP-ribosylated mitochondrial proteins after traumatic brain injury. J. Neurochem. 104, 1700–1711.

Lakshmipathy, U., Campbell, C., 1999a. Double strand break rejoining by mammalian mitochondrial extracts. Nucleic Acids Res. 27, 1198–1204.

Lakshmipathy, U., Campbell, C., 1999b. The human DNA ligase III gene encodes nuclear and mitochondrial proteins. Mol. Cell. Biol. 19, 3869–3876.

Lakshmipathy, U., Campbell, C., 2000. Mitochondrial DNA ligase III function is independent of Xrcc1. Nucleic Acids Res. 28, 3880–3886.

Lang, B.F., Burger, G., O'Kelly, C.J., Cedergren, R., Golding, G.B., Lemieux, C., Sankoff, D., Turmel, M., Gray, M.W., 1997. An ancestral mitochondrial DNA resembling a eubacterial genome in miniature. Nature 387, 493–497.

Lee, H.C., Pang, C.Y., Hsu, H.S., Wei, Y.H., 1994. Differential accumulations of 4,977 bp deletion in mitochondrial DNA of various tissues in human ageing. Biochim. Biophys. Acta 1226, 37–43.

Lee, H.M., Wang, C., Hu, Z., Greeley, G.H., Makalowski, W., Hellmich, H.L., Englander, E.W., 2002. Hypoxia induces mitochondrial DNA damage and stimulates expression of a DNA repair enzyme, the *Escherichia coli* MutY DNA glycosylase homolog (MYH), in vivo, in the rat brain. J. Neurochem. 80, 928–937.

Lee, M., Hyun, D., Jenner, P., Halliwell, B., 2001. Effect of overexpression of wild-type and mutant Cu/Zn-superoxide dismutases on oxidative damage and antioxidant defences: relevance to Down's syndrome and familial amyotrophic lateral sclerosis. J. Neurochem. 76, 957–965.

Legros, F., Malka, F., Frachon, P., Lombes, A., Rojo, M., 2004. Organization and dynamics of human mitochondrial DNA. J. Cell Sci. 117, 2653–2662.

Lemieux, H., Hoppel, C.L., 2009. Mitochondria in the human heart. J. Bioenerg. Biomembr. 41, 99–106.

Lin, M.T., Beal, M.F., 2006. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurodegenerative diseases. Nature 443, 787–795.

Lindahl, T., 1993. Instability and decay of the primary structure of DNA. Nature 362, 709–715.

Liu, P., Qian, L., Sung, J.S., de Souza-Pinto, N.C., Zheng, L., Bogenhagen, D.F., Bohr, V.A., Wilson III, D.M., Shen, B., Demple, B., 2008. Removal of oxidative DNA damage via FEN1-dependent long-patch base excision repair in human cell mitochondria. Mol. Cell. Biol. 28, 4975–4987.

Longley, M.J., Prasad, R., Srivastava, D.K., Wilson, S.H., Copeland, W.C., 1998. Identification of 5'-deoxyribose phosphate lyase activity in human DNA polymerase gamma and its role in mitochondrial base excision repair in vitro. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. A. 95, 12244–12248.

Luna, L., Bjoras, M., Hoff, E., Rognes, T., Seeberg, E., 2000. Cell-cycle regulation, intracellular sorting and induced overexpression of the human NTH1 DNA glycosylase involved in removal of formamidopyrimidine residues from DNA. Mutat. Res. 460, 95–104.

Ma, W., Resnick, M.A., Gordenin, D.A., 2008. Apn1 and Apn2 endonucleases prevent accumulation of repair-associated DNA breaks in budding yeast as revealed by direct chromosomal analysis. Nucleic Acids Res. 36, 1836–1846.

Mambo, E., Chatterjee, A., de Souza-Pinto, N.C., Mayard, S., Hogue, B.A., Hoque, M.O., Dizdaroglu, M., Bohr, V.A., Sidransky, D., 2005. Oxidized guanine lesions and hOgg1 activity in lung cancer. Oncogene 24, 4496–4508.

Mambo, E., Nyaga, S.G., Bohr, V.A., Evans, M.K., 2002. Defective repair of 8-hydroxyguanine in mitochondria of MCF-7 and MDA-MB-468 human breast cancer cell lines. Cancer Res. 62, 1349–1355.

Mandal, S.M., Hegde, M.L., Chatterjee, A., Hegde, P.M., Szczesny, B., Banerjee, D., Boldogh, I., Gao, R., Falkenberg, M., Gustafsson, C.M., Sarkar, P.S., Hazra, T.K., 2012. Role of human DNA glycosylase Nei-like 2 (NEIL2) and single strand break repair protein polynucleotide kinase 3'-phosphatase in maintenance of mitochondrial genome. J. Biol. Chem. 287, 2819–2829.

Mao, H., Schnetz-Boutaud, N.C., Weisenseel, J.P., Marnett, L.J., Stone, M.P., 1999. Duplex DNA catalyzes the chemical rearrangement of a malondialdehyde deoxyguanosine adduct. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 96, 6615–6620.

Martin, S.A., McCarthy, A., Barber, L.J., Burgess, D.J., Parry, S., Lord, C.J., Ashworth, A., 2009. Methotrexate induces oxidative DNA damage and is selectively lethal to tumour cells with defects in the DNA mismatch repair gene MSH2. EMBO Mol. Med. 1, 323–337.

Mason, P.A., Matheson, E.C., Hall, A.G., Lightowlers, R.N., 2003. Mismatch repair activity in mammalian mitochondria. Nucleic Acids Res. 31, 1052–1058.

Masuda, T., Shinohara, H., Eda, M., Kondo, M., 1980. Reactivity of nucleotides and polynucleotides toward hydroxyl radical in aqueous solution. J. Radiat. Res. 21, 173–179.

Matter, B., Malejka-Giganti, D., Csallany, A.S., Tretyakova, N., 2006. Quantitative analysis of the oxidative DNA lesion, 2,2-diamino-4-(2-deoxy-beta-D-erythro-pentofuranosyl) amino]-5(2H)-oxazolon e (oxazolone), in vitro and in vivo by isotope dilution-capillary HPLC-ESI-MS/MS. Nucleic Acids Res. 34, 5449–5460.

McKinnon, P.J., Caldecott, K.W., 2007. DNA strand break repair and human genetic disease. Annu. Rev. Genomics Hum. Genet. 8, 37–55.

Michaels, M.L., Pham, L., Nghiem, Y., Cruz, C., Miller, J.H., 1990. MutY, an adenine glycosylase active on G-A mispairs, has homology to endonuclease III. Nucleic Acids Res. 18, 3841–3845.

Michikawa, Y., Mazzucchelli, F., Bresolin, N., Scarlato, G., Attardi, G., 1999. Aging-dependent large accumulation of point mutations in the human mtDNA control region for replication. Science 286, 774–779.

Miller, J., Miaskiewicz, K., Osman, R., 1994. Structure–function studies of DNA damage using ab initio quantum mechanics and molecular dynamics simulation. Ann. N. Y. Acad. Sci. 726, 71–91.

Moraes, C.T., DiMauro, S., Zeviani, M., Lombes, A., Shanske, S., Miranda, A.F., Nakase, H., Bonilla, E., Werneck, L.C., Servidei, S., Nonaka, Ikuya, Koga, Yasutoshi, Spiro, Alfred J., Brownell, A. Keith W., Schmidt, Beny, Schotland, Donald L., Zupanc, Mary, DeVivo, Darryl C., Schon, Eric A., Rowland, Lewis P., 1989. Mitochondrial DNA deletions in progressive external ophthalmoplegia and Kearns–Sayre syndrome. N. Engl. J. Med. 320, 1293–1299.

Muftuoglu, M., Souza-Pinto, N.C., Dogan, A., Aamann, M., Stevnsner, T., Rybanska, I., Kirkali, G., Dizdaroglu, M., Bohr, V.A., 2009. Cockayne syndrome group B protein stimulates repair of formamidopyrimidines by NEIL1 DNA glycosylase. J. Biol. Chem. 284, 9270–9279.

Nakabeppu, Y., 2001. Regulation of intracellular localization of human MTH1, OGG1, and MYH proteins for repair of oxidative DNA damage. Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol. 68, 75–94.

Nakabeppu, Y., Oka, S., Sheng, Z., Tsuchimoto, D., Sakumi, K., 2010. Programmed cell death triggered by nucleotide pool damage and its prevention by MutT homolog-1 (MTH1) with oxidized purine nucleoside triphosphatase. Mutat. Res. 703, 51–58.

Ngo, H.B., Kaiser, J.T., Chan, D.C., 2011. The mitochondrial transcription and packaging factor Tfam imposes a U-turn on mitochondrial DNA. Nat. Struct. Mol. Biol. 18, 1290–1296.

Niles, J.C., Wishnok, J.S., Tannenbaum, S.R., 2001. A novel nitroimidazole compound formed during the reaction of peroxynitrite with 2',3',5'-tri-O-acetyl-guanosine. J. Am. Chem. Soc. 123, 12147–12151.

Niles, J.C., Wishnok, J.S., Tannenbaum, S.R., 2006. Peroxynitrite-induced oxidation and nitration products of guanine and 8-oxoguanine: structures and mechanisms of product formation. Nitric Oxide 14, 109–121.

Nilsen, H., Otterlei, M., Haug, T., Solum, K., Nagelhus, T.A., Skorpen, F., Krokan, H.E., 1997. Nuclear and mitochondrial uracil-DNA glycosylases are generated by alternative splicing and transcription from different positions in the UNG gene. Nucleic Acids Res. 25, 750–755.

Nishioka, K., Ohtsubo, T., Oda, H., Fujiwara, T., Kang, D., Sugimachi, K., Nakabeppu, Y., 1999. Expression and differential intracellular localization of two major forms of human 8-oxoguanine DNA glycosylase encoded by alternatively spliced OGG1 mRNAs. Mol. Biol. Cell 10, 1637–1652.

Ohtsubo, T., Nishioka, K., Imaiso, Y., Iwai, S., Shimokawa, H., Oda, H., Fujiwara, T., Nakabeppu, Y., 2000. Identification of human MutY homolog (hMYH) as a repair enzyme for 2-hydroxyadenine in DNA and detection of multiple forms of hMYH located in nuclei and mitochondria. Nucleic Acids Res. 28, 1355–1364.

Pacher, P., Beckman, J.S., Liaudet, L., 2007. Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. Physiol. Rev. 87, 315–424.

Pachkowski, B.F., Tano, K., Afonin, V., Elder, R.H., Takeda, S., Watanabe, M., Swenberg, J.A., Nakamura, J., 2009. Cells deficient in PARP-1 show an accelerated accumulation of DNA single strand breaks, but not AP sites, over the PARP-1-proficient cells exposed to MMS. Mutat. Res. 671, 93–99.

Park, I.C., Park, M.J., Woo, S.H., Lee, H.C., An, S., Gwak, H.S., Lee, S.H., Hong, S.I., Bae, I.J., Seo, K.M., Rhee, C.H., 2003. Tetraarsenic oxide induces apoptosis in U937 leukemic cells through a reactive oxygen species-dependent pathway. Int. J. Oncol. 23, 943–948.

Payne, B.A., Wilson, I.J., Hateley, C.A., Horvath, R., Santibanez-Koref, M., Samuels, D.C., Price, D.A., Chinnery, P.F., 2011. Mitochondrial aging is accelerated by anti-retroviral therapy through the clonal expansion of mtDNA mutations. Nat. Genet. 43, 806–810.

Peng, T.I., Yu, P.R., Chen, J.Y., Wang, H.L., Wu, H.Y., Wei, Y.H., Jou, M.J., 2006. Visualizing common deletion of mitochondrial DNA-augmented mitochondrial reactive oxygen species generation and apoptosis upon oxidative stress. Biochim. Biophys. Acta 1762, 241–255.

Perrier, S., Hau, J., Gasparutto, D., Cadet, J., Favier, A., Ravanat, J.L., 2006. Characterization of lysine-guanine cross-links upon one-electron oxidation of a guanine-containing oligonucleotide in the presence of a trilysine peptide. J. Am. Chem. Soc. 128, 5703–5710.

Petrova, K.V., Jalluri, R.S., Kozekov, I.D., Rizzo, C.J., 2007. Mechanism of 1, N2-etheno-2′-deoxyguanosine formation from epoxyaldehydes. Chem. Res. Toxicol. 20, 1685–1692.

Pheiffer, B.H., Zimmerman, S.B., 1982. 3′-Phosphatase activity of the DNA kinase from rat liver. Biochem. Biophys. Res. Commun. 109, 1297–1302.

Pinz, K.G., Shibutani, S., Bogenhagen, D.F., 1995. Action of mitochondrial DNA polymerase gamma at sites of base loss or oxidative damage. J. Biol. Chem. 270, 9202–9206.

Pitceathly, R.D., Rahman, S., Hanna, M.G., 2012. Single deletions in mitochondrial DNA—molecular mechanisms and disease phenotypes in clinical practice. Neuromuscul. Disord. 22, 577–586.

Podratz, J.L., Knight, A.M., Ta, L.E., Staff, N.P., Gass, J.M., Genelin, K., Schlattau, A., Lathroum, L., Windebank, A.J., 2011. Cisplatin induced mitochondrial DNA damage in dorsal root ganglion neurons. Neurobiol. Dis. 41, 661–668.

Pogozelski, W.K., Tullius, T.D., 1998. Oxidative strand scission of nucleic acids: routes initiated by hydrogen abstraction from the sugar moiety. Chem. Rev. 98, 1089–1108.

Poitras, M.F., Koh, D.W., Yu, S.W., Andrabi, S.A., Mandir, A.S., Poirier, G.G., Dawson, V.L., Dawson, T.M., 2007. Spatial and functional relationship between poly(ADP-ribose) polymerase-1 and poly(ADP-ribose) glycohydrolase in the brain. Neuroscience 148, 198–211.

Prado, F.M., Oliveira, M.C., Miyamoto, S., Martinez, G.R., Medeiros, M.H., Ronsein, G.E., Di Mascio, P., 2009. Thymine hydroperoxide as a potential source of singlet molecular oxygen in DNA. Free Radic. Biol. Med. 47, 401–409.

Prasad, R., Lavrik, O.I., Kim, S.J., Kedar, P., Yang, X.P., Vande Berg, B.J., Wilson, S.H., 2001. DNA polymerase beta-mediated long patch base excision repair. Poly(ADP-ribose) polymerase-1 stimulates strand displacement DNA synthesis. J. Biol. Chem. 276, 32411–32414.

Prithivirajsingh, S., Story, M.D., Bergh, S.A., Geara, F.B., Ang, K.K., Ismail, S.M., Stevens, C.W., Buchholz, T.A., Brock, W.A., 2004. Accumulation of the common mitochondrial DNA deletion induced by ionizing radiation. FEBS Lett. 571, 227–232.

Prolla, T.A., Bohr, V.A., de Souza-Pinto, N.C., 2010. Mitochondria and aging. Mech. Ageing Dev. 131, 449–450.

Pryor, W.A., 1988. Why is the hydroxyl radical the only radical that commonly adds to DNA? Hypothesis: it has a rare combination of high electrophilicity, high thermochemical reactivity, and a mode of production that can occur near DNA. Free Radic. Biol. Med. 4, 219–223.

Raleigh, J.A., Kremers, W., Whitehouse, R., 1976. Radiation chemistry of nucleotides: 8,5′-cyclonucleotide formation and phosphate release initiated by hydroxyl radical attack on adenosine monophosphates. Radiat. Res. 65, 414–422.

Ravanat, J.L., Di, M.P., Martinez, G.R., Medeiros, M.H., 2001. Singlet oxygen induces oxidation of cellular DNA. J. Biol. Chem. 276, 40601–40604.

Reenan, R.A., Kolodner, R.D., 1992. Isolation and characterization of two *Saccharomyces cerevisiae* genes encoding homologs of the bacterial HexA and MutS mismatch repair proteins. Genetics 132, 963–973.

Richter, C., Park, J.W., Ames, B.N., 1988. Normal oxidative damage to mitochondrial and nuclear DNA is extensive. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 85, 6465–6467.

Roper, J.M., Mazzatti, D.J., Watkins, R.H., Maniscalco, W.M., Keng, P.C., O'Reilly, M.A., 2004. In vivo exposure to hyperoxia induces DNA damage in a population of alveolar type II epithelial cells. Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol. 286, L1045–L1054.

Rosenquist, T.A., Zaika, E., Fernandes, A.S., Zharkov, D.O., Miller, H., Grollman, A.P., 2003. The novel DNA glycosylase, NEIL1, protects mammalian cells from radiation-mediated cell death. DNA Repair (Amst) 2, 581–591.

Rossi, M.N., Carbone, M., Mostocotto, C., Mancone, C., Tripodi, M., Maione, R., Amati, P., 2009. Mitochondrial localization of PARP-1 requires interaction with mitofilin and is involved in the maintenance of mitochondrial DNA integrity. J. Biol. Chem. 284, 31616–31624.

Rubio-Cosials, A., Sidow, J.F., Jimenez-Menendez, N., Fernandez-Millan, P., Montoya, J., Jacobs, H.T., Coll, M., Bernado, P., Sola, M., 2011. Human mitochondrial transcription factor A induces a U-turn structure in the light strand promoter. Nat. Struct. Mol. Biol. 18, 1281–1289.

Sage, J.M., Gildemeister, O.S., Knight, K.L., 2010. Discovery of a novel function for human Rad51: maintenance of the mitochondrial genome. J. Biol. Chem. 285, 18984–18990.

Salgo, M.G., Stone, K., Squadrito, G.L., Battista, J.R., Pryor, W.A., 1995. Peroxynitrite causes DNA nicks in plasmid pBR322. Biochem. Biophys. Res. Commun. 210, 1025–1030.

Sawaki, T., Ogata, Y., 1977. Chemiluminescence from the base-catalyzed decomposition of α-hydroperoxy ketones: competitive cyclic and acyclic reactions. J. Am. Chem. Soc. 99, 5412–5416.

Scholes, G., Wilson, R.L., Ebert, M., 1969. Pulse radiolysis of aqueous solutions of deoxyribonucleotides and of DNA: reactions with hydroxy-radicals. J. Chem. Soc. Chem. Commun. 17–18.

Schon, E.A., Rizzuto, R., Moraes, C.T., Nakase, H., Zeviani, M., DiMauro, S., 1989. A direct repeat is a hotspot for large-scale deletion of human mitochondrial DNA. Science 244, 346–349.

Senturker, S., Dizdaroglu, M., 1999. The effect of experimental conditions on the levels of oxidatively modified bases in DNA as measured by gas chromatography-mass spectrometry: how many modified bases are involved? Prepurification or not. Free Radic. Biol. Med. 27, 370–380.

Senene, M., Mosquera-Miguel, A., Gonzalez, T., Fraga, M., Salas, A., Costoya, J.A., 2011. The mitochondrial genome is a "genetic sanctuary" during the oncogenic process. PLoS ONE 6, e23327.

Sharma, L.K., Fang, H., Liu, J., Vartak, R., Deng, J., Bai, Y., 2011. Mitochondrial respiratory complex I dysfunction promotes tumorigenesis through ROS alteration and AKT activation. Hum. Mol. Genet. 20, 4605–4616.

Shen, Z., Wu, W., Hazen, S.L., 2000. Activated leukocytes oxidatively damage DNA, RNA, and the nucleotide pool through halide-dependent formation of hydroxyl radical. Biochemistry 39, 5474–5482.

Shimura-Miura, H., Hattori, N., Kang, D., Miyako, K., Nakabeppu, Y., Mizuno, Y., 1999. Increased 8-oxo-dGTPase in the mitochondria of substantia nigral neurons in Parkinson's disease. Ann. Neurol. 46, 920–924.

Shoffner, J.M., Lott, M.T., Voljavec, A.S., Soueidan, S.A., Costigan, D.A., Wallace, D.C., 1989. Spontaneous Kearns–Sayre/chronic external ophthalmoplegia plus syndrome associated with a mitochondrial DNA deletion: a slip-replication model and metabolic therapy. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 86, 7952–7956.

Sia, E.A., Butler, C.A., Dominska, M., Greenwell, P., Fox, T.D., Petes, T.D., 2000. Analysis of microsatellite mutations in the mitochondrial DNA of *Saccharomyces cerevisiae*. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 97, 250–255.

Sieber, O.M., Lipton, L., Crabtree, M., Heinimann, K., Fidalgo, P., Phillips, R.K., Bisgaard, M.L., Orntoft, T.F., Aaltonen, L.A., Hodgson, S.V., Thomas, H.J., Tomlinson, I.P., 2003. Multiple colorectal adenomas, classic adenomatous polyposis, and germ-line mutations in MYH. N. Engl. J. Med. 348, 791–799.

Simsek, D., Furda, A., Gao, Y., Artus, J., Brunet, E., Hadjantonakis, A.K., Van, H.B., Shuman, S., McKinnon, P.J., Jasin, M., 2011. Crucial role for DNA ligase III in mitochondria but not in Xrcc1-dependent repair. Nature 471, 245–248.

Singh, K.P., Kumari, R., Treas, J., DuMond, J.W., 2011. Chronic exposure to arsenic causes increased cell survival, DNA damage, and increased expression of mitochondrial transcription factor A (mtTFA) in human prostate epithelial cells. Chem. Res. Toxicol. 24, 340–349.

Souza-Pinto, N.C., Croteau, D.L., Hudson, E.K., Hansford, R.G., Bohr, V.A., 1999. Age-associated increase in 8-oxo-deoxyguanosine glycosylase/AP lyase activity in rat mitochondria. Nucleic Acids Res. 27, 1935–1942.

Spencer, J.P., Wong, J., Jenner, A., Aruoma, O.I., Cross, C.E., Halliwell, B., 1996. Base modification and strand breakage in isolated calf thymus DNA and in DNA from human skin epidermal keratinocytes exposed to peroxynitrite or 3-morpholinosydnonimine. Chem. Res. Toxicol. 9, 1152–1158.

St-Pierre, J., Drori, S., Uldry, M., Silvaggi, J.M., Rhee, J., Jager, S., Handschin, C., Zheng, K., Lin, J., Yang, W., Simon, D.K., Bachoo, R., Spiegelman, B.M., 2006. Suppression of reactive oxygen species and neurodegeneration by the PGC-1 transcriptional coactivators. Cell 127, 397–408.

Steenken, S., 1989. Purine-bases, nucleosides, and nucleotides—aqueous-solution redox chemistry and transformation reactions of their radical cations and E- and OH adducts. Chem. Rev. 89, 503–520.

Steenken, S., Jovanovic, S.V., 1997. How easily oxidizable is DNA? One-electron reduction potentials of adenosine and guanosine radicals in aqueous solution, 119 ed. pp. 617–618.

Steenken, S., Jovanovic, S.V., Candeias, L.P., Reynisson, J., 2001. Is "frank" DNA-strand breakage via the guanine radical thermodynamically and sterically possible? Chemistry 7, 2829–2833.

Stevnsner, T., Nyaga, S., de Souza-Pinto, N.C., van der Horst, G.T., Gorgels, T.G., Hogue, B.A., Thorslund, T., Bohr, V.A., 2002. Mitochondrial repair of 8-oxoguanine is deficient in Cockayne syndrome group B. Oncogene 21, 8675–8682.

Strom, C.E., Johansson, F., Uhlen, M., Szigyarto, C.A., Erixon, K., Helleday, T., 2011. Poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) is not involved in base excision repair but PARP inhibition traps a single-strand intermediate. Nucleic Acids Res. 39, 3166–3175.

Stuart, J.A., Mayard, S., Hashiguchi, K., Souza-Pinto, N.C., Bohr, V.A., 2005. Localization of mitochondrial DNA base excision repair to an inner membrane-associated particulate fraction. Nucleic Acids Res. 33, 3722–3732.

Sugiyama, H., Tsutsumi, Y., Fujimoto, K., Saito, I., 1993. Photoinduced deoxyribose C2′ oxidation in DNA. Alkali-dependent cleavage of erythrose-containing sites via a retroaldol reaction. J. Am. Chem. Soc. 115, 4443–4448.

Suliman, H.B., Carraway, M.S., Piantadosi, C.A., 2003. Postlipopolysaccharide oxidative damage of mitochondrial DNA. Am. J. Respir. Crit. Care Med. 167, 570–579.

Svilar, D., Goellner, E.M., Almeida, K.H., Sobol, R.W., 2011. Base excision repair and lesion-dependent subpathways for repair of oxidative DNA damage. Antioxid. Redox Signal. 14, 2491–2507.

Sy, D., Savoye, C., Begusova, M., Michalik, V., Charlier, M., Spotheim-Maurizot, M., 1997. Sequence-dependent variations of DNA structure modulate radiation-induced strand breakage. Int. J. Radiat. Biol. 72, 147–155.

Sykora, P., Croteau, D.L., Bohr, V.A., Wilson III, D.M., 2011. Aprataxin localizes to mitochondria and preserves mitochondrial function. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 108, 7437–7442.

Sykora, P., Wilson III, D.M., Bohr, V.A., 2012. Repair of persistent strand breaks in the mitochondrial genome. Mech. Ageing Dev. 133 (4), 169–175.

Szczesny, B., Hazra, T.K., Papaconstantinou, J., Mitra, S., Boldogh, I., 2003. Age-dependent deficiency in import of mitochondrial DNA glycosylases required for repair of oxidatively damaged bases. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 100, 10670–10675.

Szczesny, B., Tann, A.W., Longley, M.J., Copeland, W.C., Mitra, S., 2008. Long patch base excision repair in mammalian mitochondrial genomes. J. Biol. Chem. 283, 26349–26356.

Szczesny, B., Tann, A.W., Mitra, S., 2010. Age- and tissue-specific changes in mitochondrial and nuclear DNA base excision repair activity in mice: Susceptibility of skeletal muscles to oxidative injury. Mech. Ageing Dev. 131, 330–337.

Tahbaz, N., Subedi, S., Weinfeld, M., 2012. Role of polynucleotide kinase/phosphatase in mitochondrial DNA repair. Nucleic Acids Res. 40, 3484–3495.

Takao, M., Aburatani, H., Kobayashi, K., Yasui, A., 1998. Mitochondrial targeting of human DNA glycosylases for repair of oxidative DNA damage. Nucleic Acids Res. 26, 2917–2922.

Takao, M., Kanno, S., Kobayashi, K., Zhang, Q.M., Yonei, S., van der Horst, G.T., Yasui, A., 2002. A back-up glycosylase in Nth1 knock-out mice is a functional Nei (endonuclease VIII) homologue. J. Biol. Chem. 277, 42205–42213.

Taylor, R.W., Turnbull, D.M., 2005. Mitochondrial DNA mutations in human disease. Nat. Rev. Genet. 6, 389–402.

Tell, G., Damante, G., Caldwell, D., Kelley, M.R., 2005. The intracellular localization of APE1/Ref-1: more than a passive phenomenon? Antioxid. Redox Signal. 7, 367–384.

Teoule, R., 1987. Radiation-induced DNA damage and its repair. Int. J. Radiat. Biol. Relat. Stud. Phys. Chem. Med. 51, 573–589.

Trzeciak, A.R., Nyaga, S.G., Jaruga, P., Lohani, A., Dizdaroglu, M., Evans, M.K., 2004. Cellular repair of oxidatively induced DNA base lesions is defective in prostate cancer cell lines, PC-3 and DU-145. Carcinogenesis 25, 1359–1370.

Tsuchimoto, D., Sakai, Y., Sakumi, K., Nishioka, K., Sasaki, M., Fujiwara, T., Nakabeppu, Y., 2001. 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. 29, 2349–2360.

Tsuruya, K., Furuichi, M., Tominaga, Y., Shinozaki, M., Tokumoto, M., Yoshimitsu, T., Fukuda, K., Kanai, H., Hirakata, H., Iida, M., Nakabeppu, Y., 2003. Accumulation of 8-oxoguanine in the cellular DNA and the alteration of the OGG1 expression during ischemia–reperfusion injury in the rat kidney. DNA Repair (Amst) 2, 211–229.

Tsuzuki, T., Egashira, A., Igarashi, H., Iwakuma, T., Nakatsuru, Y., Tominaga, Y., Kawate, H., Nakao, K., Nakamura, K., Ide, F., Kura, S., Nakabeppu, Y., Katsuki, M., Ishikawa, T., Sekiguchi, M., 2001. Spontaneous tumorigenesis in mice defective in the MTH1 gene encoding 8-oxo-dGTPase. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 98, 11456–11461.

Udenfriend, S., Clark, C.T., Axelrod, J., Brodie, B.B., 1954. Ascorbic acid in aromatic hydroxylation. I. A model system for aromatic hydroxylation. J. Biol. Chem. 208, 731–739.

Ueta, E., Sasabe, E., Yang, Z., Osaki, T., Yamamoto, T., 2008. Enhancement of apoptotic damage of squamous cell carcinoma cells by inhibition of the mitochondrial DNA repairing system. Cancer Sci. 99, 2230–2237.

Van, G.G., Dermaut, B., Lofgren, A., Martin, J.J., Van, B.C., 2001. Mutation of POLG is associated with progressive external ophthalmoplegia characterized by mtDNA deletions. Nat. Genet. 28, 211–212.

Vellai, T., Takacs, K., Vida, G., 1998. A new aspect to the origin and evolution of eukaryotes. J. Mol. Evol. 46, 499–507.

Vermulst, M., Wanagat, J., Kujoth, G.C., Bielas, J.H., Rabinovitch, P.S., Prolla, T.A., Loeb, L.A., 2008. DNA deletions and clonal mutations drive premature aging in mitochondrial mutator mice. Nat. Genet. 40, 392–394.

von Sonntag, C., 1987. The Chemical Basis of Radiation Biology. Taylor & Francis.

Wagner, J.R., 1994. Analysis of oxidative cytosine products in DNA exposed to ionizing radiation. J. Chim. Phys. 91, 1280–1286.

Wagner, J.R., Cadet, J., 2010. Oxidation reactions of cytosine DNA components by hydroxyl radical and one-electron oxidants in aerated aqueous solutions. Acc. Chem. Res. 43, 564–571.

Wagner, J.R., Van Lier, J.E., Berger, M., Cadet, J., 1994. Thymidine hydroperoxides: structural assignments, conformational features and thermal decomposition in water. J. Am. Chem. Soc. 116, 2235–2242.

Wanagat, J., Cao, Z., Pathare, P., Aiken, J.M., 2001. Mitochondrial DNA deletion mutations colocalize with segmental electron transport system abnormalities, muscle fiber atrophy, fiber splitting, and oxidative damage in sarcopenia. FASEB J. 15, 322–332.

Wanagat, J., Dai, D.F., Rabinovitch, P., 2010. Mitochondrial oxidative stress and mammalian healthspan. Mech. Ageing Dev. 131, 527–535.

Wang, J., Markesbery, W.R., Lovell, M.A., 2006. Increased oxidative damage in nuclear and mitochondrial DNA in mild cognitive impairment. J. Neurochem. 96, 825–832.

Wang, Y., Bogenhagen, D.F., 2006. Human mitochondrial DNA nucleoids are linked to protein folding machinery and metabolic enzymes at the mitochondrial inner membrane. J. Biol. Chem. 281, 25791–25802.

Wei, Y.H., Kao, S.H., Lee, H.C., 1996. Simultaneous increase of mitochondrial DNA deletions and lipid peroxidation in human aging. Ann. N. Y. Acad. Sci. 786, 24–43.

Weissman, L., de Souza-Pinto, N.C., Stevnsner, T., Bohr, V.A., 2007. DNA repair, mitochondria, and neurodegeneration. Neuroscience 145, 1318–1329.

West, A.P., Shadel, G.S., Ghosh, S., 2011. Mitochondria in innate immune responses. Nat. Rev. Immunol. 11, 389–402.

Wiederhold, L., Leppard, J.B., Kedar, P., Karimi-Busheri, F., Rasouli-Nia, A., Weinfeld, M., Tomkinson, A.E., Izumi, T., Prasad, R., Wilson, S.H., Mitra, S., Hazra, T.K., 2004. AP endonuclease-independent DNA base excision repair in human cells. Mol. Cell 15, 209–220.

Wiseman, H., Halliwell, B., 1996. Damage to DNA by reactive oxygen and nitrogen species: role in inflammatory disease and progression to cancer. Biochem. J. 313 (Pt 1), 17–29.

Wong, H.K., Muftuoglu, M., Beck, G., Imam, S.Z., Bohr, V.A., Wilson III, D.M., 2007. Cockayne syndrome B protein stimulates apurinic endonuclease 1 activity and protects against agents that introduce base excision repair intermediates. Nucleic Acids Res. 35, 4103–4113.

Woo, D.K., Green, P.D., Santos, J.H., D'Souza, A.D., Walther, Z., Martin, W.D., Christian, B.E., Chandel, N.S., Shadel, G.S., 2012. Mitochondrial genome instability and ROS enhance intestinal tumorigenesis in APC(Min/+) mice. Am. J. Pathol. 180, 24–31.

Xu, S., Zhou, Z., Zhang, L., Yu, Z., Zhang, W., Wang, Y., Wang, X., Li, M., Chen, Y., Chen, C., He, M., Zhang, G., Zhong, M., 2010. Exposure to 1800 MHz radiofrequency radiation induces oxidative damage to mitochondrial DNA in primary cultured neurons. Brain Res. 1311, 189–196.

Xu, S.C., He, M.D., Lu, Y.H., Li, L., Zhong, M., Zhang, Y.W., Wang, Y., Yu, Z.P., Zhou, Z., 2011. Nickel exposure induces oxidative damage to mitochondrial DNA in Neuro2a cells: the neuroprotective roles of melatonin. J. Pineal Res. 51, 426–433.

Yermilov, V., Rubio, J., Becchi, M., Friesen, M.D., Pignatelli, B., Ohshima, H., 1995a. Formation of 8-nitroguanine by the reaction of guanine with peroxynitrite in vitro. Carcinogenesis 16, 2045–2050.

Yermilov, V., Rubio, J., Ohshima, H., 1995b. Formation of 8-nitroguanine in DNA treated with peroxynitrite in vitro and its rapid removal from DNA by depurination. FEBS Lett. 376, 207–210.

Yermilov, V., Yoshie, Y., Rubio, J., Ohshima, H., 1996. Effects of carbon dioxide/bicarbonate on induction of DNA single-strand breaks and formation of 8-nitroguanine, 8-oxoguanine and base-propenal mediated by peroxynitrite. FEBS Lett. 399, 67–70.

Yoshimura, D., Sakumi, K., Ohno, M., Sakai, Y., Furuichi, M., Iwai, S., Nakabeppu, Y., 2003. An oxidized purine nucleoside triphosphatase, MTH1, suppresses cell death caused by oxidative stress. J. Biol. Chem. 278, 37965–37973.

Zastawny, T.H., Dabrowska, M., Jaskolski, T., Klimarczyk, M., Kulinski, L., Koszela, A., Szczesniewicz, M., Sliwinska, M., Witkowski, P., Olinski, R., 1998. Comparison of oxidative base damage in mitochondrial and nuclear DNA. Free Radic. Biol. Med. 24, 722–725.

Zhang, S., Villalta, P.W., Wang, M., Hecht, S.S., 2006. Analysis of crotonaldehyde- and acetaldehyde-derived 1, n(2)-propanodeoxyguanosine adducts in DNA from human tissues using liquid chromatography electrospray ionization tandem mass spectrometry. Chem. Res. Toxicol. 19, 1386–1392.

Zhang, S., Villalta, P.W., Wang, M., Hecht, S.S., 2007. Detection and quantitation of acrolein-derived 1, N2-propanodeoxyguanosine adducts in human lung by liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry. Chem. Res. Toxicol. 20, 565–571.

Zheng, L., Zhou, M., Guo, Z., Lu, H., Qian, L., Dai, H., Qiu, J., Yakubovskaya, E., Bogenhagen, D.F., Demple, B., Shen, B., 2008. Human DNA2 is a mitochondrial nuclease/helicase for efficient processing of DNA replication and repair intermediates. Mol. Cell 32, 325–336.