**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA**

Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas
(Bioquímica)

VALQUIRIA TIAGO DOS SANTOS

**Estudo dos mecanismos moleculares do reparo de quebra
de duplas fitas no DNA mitocondrial**

São Paulo
2015

Data de depósito da tese:
03/2015

VALQUIRIA TIAGO DOS SANTOS

**Estudo dos mecanismos moleculares do reparo de quebra de
duplas fitas no DNA mitocondrial**

Tese apresentada ao Instituto de
Química da Universidade de São Paulo para
obtenção do Título de Doutora em
Ciências (Bioquímica)

Orientador: Profa. Dra. Nadja Cristhina Souza Pinto Filho

São Paulo
2015

Ficha Catalográfica

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

S237e Santos, Valquíria Tiago dos
Estudo dos mecanismos moleculares do reparo de quebra de
duplas fitas no DNA mitocondrial / Valquíria Tiago dos Santos --
São Paulo, 2015.
107p.

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

VALQUIRIA T. DOS SANTOS

**Estudo dos mecanismos moleculares do reparo de quebra de duplas fitas no
DNA mitocondrial**

Tese apresentada ao Instituto de
Química da Universidade de São Paulo para
obtenção do Título de Doutora em
Ciências (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

Dedico com gratidão e amor esse trabalho à minha mãe, pelo seu amor, carinho e apoio em todas as etapas da minha vida, sendo exemplo de pessoa, mulher e mãe.

Agradecimentos

Primeiramente a Deus, sem o qual nada disso seria possível.

À minha orientadora Professora Dra. Nadja Cristhina de Souza Pinto pela oportunidade de trabalhar em seu laboratório, paciência, orientação e por ter contribuído para o meu amadurecimento científico e pessoal.

Aos membros do Laboratório de Genética Mitocondrial: Paulo Tonolli, Felipe Ravagnani, Marlene F. Mendes, Gustavo Carvalho, Felipe Godoy, Daniela Soltys, Matheus Mori, Rute Costa, Carolina Berra, Carolina Parga, Carolina Romagna. A todos os membros, obrigada pelo convívio durante os momentos de alegria e de dificuldade.

Aos membros do Biochemistry and Regulation of DNA Repair Group do professor Grigory L. Dianov- Oxford University onde fiz um estágio de doutorado sanduiche o qual possibilitou o contato com diversos grupos e pessoas incluindo o professor Grigory, um orientador, líder e uma pessoa com simplicidade e profissionalismo que são admiráveis.

Aos membros do Laboratório de Metabolismo Mitocondrial bem como professora Dra. Alicia Kowaltowski por disponibilizar toda a estrutura do laboratório permitindo que alguns experimentos importantes fossem realizados. Além do exemplo profissional, convivência agradável com os membros desse laboratório, parcerias e discussões científicas.

Aos membros do Laboratório de Genética bacteriana onde fiz o mestrado mas que eu sempre voltava para rever os amigos - Rodrigo, Camila Schroeder, Max Durvale, Bisson (e ao mutante T111A), Valdir Blasios Jr.

À Danielle Pereira Nascimento a super IC que me ajudou ao longo desse trabalho fazendo com que essa caminhada se tornasse mais agradável todos os dias em que estivemos lado a lado na nossa bancada ou “Saudosa Maloca Querida”. Além da Bioquímica, obrigada pela amizade e carinho.

À toda minha família, que é o meu porto seguro. Em especial minha mãe que em todos os momentos me apoiou e não me deixou desistir. Além disso da minha sobrinha Lorena o qual em diferentes momentos me faz ver o mundo pela simplicidade e doçura dos olhos de uma criança.

Ao Sr Hugo e D. Maria, pelo carinho, amor e ensinamentos que formam meus valores como pessoa.

Ao Carlos R. Prudêncio pela paciência, convivência, amor, dedicação, apoio em diversos momentos, incluindo madrugadas de leitura de tese, e sobretudo me incentivando a sempre olhar as coisas pelo lado positivo.

Aos meus amigos em especial João, Paulo Tonolli, Gleidson, Adjací, Serginho, Ailton. Obrigada pelo carinho e apoio ao longo dessa caminhada.

À Adriana M. P. Wendel pela ajuda técnica, conselhos, orientações e conversas sempre agradáveis.

À Andressa P. Costa pelo carinho e também pelo auxílio técnico a amizade sempre presente.

À Juliane Raveli ajuda técnica, conselhos, amizade, risadas e conversas sempre agradáveis.

Aos colegas de departamento de diversos laboratórios que gentilmente cederam espaço em seus laboratórios, me ensinaram a usar equipamentos, disponibilizaram reagentes e até mesmo me ouviram em momentos diversos enquanto tomávamos café.

Ao pessoal da secretaria de pós-graduação pelo carinho no atendimento e por toda ajuda que prestam sempre quando solicitados.

A todas as pessoas que contribuíram de alguma forma para o meu amadurecimento, me ensinando valiosas lições de vida.

Ao CNPq e a Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo-FAPESP pelo apoio financeiro. Esse trabalho foi desenvolvido com apoio financeiro da FAPESP: Processos 2010/18254-0 e 2013/12011-7.

RESUMO

Dos Santos, V.T. **Estudo dos mecanismos moleculares do reparo de quebra de duplas fitas no DNA mitocondrial** (2015). 107 p. Tese de doutorado, Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

O DNA está constantemente exposto a danos causados tanto por agentes endógenos quanto exógenos. Estes podem causar diferentes tipos de lesões incluindo modificações de bases e do açúcar, além de quebras de fitas simples ou duplas. As quebras de duplas fitas, quando comparadas às demais, constituem as mais citotóxicas e podem resultar em deleções no DNA e instabilidade genética. Deleções no DNA mitocondrial (mtDNA) causam diversas doenças e estão envolvidas no processo de envelhecimento. No núcleo, as quebras de duplas fitas no DNA podem ser reparadas por recombinação homóloga (HR), ligação de pontas não homólogas (NHEJ) e anelamento de fita simples (SSA). No entanto, em mitocôndrias de células de mamíferos, o reparo de quebras de duplas fitas ainda não foi completamente caracterizado. Experimentos *in vitro* usando extratos mitocondriais de células de roedores mostraram que estes são capazes de reparar essas quebras, no entanto pouco é sabido sobre quais proteínas são responsáveis por cada etapa de reparo, bem como sua implicação na manutenção da integridade do genoma mitocondrial. Sendo assim, nesse trabalho investigamos a localização e função mitocondrial das proteínas ATM, Rad51, Rad52, Ku70/86 e DNA-PKCs, que são sabidamente envolvidas em reparo de quebras de duplas fitas no núcleo. Para identificar essas proteínas em mitocôndrias de células de mamíferos, mitocôndrias foram isoladas a partir de células da linhagem HEK293T, usando centrifugação diferencial seguida por gradiente de Percoll. Para as proteínas de recombinação homóloga, ATM e Rad51, imunodetectamos isoformas semelhantes em todos os compartimentos celulares. Já para a proteína Rad52 o mesmo anticorpo imunodetectou duas bandas distintas na mitocôndria ao passo que no núcleo foram quatro. Além disso, verificamos que baixos níveis de proteína Rad52, induzidos pela expressão de *shRNA* (*short hairpin RNA*) específico, resultam em diminuição do número de cópias de mtDNA bem como acúmulo de deleções no genoma mitocondrial. Para as proteínas de NHEJ, DNA-PKCs e a subunidade Ku70, identificamos isoformas semelhantes em todos os compartimentos celulares. Já para a subunidade 86 do heterodímero Ku70/86 o anticorpo detectou, somente em mitocôndrias, uma banda menor de 50 kDa, a qual difere na região N-terminal da subunidade detectada no núcleo (86 kDa). Experimentos de co-imunoprecipitação de proteínas mostraram que essa isoforma menor compõe o heterodímero mitocondrial juntamente com a subunidade 70 (mtKu70/50) e que esse interage com DNA ligase III mitocondrial. Nossos resultados também mostraram que a estabilidade proteica de mtKu70/50 é regulada por ATM. Tratamento das células com peróxido de hidrogênio, que induz quebras de duplas fitas, aumentou a associação do heterodímero mtKu70/50 com o mtDNA, de forma independente de aumento da concentração proteica intra-mitocondrial. Já a diminuição dos níveis proteicos de Ku, induzida através de *shRNA*, resultou em diminuição do número de cópias de mtDNA e acúmulo de danos nesse genoma. Extratos mitocondriais de células *knockdown* para Ku apresentaram menor atividade de reparo NHEJ em um ensaio *in vitro*, sugerindo que o acúmulo de danos nestas células é provavelmente devido a deficiências na via de NHEJ. Em conjunto, nossos dados sugerem que tanto HR

quanto NHEJ operam em mitocôndrias. Além disso, a via de NHEJ mitocondrial utiliza o heterodímero mitocondrial Ku70/50 o qual está envolvido na manutenção do mtDNA. Ademais, nossos resultados mostram uma grande conservação molecular e funcional entre as vias de reparo de NHEJ e HR no núcleo e na mitocôndria, o que reforça sua importância para a manutenção da estabilidade genômica mitocondrial e, provavelmente a função mitocondrial.

Palavras-chave: DNA mitocondrial; NHEJ; HR; Reparo; Mitocôndria; Células de mamífero

ABSTRACT

Dos Santos, V.T. **Study of the molecular mechanisms of double-strand break repair in mitochondrial DNA** (2015). 107 p. PhD Thesis- Graduate program in Biochemistry, Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

DNA is constantly exposed to damaging agents from both endogenous and exogenous sources. These can cause different types of DNA lesions that include base and sugar modifications and single and double strand breaks. DNA double-strand breaks (DSBs) are among the most cytotoxic DNA lesions, which can result in deletions and genetic instability. Deletions in the mitochondrial DNA (mtDNA) cause numerous human diseases and drive normal aging. DSBs in the nuclear DNA are repaired by non-homologous DNA end joining (NHEJ), homologous recombination (HR) or Single Strand Annealing (SSA). Yet, repair of DSBs in mammalian mitochondria has not been fully characterized. Mitochondrial extracts from rodent cells are proficient in ligating DNA ends *in vitro*, but little is known about which proteins are responsible for each enzymatic step and its implication in mitochondrial genome maintenance. Thus, we investigated mitochondrial localization and function of DSBR (double strand break repair) proteins ATM, Rad51, Rad52, the Ku70/86 heterodimer and DNA-PKCs. To identify DSBR proteins in mammalian mitochondria, highly purified mitochondria from HEK293T cells were isolated using differential centrifugation followed by Percoll gradient. For HR proteins, we detected similar isoforms for ATM and Rad51 proteins in all cellular compartments. Two mitochondria-specific isoforms of Rad52 were detected, while the same antibody detected four isoforms in the nucleus. In addition, lower Rad52 protein levels, induced by specific shRNA expression, result in decreased mtDNA copy number and accumulation of deleted mitochondrial genomes. For NHEJ proteins, similar isoforms of DNA-PKCs and the Ku70 subunit were detected in all cellular compartments. On the other hand, antibodies against the Ku86 subunit detected a smaller band in mitochondrial extracts (50 KDa), lacking the N-terminal region of the canonical isoform detected in the nucleus (86 KDa). The mitochondrial Ku70/50 heterodimer interacts with mitochondrial DNA ligase III, suggesting a role in DSBR. Moreover, stability of the mtKu heterodimer is regulated by ATM. Hydrogen peroxide treatment, which induces DSBs, increases mtKu70/50 association with the mtDNA and cells with reduced Ku levels, also induced by shRNA transfection, have lower mtDNA copy number and accumulate mtDNA damage. Moreover, mitochondrial extracts from Ku knockdown cells show lower NHEJ repair activity in an *in vitro* assay, suggesting that damage accumulation in these cells is likely due to deficiencies in NHEJ. Together, our data suggest that both HR and NHEJ operate in mitochondria. Also, mtNHEJ requires the Ku heterodimer and is involved in mtDNA maintenance. Moreover, our results indicate that there is a significant molecular and functional conservation between NHEJ and HR repair pathways in the nucleus and in mitochondria, which reinforces their importance for maintenance of mitochondrial genomic stability and, likely mitochondrial function.

Keywords: mitochondrial DNA; NHEJ; HR; Repair; Mitochondria; Mammalian cells

Lista de abreviaturas e siglas

ATP- Adenosina Trifosfato

BER- Reparo por excisão de bases (do inglês *base excision repair*)

DNA- Ácido desoxirribonucleico

dNTPs- Desoxi-ribonucleotídeos (dATP, dCTP, dTTP e dGTP)

HR- Recombinação homóloga (do inglês *homologous recombination*)

Kb- Quilobase

LB- Meio Luria-Bertami

mtDNA- DNA mitocondrial

NER- Reparo por excisão de nucleotídeos (do inglês *nucleotide excision repair*)

NHEJ- Ligação de extremidades não homólogas (do inglês *non homologous end joining*)

OriC- Origem de replicação

ORF- *Open reading frame*

Pb- Pares de bases

PBS- Solução salina tamponada com fosfato

PCR- Reação de polimerase em cadeia

RNA- Ácido ribonucleico (do inglês *ribonucleic acid*)

RNAm- RNA mensageiro

RNAr- RNA ribossomal

RNA_t- RNA de transferência ou RNA transportador

RT-PCR- Transcrição reversa por reação da polimerase em cadeia

SSA- Reparo através do anelamento de fita simples (do inglês *single strand annealing*)

shRNA- sem tradução para o português (do inglês *short hairpin RNA*)

Taq- *Thermus aquaticus*

TAE- Tampão Tris, acetato e EDTA

TE- Tampão Tris e EDTA

Sumário

1. Introdução.....	1
1.1 A integridade do genoma e a homeostase celular	1
1.2 Estrutura e organização do genoma mitocondrial	5
1.3 Mutação e Reparo no mtDNA	9
1.4 Reparo de Quebras de duplas fitas em células de mamíferos	13
1.4.1 Recombinação Homóloga	15
1.4.2 Anelamento de fitas simples de DNA (Single Strand Annealing- SSA) .	19
1.4.3 Ligação de extremidades não homólogas (NHEJ- Non Homologous End Joining).....	21
1.5 Reparo de Quebras de duplas fitas em mitocôndrias de células de mamíferos.....	26
2. Objetivos	29
2.1 Objetivo Geral	29
2.2 Objetivos Específicos	29
3. Materiais e Métodos	30
3.1 Manutenções das culturas celulares	30
3.2 Transfecção de HEK293T com shRNA gene específico e geração de linhagens estáveis	30
3.3 Indução de estresse oxidativo usando peróxido de hidrogênio	31
3.4 Indução de estresse oxidativo usando radiação gama.....	32
3.5 Isolamento de mitocôndrias a partir de células em cultura.....	32
3.6 Produção de extratos celular total e mitocondrial.....	33
3.7 Quantificação de proteínas em extratos celulares	33
3.8 Ensaio in vitro para atividade de NHEJ	34
3.9 Extração de DNA plasmidial de E. coli	34
3.10 Purificação de DNA a partir de gel de agarose	34
3.11 Quantificação de DNA.....	35
3.12 Isolamento de DNA total e análise qualitativa do número de cópias e deleções no DNA mitocondrial.....	35
3.13 Análise de lesões em mtDNA por XL-PCR	36

3.14	Co-imunoprecipitação de mtDNA.....	37
3.15	Western Blot	38
3.16	Ligação covalente do anticorpo Ku70 à proteína A/G agarose	39
3.17	Co-imunoprecipitação das proteínas Ku70/86 e DNA ligase III	40
3.18	Eletroforese proteica unidimensional (1D-SDS-PAGE)	40
3.19	Eletroforese proteica bidimensional (2D-PAGE)	41
3.20	Identificação da subunidade 50 do heterodímero Ku70/50 por HPLC/ESI/MS após digestão trípica	42
3.21	Medida da atividade da enzima Citrato Sintase	43
3.22	Ensaio de proteção da digestão por proteinase K	44
3.23	Análises estatísticas	44
4.	Resultados	45
4.1	Análise da pureza das frações mitocondriais isoladas	45
4.2	Recombinação Homóloga na mitocôndria.....	46
4.2.1	Verificação da presença das proteínas envolvidas em Recombinação Homóloga (ATM, Rad51 e Rad52) em mitocôndrias isoladas de células humanas	46
4.2.2	Geração de linhagens knockdown para a proteína de HR Rad52	47
4.2.3	Análise relativa do número de cópias de mtDNA e deleções do genoma mitocondrial na linhagem knockdown para Rad52	49
4.2.4	Verificação do nível proteico intra-mitocondrial da proteína Rad52 após danos ao DNA induzidos por H ₂ O ₂ e radiação gama	51
4.2.5	Verificação da associação da proteína Rad52 ao mtDNA após danos ao DNA induzidos por H ₂ O ₂ e radiação do tipo gama	53
4.3	Ligação de pontas não homólogas (NHEJ) na mitocôndria	56
4.3.1	Identificação das proteínas de NHEJ (DNA-PKCs e Ku70/86) em mitocôndrias isoladas.....	56
4.3.2	Verificação da localização mitocondrial das proteínas Ku70/86	59
4.3.3	Investigação da localização mitocondrial da proteína Ku86 in silico.....	60
4.3.4	Co-imunoprecipitação do heterodímero Ku nas frações mitocondriais e nucleares.....	63
4.3.5	Identificação da subunidade mitocondrial do heterodímero Ku por HPLC/ESI/MS após digestão trípica	64

4.3.6	Co-imunoprecipitação da proteína DNA ligase III com os heterodímeros Ku70/86 nas frações mitocondriais e nucleares	68
4.3.7	A estabilidade proteica do heterodímero mitocondrial Ku70/50 é regulada por ATM	69
4.3.8	Envolvimento do heterodímero Ku70/50 em NHEJ na mitocôndria e associação ao mtDNA após tratamento com H ₂ O ₂	70
4.3.9	Associação das proteínas de NHEJ (Ku70/50, DNA-PKCs e DNA ligaseIII) ao mtDNA após tratamento com H ₂ O ₂	73
4.3.10	NHEJ e a integridade do mtDNA	75
5.	Discussão	80
6.	Conclusão	91
7.	Referências Bibliográficas.....	92
8.	Anexos	107

Lista de Figuras

- Figura 1.** Esquema simplificado das diferentes fontes de danos ao DNA e as diferentes respostas celulares desencadeadas 5
- Figura 2.** Mapa do mtDNA humano 8
- Figura 3.** Compilação dos tipos de danos ao DNA bem como vias de reparo de operantes sua existência nas mitocôndrias 13
- Figura 4.** Via de reparo de quebras de duplas fitas através de recombinação homóloga (HR) 17
- Figura 5.** Via de reparo de quebras de duplas fitas através de anelamento de fita simples de DNA (SSA) 21
- Figura 6.** Representação esquemática dos domínios das proteínas Ku70/86 e DNA-PKcs 22
- Figura 7.** Via de reparo de quebras de duplas fitas através de através NHEJ 24
- Figura 8.** Análise da pureza das frações subcelulares através da imunodeteção de Lamina B2 (65 kDa) como marcador nuclear e TFAM (25 kDa) como marcador mitocondrial 46
- Figura 9.** Verificação da presença da proteína ATM em diferentes frações celulares 47
- Figura 10.** Verificação da presença da proteína Rad51 e Rad52 em diferentes frações celulares 47
- Figura 11.** Verificação dos níveis proteicos de Rad52 em células HEK293T transfectadas com shRNA específico para o produto do gene RAD52 48
- Figura 12.** Verificação da quantidade relativa de mtDNA nas linhagens controle e *knockdown* para *Rad52* 50
- Figura 13.** Verificação das quantidades relativas de deleções no mtDNA nas linhagens controle e *knockdown* para *Rad52* 51

Figura 14. Determinação dos níveis intramitocondriais da proteína Rad52 após tratamento com H ₂ O ₂ (A) e radiação gama (B)	53
Figura 15. Associação da proteína Rad52 ao mtDNA após tratamento com H ₂ O ₂ ou radiação gama	55
Figura 16. Verificação da presença da proteína DNA-PKCs em diferentes frações celulares	56
Figura 17. Verificação da presença da proteína Ku70 em diferentes frações celulares	57
Figura 18. Verificação da presença da proteína Ku86 em diferentes frações celulares	57
Figura 19. Verificação da presença das proteínas Ku70/86 em diferentes frações celulares	58
Figura 20. Imunodeteção das proteínas Ku70 e Ku86 (região N-terminal) em diferentes frações celulares	59
Figura 21. Ensaio de digestão proteica por proteinase K.	60
Figura 22. Análise da probabilidade de direcionamento mitocondrial da sequência primária de Ku86 através do programa MitoProt II	62
Figura 23. Avaliação da existência de sítios de clivagem internos na sequência proteica de Ku86 através do programa Emboss	63
Figura 24. Co-imunoprecipitação do heterodímero Ku70/86 nas frações mitocondrial e nuclear da linhagem HEK293T.	64
Figura 25. Caracterização do heterodímero mitocondrial Ku70/50 a partir de células HEK293T.	66
Figura 26. Co-imunoprecipitação da proteína DNA ligase III com o heterodímero Ku nas frações mitocondrial e nuclear da linhagem HEK293T	69
Figura 27. ATM regula a estabilidade do heterodímero mitocondrial Ku70/50	70

Figura 28. Verificação dos níveis proteicos do heterodímero Ku em células HEK293T transfectadas com shRNA específico para o produto do gene XRCC6 (Ku70)	71
Figura 29. Ensaio <i>in vitro</i> para a medida da atividade de NHEJ	72
Figura 30. Associação das proteínas Ku70/50, DNA ligase III e DNA-PKCs ao mtDNA após o tratamento com H ₂ O ₂	74
Figura 31. Determinação dos níveis intra-mitocndriais do heterodímero Ku70/50 após o tratamento com H ₂ O ₂	75
Figura 32. Verificação das quantidades relativas de mtDNA nas linhagens controle e <i>knockdown</i> para Ku70	76
Figura 33. Atividade de Citrato Sintase em células controle e Ku70 knockdown	77
Figura 34. Medida do número de lesões bloqueadoras de polimerases em DNA por XL-PCR	78
Figura 35. Análise relativa de deleções no mtDNA	79

Lista de Tabelas

Tabela 1. <i>Primers</i> utilizados para qPCR para número de cópias de mtDNA.	35
Tabela 2. Análise comparativa dos peptídeos obtidos a partir da digestão teórica de Ku86 por tripsina com os peptídeos identificados por HPLC/ESI/MS nas amostras imunoprecipitadas.....	67

1. Introdução

1.1 A integridade do genoma e a homeostase celular

A manutenção da integridade da informação genética é desafiada constantemente por agentes reativos cuja origem pode ser exógena ou endógena ao organismo. Um exemplo bem comum para agente externo é a luz UV, à qual estamos expostos diariamente. Esta pode ser absorvida diretamente pelo DNA e induzir reações nas bases do DNA, gerando fotoprodutos que culminam em distorções na estrutura do DNA e no bloqueio das maquinarias de replicação e transcrição, que atuam em mecanismos vitais para a célula (BOHR, 2002; HOEIJMAKERS, 2009; JACKSON; BARTEK, 2009). Além do UV, radiações ionizantes também podem causar alterações diretas no DNA, bem como uma série de xenobióticos aos quais os organismos são expostos reagem covalentemente ou indiretamente com a molécula de DNA (CADET; RICHARD WAGNER, 2013). Várias classes distintas de compostos orgânicos distintos, incluindo quinonas, epóxidos, compostos heterocíclicos e agentes alquilantes induzem modificações químicas e/ou estruturais em DNA (KONDO et al., 2010). Quanto aos agentes endógenos, a maioria dos agentes genotóxicos endógenos são produtos de processos do metabolismo aeróbico normal, como por exemplo as espécies reativas a oxigênio (EROs), que podem ser formadas como subprodutos do metabolismo energético mitocondrial e durante o ciclo catalítico de várias enzimas (VERCESI et al., 2007). Uma vez geradas, essas espécies podem reagir e causar modificações em proteínas, carboidratos e lipídeos, em um processo conhecido como peroxidação lipídica que resulta na formação de alguns aldeídos que também podem se adicionar ao DNA (NAIR; BARTSCH; NAIR, 2007). Além disso, as mesmas podem reagir diretamente com o DNA. Dentre as EROs de relevância biológica, o radical hidroxila é a principal espécie que reage diretamente com o DNA através da adição de -OH às ligações duplas das bases nitrogenadas, abstração de um átomo de hidrogênio do grupamento metil da timina bem como de cada ligação C-H da 2'-desoxirribose (BREEN; MURPHY, 1995; MUFTUOGLU; MORI; SOUZA-PINTO, 2014). Além de EROs, outras moléculas comumente formadas durante o metabolismo, como S-adenosilmetionina, também podem modificar o DNA (ALEXEYEV et al., 2013). A importância biológica de agentes genotóxicos endógenos é demonstrada pelo fato

que estima-se que por dia cerca de 20.000 lesões no DNA de uma célula são geradas de formas endógenas (FRIEDBERG; FRIEDBERG, 2003; LINDAHL; BARNES, 2000).

As consequências biológicas de alterações químicas e/ou estruturais na molécula de DNA resultam, primariamente, dos possíveis efeitos de sua presença durante reações metabólicas normais às quais o DNA está sujeito, principalmente replicação e transcrição. A replicação de DNA contendo lesão pode resultar em mutações pontuais, tais como substituição ou deleção de bases. Um exemplo disso consiste na desaminação de citosina formando timina, a qual durante a replicação formará par canônico com a adenina levando à uma transição do par C-G para o par T-A. Dessa forma, caso a célula não remova as lesões antes de iniciar a replicação, essas mutações pontuais poderão ser formadas e contribuir para os processos de carcinogênese. Esse efeito é exemplificado pela elevada predisposição ao câncer de pele associada à exposição a luz UV, que induz a formação de dímeros de timina e 6,4-fotoprodutos que são mutagênicos durante a replicação (MENCK; MUNFORD, 2014). Mutações pontuais também podem alterar os códons e gerar proteínas truncadas que podem ser tóxicas, inserir ou excluir códons de paradas na síntese proteica (ALBERTS, 2008), e resultar na perda da expressão proteica devido ao fenômeno conhecido como *non-sense mediated message decay* (SILVA; ROMÃO, 2009). Além de modificações de bases, espécies reativas de oxigênio podem também induzir quebras de fitas simples no DNA, que por sua vez quando presentes muito próximas (10 a 20 pb) podem resultar em quebras de duplas fitas (VAN DER SCHANS, 1978). Além disso, a presença dessas quebras pode resultar em colapso da forquilha de replicação e que por sua vez pode gerar também quebras de duplas fitas durante esse reparo (CIMPRICH; CORTEZ, 2008).

Dependendo da natureza química e estrutural das modificações no DNA, estas podem bloquear a progressão tanto de DNA- quanto RNA-polimerases. Um exemplo é o que ocorre na presença de a formação de adutos volumosos além dímeros de pirimidina, citosina ou timina que resultam em modificações covalentes no DNA, o que impede a abertura da fita e prosseguimento da DNA polimerase durante a replicação (YANG, 2011). Dessa forma, alterações no DNA, quando não reparadas, podem comprometer o metabolismo de DNA, acarretando em mutações, que são eventos cujos efeitos estão relacionados aos processos de câncer e

envelhecimento; ou em eventos citotóxicos que ativam vias de morte celular (MENCK; MUNFORD, 2014; POLO; JACKSON, 2011).

Dada a ubiquidade de agentes que podem causar lesões em DNA, e o papel fundamental dessa molécula como repositório de informação genética, durante a evolução os organismos vivos desenvolveram vários mecanismos de resposta a danos ao DNA (DDR, do inglês *DNA damage response*). Em termos gerais DDR pode ser dividida em uma série de vias distintas mas funcionalmente entrelaçadas, que são em grande parte definidas pelo tipo de lesão presente no DNA. Na sua grande maioria essas vias abrangem um conjunto de processos firmemente coordenados os quais incluem a detecção de danos no DNA, acumulação de fatores de reparo e finalmente o reparo efetivamente. Para que esses processos ocorram a maquinaria de resposta ao dano ao DNA funciona em parceria e coordenada com um conjunto de mecanismos essenciais para a manutenção da integridade do genoma, que vão desde proteínas envolvidas em remodelamento de cromatina para permitir o acesso da maquinaria de reparo além de proteínas envolvidas em transcrição além de controle do ciclo celular (BELL et al., 2011; LORD; ASHWORTH, 2012; WARMERDAM; KANAAR, 2010).

Em sua maioria, as respostas celulares aos danos são iniciadas com a ativação de proteínas chamadas de “sensoras”, que detectam a presença de modificações no DNA. Entre essas estão as proteínas ATM, ATR, DNA-PKcs além de membros da família de poli (ADP) ribose polimerase (PARP). ATM, ATR, DNA-PKcs são pertencentes à família de proteínas quinases relacionadas a família das PI3K (fosfatidilinositol-3-fosfato quinases). Essas atuam na detecção dos danos e através de cascatas de fosforilação transmitem o sinal para moléculas “transdutoras”, que por sua vez conduzem esses sinais para as moléculas “efetoras” (CICCIA; ELLEDGE, 2010; HARPER; ELLEDGE, 2007; LORD; ASHWORTH, 2012).

Em situações nas quais ocorrem quebras de fitas simples, a ligação da proteína de replicação A (RPA), que tem alta afinidade por regiões de DNA fita simples, a esses substratos parece consistir no sinal para recrutamento dessas quinases. No caso de quebras de fitas dupla no DNA, poucos minutos após sua formação a proteína ATM é recrutada e fosforila diferentes proteínas que são essenciais para a sinalização de danos e reparo do DNA. Um alvo proximal da atividade nessa cascata de sinalização é a histona H2AX que, após a sua

fosforilação no local do dano por ATM, DNA-PK ou ATR, atua no recrutamento de proteínas que iniciam o processo de remodelagem da cromatina, o que é essencial para o acesso da maquinaria de reparo (CICCIA; ELLEDGE, 2010; CIMPRICH; CORTEZ, 2008; JACKSON; BARTEK, 2009). Além da fosforilação de histonas, ATM e ATR agem reduzindo a atividade da quinase dependente de ciclina (CDK2), através da ativação da transcrição de *p53*. Isso resulta em retardo na progressão do ciclo celular, ocasionando um aumento do tempo disponível necessário para que o reparo das lesões de DNA ocorra em etapa anterior a replicação ou a divisão celular (JACKSON; BARTEK, 2009; SU, 2006).

Vias especializadas de reparo de DNA, as quais descreveremos adiante, foram selecionadas durante a evolução e atuam desde eventos iniciais de reconhecimento das lesões até a completa remoção das mesmas, culminando na restauração da informação genética original. Alternativamente, caso os danos ao DNA não possam ser removidos, principalmente as quebras tanto de fitas simples quanto de fitas duplas no DNA, são induzidos mecanismos de sinalização crônica os quais provocam a senescência celular ou morte celular por apoptose (BARTEK; LUKAS, 2007; CIMPRICH; CORTEZ, 2008; JACKSON; BARTEK, 2009; MAGNANDER; ELMROTH, 2012; SU, 2006)(GIGLIA-MARI; ZOTTER; VERMEULEN, 2011; HOUTGRAAF; VERSMISSSEN; VAN DER GIESSEN, 2006; MOORHEAD; TRINKLE-MULCAHY; ULKE-LEMÉE, 2007). A Figura 1 esquematiza os principais agentes genotóxicos de importância biológica e as possíveis respostas celulares aos danos causados por esses agentes.

Figura 1. Esquema simplificado das diferentes fontes de danos ao DNA e as diferentes respostas celulares desencadeadas.

1.2 Estrutura e organização do genoma mitocondrial

As mitocondrias constituem notáveis organelas presentes no citoplasma da maioria das células eucarióticas e essenciais para a sobrevivência das mesmas, uma vez que estas desempenham diversas funções necessárias para o funcionamento celular. No interior dessas organelas ocorrem reações para a completa oxidação de biomoléculas e geração de ATP, reações de vias biossintéticas do grupo heme da hemoglobina, metabolismo de cálcio, além de alguns eventos da resposta celular a estresse tais como morte celular por apoptose e autofagia (MCBRIDE; NEUSPIEL; WASIAK, 2006; NUNNARI; SUOMALAINEN, 2012). A notabilidade dessas organelas não se dá apenas pelos diversos papéis desempenhados mas também por uma característica peculiar que é a existência de seu próprio genoma, distinto do genoma nuclear.

Evidências da existência do genoma mitocondrial vêm de cerca de 45 anos atrás quando, através do uso de microscopia eletrônica, foi verificada a presença de um genoma circular, em torno de 5 μ m, dentro de mitocôndrias de células

provenientes de camundongos e aves (BOGENHAGEN, 2012; NASS; NASS, 1963). A existência do genoma mitocondrial foi posteriormente confirmada bioquimicamente quando Tewari e colaboradores isolaram e caracterizaram o DNA mitocondrial de leveduras (TEWARI KK, JAYARAMAN J, 1965). Paralelamente, Humm e Humm (1966) demonstraram a presença de RNA em mitocôndrias de fígado e cérebro de camundongos (HUMM, D.G., HUMM, 1966), o que juntamente com a identificação de uma atividade de RNA polimerase dependente de DNA em mitocôndrias de *Neurospora* (REICH, 1964) indicou a existência de um sistema autônomo de codificação de proteínas intramitocondrial. Posteriormente, todos os componentes necessários a replicação, transcrição e tradução do DNA mitocondrial foram identificados em mitocôndrias de eucariotos inferiores e superiores, incluindo o homem (FALKENBERG; LARSSON; GUSTAFSSON, 2007; TAANMAN, 1999).

De fato, a existência de um genoma circular, que apresenta homologia de sequência significativa com alguns genomas bacterianos (α -proteobactérias) já sugere a origem evolutiva dessas organelas. Postula-se que as mitocôndrias são resultantes de um evento simbiótico ocorrido cerca de 2,5 a 2 bilhões de anos atrás, no qual uma bactéria aeróbica foi internalizada por um organismo pré-eucariótico anaeróbico, provavelmente um *Archea* (JANSEN, 2000; SCHWARTZ; DAYHOFF, 1978). Essa simbiose resultou em sucesso evolutivo uma vez que trouxe para o novo organismo pré-eucariótico a capacidade de realizar a oxidação completa dos substratos e a consequente obtenção de mais energia. Além disso, e talvez mais importante, o fato de que esse simbiote consumia oxigênio molecular deve ter provido uma proteção relevante do organismo frente a toxicidade do O₂ e espécies reativas derivadas, num momento em que a concentração de oxigênio na atmosfera estava aumentando significativamente (ANDERSSON et al., 1998; JANSEN, 2000).

Ao longo da evolução dessa simbiose parte dos genes bacterianos foram incorporados ao núcleo e outros mantidos no genoma mitocondrial. Os genes que foram mantidos no genoma mitocondrial são aqueles responsáveis pela produção de 13 proteínas (todas componentes dos complexos da fosforilação oxidativa, localizada na membrana interna mitocondrial), juntamente com 2 rRNAs e 22 tRNAs, os quais são necessários para a síntese proteica no interior dessas organelas (ANDERSON et al., 1981).

O genoma mitocondrial humano (mtDNA) consiste em um duplex circular de 16.569 pb (www.mitomap.org). As fitas componentes desse duplex possuem composição assimétrica de purinas e pirimidinas, o que acarreta em apresentarem densidades diferentes quando submetidas a centrifugação em um gradiente de densidade. Em função disso, essas são comumente denominadas de fita pesada (*heavy*, fita H) e de fita leve (*light*, fita L), representando a fita mais enriquecida em guaninas e a fita mais enriquecida em citosinas, respectivamente (ANDERSON et al., 1981). Quanto à sua organização gênica, a única região não-codificadora é o D-loop (*displacement loop*), o qual contém os promotores necessários para a transcrição das duas fitas além de sequências regulatórias, que são necessárias para a replicação e transcrição do mtDNA. O mtDNA é transcrito em dois transcritos policistrônicos, um para cada fita, à partir dos dois promotores presentes no D-loop, que são posteriormente processados nos transcritos maduros de cada gene. A densidade informacional do mtDNA é extremamente alta e, de fato, esse é tão condensado que muitas vezes há uma sobreposição de algumas sequências codificantes (ANDERSON et al., 1981; REBELO; DILLON; MORAES, 2011; SHADEL, 2008) (figura 2).

Figura 2. Mapa do mtDNA humano. (OH e OL) são as origens de replicação da fita pesada e leve, respectivamente: (ND1-ND6) são subunidades de NADH desidrogenase (ETC complexo I) subunidade 1-6; (COX1-COX3) são subunidades da citocromo oxidase 1-3 (ETC- complexo IV); (ATP6 e ATP 8) são as subunidades 6 e 8 da ATPase (complexo V); (Cyt b) citocromo b (complexo III) (ALEXEYEV et al., 2013).

Estudos recentes tem sugerido que o mtDNA está compactado em grandes complexos nucleoproteicos os quais são denominados de nucleóides. Cada nucleóide é constituído por múltiplas cópias de mtDNA associadas a proteínas. A proteína TFAM (Fator de Transcrição Mitocondrial A) é o principal componente desse nucleóide e se liga e recobre todo o mtDNA promovendo o empacotamento do mesmo, em uma forma análoga ao que ocorre com as histonas no DNA nuclear (CAMPBELL; KOLESAR; KAUFMAN, 2012). TFAM, assim como a maioria absoluta

das cerca de 800 a 1200 proteínas que compõe o proteoma mitocondrial, são codificadas pelo genoma nuclear e translocadas para a mitocôndria (CALVO; MOOTHA, 2010).

Uma vez que apenas 13 proteínas são codificadas pelo genoma mitocondrial, isso poderia sugerir que este fosse dispensável e a perda funcional do mesmo causaria apenas um pequeno impacto na função mitocondrial e homeostase celular. No entanto, as 13 proteínas codificadas no mtDNA são subunidades essenciais de 4 dos 5 complexos da fosforilação oxidativa, e quando mutadas podem resultar em alterações catalíticas ou mesmo na incapacidade da montagem dos complexos *per se* (FIGUEIRA et al., 2013). Em células aeróbicas, a maioria de ATP celular é gerado pela fosforilação oxidativa na mitocôndria; desta forma, alterações moleculares que impactassem seu correto funcionamento certamente acarretariam um desbalanço energético importante para a célula. Esse efeito é atestado em humanos pela existência de uma série de síndromes causadas por mutações em genes que codificam proteínas mitocondriais, tanto no mtDNA quanto no genoma nuclear. Em conjunto, as chamadas síndromes mitocondriais representam o maior grupo de doenças genéticas definidas e estima-se que 1 em cada 5.000 nascidos vivos possui alguma dessas doenças (CALVO; MOOTHA, 2010). De fato, esse número relativamente alto é em parte decorrente da compactação gênica do genoma mitocondrial. Essa alta densidade de informação aumenta a probabilidade de que pequenas alterações na sequência, tais como mutações pontuais ou pequenas deleções, tenham um impacto funcional na atividade das proteínas codificadas. Além dessas doenças clinicamente distintas, mutações em mtDNA também estão associadas com diversas doenças de amplo espectro clínico, bem como grau variável de letalidade, incluindo doenças de grande impacto em saúde pública como câncer, diabetes, doenças cardiovasculares e doenças associadas ao envelhecimento (CALVO; MOOTHA, 2010; WALLACE, 2010; YAKES; VAN HOUTEN, 1997).

1.3 Danos e Reparo no mtDNA

A descoberta da existência do mtDNA trouxe consigo várias questões a serem respondidas. Uma vez que este, assim como o DNA nuclear, possui grupos reativos e capazes de serem modificados, a existência de mecanismos guardiões desse genoma também seriam um evento provável. Ademais, o mtDNA está fisicamente

associado, através do nucleóide, à face interna da membrana interna mitocondrial, onde são geradas grandes quantidades de espécies reativas de oxigênio (EROs) (MUFTUOGLU; MORI; SOUZA-PINTO, 2014). De fato, lesões oxidadas são as mais comumente detectadas em mtDNA, e geralmente em maior número do que no DNA nuclear. Além destas, diversos outros agentes podem causar danos ao mtDNA, os quais estão sumarizados a seguir (ALEXEYEV et al., 2013; MUFTUOGLU; MORI; SOUZA-PINTO, 2014).

Danos oxidativos: o tipo de dano mais prevalente e melhor estudado nessa organela, visto que a mesma é o principal sítio celular de geração de espécies reativas (EROs).

Alquilações: são adições covalentes de grupos alquil, causadas tanto por agentes exógenos (alguns quimioterápicos como nitrosuréis e ciclofosfamida, por exemplo) como por endógenos, como o doador de grupamentos metil S-adenosilmetionina, que pode metilar o DNA não enzimaticamente. A saber, mitocôndria possui cerca de 30% do *pool* total de S-adenosilmetionina.

Danos hidrolíticos: são decorrentes de desaminação de bases, com predominância de citosinas, além de formação de sítios abásicos, resultantes da hidrólise espontânea da ligação glicosídica.

Formação de adutos volumosos: alguns compostos heterocíclicos podem se adicionar covalentemente ao DNA, e em alguns casos podem danificar preferencialmente o mtDNA. Esses podem ser provenientes de fontes exógenas (como cigarro ou outros agentes químicos) bem como endógenas (por exemplo estrogênios).

Mal-pareamento de bases: resultam da modificação de bases nitrogenadas já incorporadas ao DNA, como a desaminação de citosina gerando timina, que gera um par T-G. Podem ser formados também durante a replicação, através da incorporação de um par não canônico, ou da incorporação de um dNTP já modificado, como por exemplo 8-OH-dGTP.

Quebras de fitas do DNA: caracterizam-se pela ruptura da ligação fosfodiéster em uma ou ambas as fitas do DNA. Em ambos os casos isso ocorre de forma direta, pela ação de agentes tóxicos, ou como resultado de falhas no reparo de outras lesões no DNA.

Embora existam tantas fontes de danos ao mtDNA, nos momentos iniciais após a descoberta do mtDNA foi sugerido que as mitocôndrias seriam incapazes de reparar danos ou que até mesmo possuíam vias limitadas de reparo. Essa noção surgiu em decorrência de um trabalho no qual danos que foram induzidos por luz ultravioleta (UV), a qual gera majoritariamente dímeros de pirimidina, não foram reparados nas mitocôndrias (CLAYTON; DODA; FRIEDBERG, 1974). Essas modificações são substratos para a via de reparo por excisão de nucleotídeos (NER). Enquanto que a existência de NER em mitocôndrias continua improvável, desde então um grande volume de conhecimento tem sido agregado sobre a existência de vias de reparo nessa organela por diferentes grupos (ALEXEYEV et al., 2013; GREDILLA; BOHR; STEVNSNER, 2010b; LEDOUX et al., 1992; PASCUCCHI et al., 1997).

Mitocôndrias são capazes de reparar bases mal pareadas resultantes da incorporação errônea durante a replicação ou devido a modificações de bases (oxidação, metilação) após já terem sido adicionadas. A atividade de reparo de mal pareamento (MMR) em mitocôndrias de mamíferos parece ser independente do core de proteínas da via nuclear (MSH2, MSH3, MSH6, ou MLH1), visto que essas proteínas não foram identificadas nessa organela. Além disso, extratos celulares provenientes de células mutantes para essas proteínas não mostraram redução nessa atividade de reparo. A atividade de MMR em mitocôndrias de ratos foi inicialmente identificada em experimentos *in vitro* usando extratos mitocondriais (MASON & LIGHTOWLERS, 2003). E, enquanto que a identidade molecular da maioria dos componentes da via de MMR mitocondrial ainda não foi identificada, a proteína YB-1 parece desempenhar um papel de reconhecimento do pareamento errôneo, uma vez que essa foi precipitada de extratos mitocondriais utilizando oligonucleotídeos contendo pares não-canônicos e pequenas alças. Além disso, extratos mitocondriais depletados de YB-1 apresentavam uma redução na atividade de MMR no mesmo ensaio *in vitro* utilizado para caracterizar a via mitocondrial (Souza-Pinto et al., 2009). Isso evidenciou que a identificação das lesões e reparo de MMR mitocondrial é diferente da via nuclear e dependente da proteína YB-1 (DE SOUZA-PINTO et al., 2009a; MASON; LIGHTOWLERS, 2003).

Enquanto a via de reparo por excisão de nucleotídeos é inexistente em mitocôndrias, o reparo por excisão bases (BER) além de ser sido o primeiro a ser

identificado é atualmente o mais conhecido é também o mais atuante nessa organela (DIANOV et al., 2001; MUFTUOGLU; MORI; SOUZA-PINTO, 2014). Essa via destina-se ao reparo de pequenas modificações no DNA e que não perturbam significativamente a conformação da dupla hélice, tais como causadas por alquilação, desaminação ou oxidação de bases. Para essa via, sabe-se que a mesma é bastante conservada entre o núcleo e a mitocôndria, utilizando ou as mesmas isoformas, em alguns casos, ou isoformas distintas das mesmas enzimas, em outros. Em todos os casos, entretanto, as enzimas nuclear e mitocondrial são produtos do mesmo gene. Ambos BER nuclear e mtBER ocorrem através de uma sequência de reações que começa com o reconhecimento do dano e sendo seguido por passos de processamento enzimático os quais visam remover a lesão e restaurar a integridade genômica. Essa sequência de reações incluem quatro etapas distintas: (i) de reconhecimento e de remoção da base modificada, (ii) o processamento do sítio apurínico / apirimidínico (AP) gerado, (iii) incorporação do nucleotídeo correto, e (iv) ligadura vertente (ALEXEYEV et al., 2013; BLASIAK et al., 2013; MUFTUOGLU; MORI; SOUZA-PINTO, 2014; SVILAR et al., 2011).

Durante o reparo por excisão de bases ocorre a clivagem enzimática da ligação fosfodiéster para que o açúcar resultante da hidrólise da base modificada seja retirado do DNA. Sendo assim, são geradas quebras de fitas simples no mtDNA. Para que essas sejam reparadas o processo é bem semelhante ao reparo de BER, e de fato, a via de reparo de quebras de fitas simples compartilha com essa via as etapas de síntese de DNA e ligação das pontas. E por isso esse reparo é muitas vezes considerado como uma sub-via de BER (ALEXEYEV et al., 2013; HEGDE; IZUMI; MITRA, 2012).

Além da capacidade de reparar lesões nas qual apenas uma das fitas de DNA é comprometida, sabe-se atualmente que essa organela é capaz de reparar danos mais severos em que ambas as ligações fosfodiésteres das fitas são rompidas, formando quebras de duplas fitas no mtDNA. As evidências experimentais para a presença de mecanismos de reparo de quebras de fitas duplas em mtDNA serão apresentadas adiante, na seção 1.5. No entanto, pouco é sabido sobre as mesmas e desde então a literatura tem se dedicado a confirmar a existência dessas atividades nas mitocondrias, bem como identificar as proteínas responsáveis por tais atividades (ALEXEYEV et al., 2013).

Em suma, embora se pensasse anteriormente que mitocôndrias fossem incapazes de reparar danos no DNA, cerca de 40 anos de pesquisas tem mostrado que essas organelas possuem quase todas as vias presentes no núcleo e são capazes de manter a integridade do seu genoma através de vias especializadas de reparo (GREDILLA; BOHR; STEVNSNER, 2010a). Na maioria das vias mitocondriais estudadas até o momento, as atividades enzimáticas observadas são geralmente semelhantes àsquelas encontradas no núcleo. É importante ressaltar que todas as enzimas de reparo, bem como as envolvidas em replicação e transcrição do mtDNA, são codificadas por genes nucleares e direcionadas para essa organela após a tradução (KAZAK; REYES; HOLT, 2012) (figura 3).

Reparo de mtDNA em células de mamíferos		
Tipo de dano ao DNA	Via de reparo	Existência em mitocôndrias
Metilação de bases (O ⁶ ou N ⁷) da guanina	Reparo direto	Sim
Oxidação ou desaminação de bases	Reparo por excisão de bases	Sim
Adutos de DNA ou <i>crosslinks</i> DNA / proteínas	Reparo por excisão de nucleotídeos	Não
Bases mal pareadas	Reparo de mal pareamento	Sim
Quebra de dupla fita de DNA	NHEJ	?
Quebra de dupla fita de DNA	Recombinação homóloga	?
Quebra de dupla fita de DNA	Reparo por anelamento de fita simples (SSA)	?

Figura 3. Compilação dos tipos de danos ao DNA bem como vias de reparo correspondentes e sua existência em mitocôndrias. Figura produzida a partir de informações contidas em (ALEXEYEV et al., 2013; GREDILLA; BOHR; STEVNSNER, 2010b)

1.4 Reparo de Quebras de duplas fitas em células de mamíferos

As quebras de duplas fitas no DNA são caracterizadas pela ruptura concomitante das ligações fosfodiésteres na mesma região, ou em regiões próximas de ambas as fitas de DNA. Sendo assim, essa dupla ruptura tem como consequência o desligamento físico da integridade sequencial da informação genética, além da perda do referencial correto que é usado em muitas vias no qual apenas uma das fitas foi comprometida. Dessa forma, quando comparamos esse tipo de lesão com as demais, logo seu nível de complexidade e possível efeito deletério se tornam evidentes. No entanto, embora sejam eventos complexos, as

quebras de duplas fitas no DNA são relativamente frequentes no genoma e estimadas ocorrerem no interior de nossas células cerca de 10 vezes no intervalo de 24 horas (JACKSON; BARTEK, 2009; LIEBER, 2010b).

Quebras de duplas fitas no DNA podem ser decorrentes da exposição a agentes exógenos, tais como radiação ionizante ou agentes quimioterápicos, bem como resultantes de eventos celulares normais. Basicamente essas quebras podem ser provenientes de quatro fontes principais: a primeira e a maior fonte endógena das mesmas são os eventos celulares replicativos nos quais a forquilha de replicação fica impedida de prosseguir devido a lesões no DNA. Nesse caso, para o prosseguimento da mesma são necessários eventos recombinacionais, que por sua vez, são geradores de quebras (LEHMANN; FUCHS, 2006). A segunda maior causa de quebras são as espécies reativas de oxigênio. No decurso da respiração normal as mitocôndrias convertem parte do oxigênio consumido a superóxido, que é rapidamente convertido a peróxido de hidrogênio e, na presença de metais de transição como ferro e cobre, pode ser convertido ao radical hidroxila (KOWALTOWSKI et al., 2009; MURPHY, 2009). O radical hidroxila reage com biomoléculas com uma constante de reação próxima à velocidade de difusão, e pode abstrair hidrogênio da desoxirribose, causando quebras de fitas simples (MUFTUOGLU; MORI; SOUZA-PINTO, 2014). Caso duas quebras de fitas simples sejam geradas próximas e em regiões antiparalelas da cadeia de DNA, essas podem culminar em uma quebra de fita dupla no DNA. A terceira causa de geração de quebras de duplas fitas consiste em radiações ionizantes (IR), incluindo os raios gama e raios X. À medida que essas atravessam os sistemas biológicos, elas podem gerar radicais hidroxila pela radiólise da água, que por sua vez, quando encontram o DNA, podem gerar quebras de fitas simples e duplas (FRIEDBERG; FRIEDBERG, 2003). Por fim, outra causa de quebras de duplas fitas consiste em erros durante o ciclo catalítico de topoisomerases do tipo II. Essas fazem quebras na dupla fita de DNA e caso a etapa de religação seja comprometida, as quebras de duplas fitas são mantidas no genoma (ADACHI et al., 2003).

Em vários contextos especializados as quebras de duplas fitas no DNA podem ser benéficas e resultarem em diversidade genética. Um exemplo são as quebras que ocorrem nos genes de imunoglobulina e constituem eventos importantes na geração de diversidade genética em receptores antigênicos. Além disso, durante a

meiose quebras de fitas duplas são essenciais para a geração de gametas com combinação alélica distinta da linhagem parental através de eventos recombinacionais (CHAPMAN; TAYLOR; BOULTON, 2012; DUDLEY et al., 2005; KEENEY; NEALE, 2006). No entanto, em outros contextos, essas quebras ao invés de gerarem diversidade genética, podem ser processadas de forma errônea e gerar instabilidade genômica com perda de informação genética ou rearranjos cromossômicos, que parecem ser eventos moleculares fundamentais na etiologia de distúrbios neurológicos e câncer (JACKSON; BARTEK, 2009; MCKINNON, 2009).

Diante da diversidade de fontes geradoras de quebras de duplas fitas no DNA e a severidade dessas lesões, vias de reparo especializadas evoluíram para manter a integridade do genoma. Basicamente as quebras de duplas fitas podem ser reparadas por três mecanismos distintos: ligação de extremidades não homólogas (do inglês, *non-homologous end joining* NHEJ), recombinação homóloga (do inglês, *homologous recombination* HR), além de anelamento de fitas simples de DNA (do inglês, *single-strand annealing* SSA), sendo esses processos conservados desde procariotos até eucariotos superiores (KASS; JASIN, 2010; LIEBER, 2010a; SAN FILIPPO; SUNG; KLEIN, 2008). Enquanto a via de NHEJ requer pouca ou nenhuma homologia entre as extremidades do DNA, e ocorre em todas as etapas do ciclo celular, a HR é mais restrita ao final da fase S e G2 do ciclo celular, após a duplicação das cromátides onde as cromátides irmãs provêm regiões de homologia, necessárias para esse reparo (LIEBER, 2010a; SAN FILIPPO; SUNG; KLEIN, 2008). Para a via SSA as regiões de homologia são requeridas, embora pouco é conhecido sobre a mesma (KASS; JASIN, 2010). A seguir detalharemos um pouco mais de cada uma dessas vias.

1.4.1 Recombinação Homóloga (HR)

O conhecimento atual sobre o mecanismo de recombinação homóloga em células de mamíferos é em grande parte proveniente de estudos genéticos em *Saccharomyces cerevisiae*, que permitiram a identificação de genes relacionados ao reparo de danos ao DNA causados por radiação ionizante. Fenótipos hiper- ou hiporecombinacionais resultantes da mutação de alguns genes evidenciaram sua participação em reparo. Esses genes pertencem ao grupo epistático de RAD52, e são eles: RAD50, RAD51, RAD52, RAD54, RAD55, RAD57, RAD59, RDH54 [TID1], MRE11 [RAD58] e XRS2. Desde então, homólogos tem sido identificados em muitos

eucariotos e em alguns casos em eubactérias e arqueas, indicando uma alta conservação da via de reparo por recombinação, demonstrando assim a sua importância na manutenção da integridade do genoma (HEYER; EHMSSEN; LIU, 2010; SAN FILIPPO; SUNG; KLEIN, 2008).

Em mamíferos, após a quebra de dupla fita de DNA, o reparo através de recombinação homóloga é iniciado pela ressecção nucleolítica da fita 5'-3' de DNA por um complexo chamado MRN (Mre11-Rad50-Nbs1), produzindo fitas simples (ssDNA) contendo OH livre no terminal 3', que são capazes de invadir o duplex de DNA contendo a região homóloga (JAZAYERI et al., 2008; RUPNIK; LOWNDES; GRENON, 2010). Essas fitas simples contendo OH livre no terminal 3' são substrato para a ligação da proteína de replicação A (RPA). Experimentos *in vitro* mensurando a afinidade dessa proteína pelo DNA mostraram que a afinidade de RPA pelo DNA é maior do que a de Rad51. Além disso, com o uso de co-imunoprecipitação de cromatina foi mostrado que a associação de RPA ao filamento de fita simples precede a ligação de Rad51 (KREJCI et al., 2012). Dessa forma, essa proteína forma um filamento cobrindo a fita simples de DNA, impedindo a formação de estruturas em grampo bem como a degradação nucleolítica do mesmo. Em seguida ocorre o recrutamento subsequente dos demais fatores envolvidos em HR, tais como Rad51, homóloga da proteína *RecA* de *E. coli*. Semelhante a *RecA*, Rad51 liga cooperativamente no filamento de fita simples do DNA (ssDNA) em um complexo ternário com ATP em uma estequiometria de 1 proteína a cada 3-4 nucleotídeos, formando um filamento chamado de fragmento pré-sináptico (Rad51-ssDNA). A formação desse fragmento é auxiliada pela associação de mediadores. Entre esses mediadores estão BRCA2, Rad54, XRC, e Rad52 (KASS; JASIN, 2010; OGAWA et al., 1993; SAN FILIPPO; SUNG; KLEIN, 2008; YUAN et al., 1999).

A formação do complexo entre Rad51 e Rad52 estabiliza e suplanta o efeito inibitório de RPA, o que possibilita a formação do fragmento pré-sináptico, que será responsável pela captura do duplex de DNA e a busca de regiões homólogas. Uma vez encontradas essas regiões de homologia, o filamento pré-sináptico com a ajuda da proteína Rad54 formará pareamentos canônicos com o duplex resultando na formação de *D-loops* (HEYER et al., 2006; SAN FILIPPO; SUNG; KLEIN, 2008). Uma vez formados, esses *D-loops* podem ser resolvidos através da síntese dependente de anelamento. Nessa resolução, apenas uma das fitas contendo a

região 3' OH é capturada e estendida usando a fita intacta como molde, seguida por dissociação, o que resulta na formação de apenas produtos não-*crossover*, ou seja, sem trocas físicas entre cromátides irmãs. Caso aconteça a captura de ambas fitas de DNA contendo 3' OH ocorre a formação de junções de Holliday, cuja resolução depende de proteínas como GEN1 e SLX1/SLX4, sendo possível a formação tanto de produtos não-*crossover* quanto *crossover*. Enquanto que os produtos *crossover* facilitam a segregação cromossomal durante a recombinação meiótica, o mesmo evento pode resultar em efeitos deletérios durante a mitose, incluindo perda de heterozigose (CHU; HICKSON, 2009; KASS; JASIN, 2010; SAN FILIPPO; SUNG; KLEIN, 2008; WYMAN; KANAAR, 2006). A figura 4 apresenta um esquema simplificado da sequência de eventos moleculares da via de recombinação homóloga.

Figura 4. Via de reparo de quebras de duplas fitas através de recombinação homóloga (HR).

Após a quebra de dupla fita o DNA sofre processamento seguido por ligação da proteína RPA as fitas simples contendo 3' OH livre. Ocorre o recrutamento de Rad51, Rad52 e Rad54 que iniciam a invasão da fita intacta e busca por regiões de homologia seguida pela formação de D-loop. Esses serão resolvidos de formas diversas resultando em não *crossover* HR ou *crossover* HR. O DNA

contendo a quebra de dupla fita é mostrado em preto, já a cromátide irmã em vermelho e o DNA recém sintetizado em azul. Figura adaptada e traduzida de (KHALIL et al., 2012).

Em diferentes modelos, que incluem desde *Saccharomyces cerevisiae* até seres humanos, as mutações em genes que codificam proteínas envolvidas em HR resultam em sensibilidade extrema a agentes que causam danos ao DNA, tais como radiação ionizante (SAN FILIPPO; SUNG; KLEIN, 2008). Muitas das vezes mutações (deleções) desses genes são letais devido ao acúmulo de quebras de duplas fitas, aberrações cromossômicas ou em decorrência de bloqueios replicativos. Já em mutantes condicionais o desenvolvimento tumoral em decorrência de instabilidade genômica também é frequente (LI; HEYER, 2008; SAN FILIPPO; SUNG; KLEIN, 2008). De fato a relação entre as proteínas envolvidas em HR, estabilidade genômica e supressão tumoral surgiu logo em seguida à descoberta de que Rad51 é importante na manutenção da integridade genômica de mamíferos. Através da interação com Rad51 proteínas como BRCA1 e BRCA2 são recrutadas e fazem parte do complexo proteico (focos) formado na região de danos de DNA. Assim como *RAD51*, deleções de *Brca1* ou *Brca2* levam à letalidade embrionária (EVERS; JONKERS, 2006; MOYNAHAN, 2002). Além disso, mutações nesses genes correlaciona-se com instabilidade genômica, defeitos em recombinação além de aumento de sensibilidade a agentes causadores de danos ao DNA (LI; GREENBERG, 2012). Fenótipos de acúmulo de aberrações cromossômicas, deleções, translocações e fusões cromossômicas são eventos comuns em células contendo mutações em *BRCA1* e *BRCA2*. Ademais, mutações nessas proteínas estão relacionadas a malignidade celular e susceptibilidade a vários cânceres, incluindo câncer de mama e de ovário (MOYNAHAN; JASIN, 2010; VENKITARAMAN, 2014).

Para as proteínas componentes do complexo MRN e também envolvidas em HR o nocaute gênico acarreta em letalidade embrionária (LAMARCHE; ORAZIO; WEITZMAN, 2010). Em humanos, uma mutação no gene que codifica a proteína Nbs1 (deleção de 5pb no gene) está relacionado ao desenvolvimento da síndrome de quebras de Nijmegen, uma síndrome autossômica recessiva que leva a instabilidade genômica, retardo no crescimento, imunodeficiência além de predisposição ao câncer. De modo semelhante, as células provenientes desses pacientes apresentam hiper sensibilidade a radiação além de possuírem fenótipos comuns de retardo de

crescimento e instabilidade genômica (LAMARCHE; ORAZIO; WEITZMAN, 2010; VARON et al., 1998). Já mutações na proteína *MRE11* conduzem ao desenvolvimento da síndrome nomeada como “*Ataxia-telangiectasia like disorder (A-TLD)*” que em humanos relaciona-se com desordens neurodegenerativas além do aparecimento de linfomas (LAMARCHE; ORAZIO; WEITZMAN, 2010; TAYLOR; GROOM; BYRD, 2004).

Mutações na proteína ATM desencadeiam a síndrome Ataxia Telangiectasia (A-T) que é uma síndrome autossômica recessiva que causa uma desordem neurodegenerativa caracterizada por pronunciada degeneração cerebelar, além de predisposição ao câncer. Pacientes A-T apresentam sintomas adicionais de imunodeficiência, retardo de crescimento, envelhecimento prematuro e resistência a insulina. Em concordância com a função de ATM em reparo, os fibroblastos derivados desses pacientes são mais susceptíveis a agentes que causam danos ao DNA, tais como H_2O_2 , e EROs. Além disso, a conexão entre ATM e danos mitocondriais tem sido mostrado usando células provenientes de pacientes, células silenciadas com *siRNA* ou de camundongo nocaute. Em todos esses modelos, a ausência funcional de ATM resulta em aumento na geração de EROs e danos persistentes ao mtDNA, possivelmente em decorrência de deficiência no reparo de lesões oxidadas. Adicionalmente ocorre diminuição na produção de deoxiribonucleotídeos trifosfatados decorrente da função de ATM na regulação da ribonucleotídeo redutase (AMBROSE; GATTI, 2013; AMBROSE; GOLDSTINE; GATTI, 2007; SHARMA et al., 2014).

Sendo assim, o conjunto dessas evidências citadas acima nos mostram que as proteínas envolvidas em reparo de quebras de duplas fitas através de HR atuam como verdadeiras guardiãs da integridade genômica, prevenindo a ocorrência de aberrações cromossômicas e consequentemente o desenvolvimento de câncer e neurodegeneração.

1.4.2 Anelamento de fitas simples de DNA (Single Strand Annealing - SSA)

Essa via de reparo requer sequências com homologia, no entanto ela se distingue da recombinação homóloga. Após a quebra de dupla fita, o início desse reparo também envolve a ressecção nucleolítica da fita no sentido 5'-3' de DNA pelo complexo MRN (Mre11-Rad50-Nbs1). Entretanto após essa etapa, caso existam

sequências repetidas em ambos os lados da quebra ocorrerá o anelamento das fitas simples nessas regiões repetidas, seguida pelo processamento das pontas não aneladas, o que resulta na perda das sequências entre essas regiões repetidas. Dessa forma, esse reparo quando comparado à recombinação homóloga, é não fiel pois leva a perda da informação genética.

Em mamíferos, as principais proteínas envolvidas nesse processo são Rad52, na etapa de anelamento, além de ERCC1, Rad1 e Rad10 (flap endonucleases) (BOHR, 2002; KASS; JASIN, 2010; KULKARNI; THOMAS; TUCKER, 2011; MORTENSEN et al., 1996; SINGLETON et al., 2002). SSA possibilita o reparo de quebras de duplas fitas em mecanismo menos complexo do que a recombinação uma vez que não exige a interação de diversas cadeias de DNA e a consequente formação de junções de Holliday. No entanto quando comparada a HR essa via é considerada um mecanismo não conservativo uma vez que gera deleções das sequências entre as regiões repetidas. Dessa forma, considerando células que possuem muitas regiões repetidas, tais como o genoma humano no qual 50% do genoma corresponde a sequências repetidas, essa via poderia ser uma importante fonte geradora de deleções (STORICI et al., 2006; SYMINGTON, 2002).

A figura 5 apresenta um esquema dos eventos conhecidos dessa via.

Figura 5. Via de reparo de quebras de duplas fitas através de anelamento de fita simples de DNA (SSA). Após a quebra de dupla fita o DNA sofre processamento nucleolítico seguido por ligação da proteína RPA as fitas simples contendo 3'OH livre. Ocorre o recrutamento de Rad52, que busca por regiões de homologia. Quando essas são encontradas ocorre o anelamento de DNA seguido por resecção endonucleolítica, síntese de pequeno fragmento de nucleotídeos e ligação fosfofiester unindo as extremidades. Figura traduzida de (KHALIL et al., 2012).

1.4.3 *Ligação de extremidades não homólogas (NHEJ- Non Homologous End Joining)*

O reparo por NHEJ tem início com a ligação do heterodímero Ku nas pontas livres de DNA. A proteína Ku foi originalmente identificada como uma proteína nuclear abundante em soro de pacientes auto-imunes. Em seguida verificou-se que essa era componente de um heterodímero de ligação DNA composto pelas proteínas Ku70 e Ku86, as quais foram designadas baseado na mobilidade eletroforética (70 kDa e 83 kDa, respectivamente) (LIEBER, 2010b; MIMORI; HARDIN; STEITZ, 1986; MIMORI et al., 1981). Um pouco mais tarde a atuação dessas proteínas no reparo de quebras de duplas fitas de DNA foi evidenciada através de experimentos de complementação em células de ovário de hamster chinês sensíveis a radiação (GRUNDY et al., 2014; TACCIOLI et al., 1994)

As subunidades do heterodímero Ku apresentam sequências muito semelhantes, o que sugere que ambas possuem ancestralidade comum (DYNAN; YOO, 1998). De fato, desde bactérias até eucariotos superiores todos os homólogos

dessas proteínas compartilham o domínio central (*core*), que media a ligação ao DNA e heterodimerização (DOHERTY; JACKSON; WELLER, 2001; GRUNDY et al., 2014). Em bactérias, a proteína Ku é composta apenas por esse domínio central. Já no caso de eucariotos, domínios adicionais e semelhantes são encontrados em ambas proteínas Ku (Ku70 e 86). Além do domínio central, as proteínas Ku possuem o domínio Wilebrand (vWA) na região N terminal, envolvido em interação proteína-proteína. Já na região C terminal essas proteínas são divergentes, uma vez que a subunidade 70 possui o domínio SAP, envolvido em ligação ao DNA, enquanto a subunidade 86 possui uma região de interação com DNA-PKCs (DOWNS; JACKSON, 2004; LIEBER, 2010b) (figura 6).

Figura 6. Representação esquemática dos domínios das proteínas Ku70/86 e DNA-PKCs. No heterodímero Ku70/86 vWA consiste no domínio von Willebrand. SAP (SAF-A/B, Acinus e PIAS) consiste no domínio que pode estar envolvido na ligação ao DNA. Já na região C terminal de Ku86 existe um domínio responsável pela interação com DNA-PKCs. No esquema de DNA-PKCs, os sítios de auto-fosforilação são identificados em vermelho e a função dos mesmos (A-E, L, M, P-R) além de (N e JK) ainda está em estudo. Para o sítio Thr2609/ABCDE sabe-se que este é necessário para a dissociação dessa proteína do heterodímero Ku e do DNA. LRR consiste em uma região rica em leucina, enquanto FAT-C refere-se ao domínio FAT na região N terminal, onde também podem

ser encontrados os domínios PI3K e PRD que constituem o domínio de quinase e o seu domínio regulatório, respectivamente. Figura adaptada de (LIEBER, 2010a).

Estudos cristalográficos do heterodímero Ku ligado ao DNA mostram que este assume uma estrutura toroidal, contendo o interior com aminoácidos carregados negativamente, o qual liga-se ao DNA que acomoda-se no interior dessa cavidade de forma independente da sequência, abrangendo uma extensão mínima de 14 nucleotídeos (WALKER; CORPINA; GOLDBERG, 2001; WU; LIEBER, 1996; WYMAN; KANAAR, 2006). Uma vez ligado ao DNA, esse heterodímero recruta a proteína quinase dependente de DNA (DNA-PKCs) formando um complexo chamado DNA-PK (Ku e DNA-PKCs), no qual Ku funciona como a subunidade regulatória da quinase (DING et al., 2003; LIEBER, 2010b). De fato essa quinase pode ligar-se sozinha ao DNA, no entanto experimentos *in vitro* usando proteínas purificadas mostraram que a presença de Ku aumenta em cerca de 100 vezes a ligação ao DNA de DNA-PKCs. Ademais, para a montagem do complexo DNA-PK é necessária a interação entre a proteína DNA-PKCs e os resíduos de aminoácidos presentes na região C terminal de Ku86, cuja exposição depende de mudanças conformacionais que aparentemente só ocorrem na presença de DNA, resultando em acesso a esses e possibilitando a interação de Ku86 e DNA-PKCs (GRUNDY et al., 2014)

Após a formação do complexo DNA-PK, o heterodímero Ku que estava ligado às pontas do DNA transloca-se para longe da extremidade, permitindo a acomodação DNA-PKCs nessas regiões. Uma vez que as quebras de duplas fitas de DNA podem gerar extremidades com diferentes características e estruturas, para que essas sejam ligadas através da via de NHEJ é necessário o uso de diferentes etapas de processamento que incluem clivagens e polimerização de nucleotídeos. A remoção de nucleotídeos modificados, contendo sítios abásicos pode ser catalisada pela atividade de 5'dRP/AP liase, identificada recentemente na subunidade Ku70 do heterodímero (ROBERTS et al., 2010). Além disso, o processamento pode ser feito pelo fator Artemis, que é recrutado para o sítio de lesão através de interação do DNA-PKCs. Essa proteína é responsável pela fosforilação de Artemis levando a ativação de sua atividade exonucleásica 5' - 3', que promove a ressecção das fitas simples de DNA. Ademais, esse complexo (Artemis/DNA-PKCs) é responsável pela

clivagem de uma variedade de caudas de DNA, o que em alguns momentos pode resultar em *gaps* que são preenchidos através da polimerização de nucleotídeos catalisada por polimerases (MA; SCHWARZ; LIEBER, 2005; WATERS et al., 2014). Nesse caso, DNA polimerases μ e λ , as quais interagem com o complexo Ku:DNA via domínios de BRCT (LIEBER, 2010a).

Além da fosforilação de Artemis, DNA-PK sofre auto-fosforilação em diversos sítios e isso também é necessário para o próprio remodelamento da holoenzima, o que possibilita, a seguir, a associação com as proteínas DNA ligase IV/XLF e XRCC4. O recrutamento de XRCC4-LigIV é promovido por uma interação direta entre Ku e o primeiro domínio BRCT de LigIV, após a fosforilação de DNA-PK. Dessa forma essa fosforilação de XRCC4-LigIV melhora a estabilidade desses complexos e demais fatores associados que, em conjunto, serão responsáveis pela ligação das pontas do DNA, finalizando o reparo de NHEJ (DING et al., 2003; DOBBS; TAINER; LEES-MILLER, 2010; GU et al., 2010; KURIMASA et al., 1999a; WYMAN; KANAAR, 2006). Essas etapas estão esquematizadas na figura 7.

Figura 7. Via de reparo através NHEJ- Após a quebra de dupla fita de DNA, essa região é alvo da ligação do heterodímero (70/86) e DNA-PKs formando um complexo. As extremidades do DNA são processadas por endonucleases e polimerases e o reparo é finalizado pela atuação da DNA Ligase IV e XRCC4. Figura adaptada e traduzida de (KHALIL et al., 2012).

A via de NHEJ descrita anteriormente é considerada a via canônica. No entanto, na ausência de alguns fatores dessa via, quebras de duplas fitas em plasmídeos ou cromossomos, geradas através do uso de endonucleases, foram eficientemente reparadas, o que evidenciou a existência de uma via alternativa de reparo, a qual foi designada como via alternativa de ligação de extremidades não homólogas (*alt*-NHEJ). As diferenças entre a via canônica e alternativa ainda são obscuras. No entanto, diferentes artigos indicam que as vias canônica e alternativa de NHEJ parecem diferir na extensão de regiões de microhomologia no sítio de junção, de forma que pequenas sequências homólogas favorecem a via canônica ao passo que regiões maiores favorecem a via alternativa (FRIT et al., 2014; KASS; JASIN, 2010; SIMSEK; JASIN, 2010).

Deficiências no reparo de quebras de duplas fitas no DNA são associadas com instabilidade genômica, que por sua vez é uma característica fundamental para o desenvolvimento do câncer (BURMA; CHEN; CHEN, 2006). Evidências experimentais sobre o papel biológico da via de NHEJ, atuação de seus fatores na manutenção dessa estabilidade genômica e sua relação com o desenvolvimento de câncer vêm, em grande parte, de diversos trabalhos nos quais foram usados modelos biológicos mutantes para cada um dos fatores dessa via. Nesse sentido, experimentos com camundongos que continham mutações para uma das subunidades do heterodímero Ku70/86 (*Ku70*^{-/-}) ou (*Ku86*^{-/-}), DNA-PKcs, Artemis além de XLF, em todos os casos apresentaram fenótipos comuns de alta incidência de linfomas, retardo no crescimento, hipersensibilidade a radiação gama, além de mortalidade aumentadas (DIFILIPPANTONIO et al., 2000; NUSSENZWEIG et al., 1997). De modo semelhante os mesmos fenótipos de retardo no crescimento celular além de aumento de morte celular também foram observados em fibroblastos em cultura derivados de camundongos nocaute (homozigoto) para as proteínas Ku70 e Ku86. Além disso, tanto nessas linhagens de camundongo como em outros modelos de células de mamíferos em cultura, a incidência de aberrações cromossômicas, incluindo quebras de duplas fitas de DNA e translocações, quando comparadas com a linhagem normal foram significativamente aumentadas (DAVIS; CHEN, 2013; FERGUSON et al., 2000; KARANJAWALA et al., 1999; WEINSTOCK; BRUNET; JASIN, 2007). A relação de estabilidade genômica e a via de NHEJ, através da proteína DNA-PKCs, também ficou evidente quando em experimentos usando

células de mamíferos nos quais o sítio de fosforilação treonina 2609, importante para NHEJ, foi substituído por alanina, o que resultou em deficiência na produção de células tronco hematopoiéticas devido ao excesso de danos ao DNA (ZHANG et al., 2011). Mutações pontuais nesse mesmo sítio (treonina 2609) foram detectadas em amostras de pacientes com câncer de mama, o que sugeriu que a fosforilação de T2609 pode ser importante para a supressão de câncer da mama (HSU; ZHANG; CHEN, 2012; WANG et al., 2008). Ainda em humanos, mutações em DNA-PKCs, como por exemplo a mutação sem sentido (L3062R) a qual não afeta a atividade de quinase geral dessa enzima mas interfere na sua função de ativação do fator de Artemis durante a via de NHEJ, resultaram em um fenótipo de sensibilidade à radiação acoplada ao desenvolvimento do quadro de imunodeficiência grave (VAN DER BURG et al., 2009). Adicionalmente, sensibilidade aumentada à radiação, aberrações cromossômicas bem como predisposição a linfomas também foram fenótipos observados em células de pacientes humanos com mutações em Artemis e XLF, os quais também são necessários para NHEJ (DAVIS; CHEN, 2013; MOSHOUS et al., 2003). Dessa forma, fica evidente o papel biológico da via de NHEJ e sua atuação significativa na manutenção da estabilidade genômica prevenindo o desenvolvimento do câncer.

1.5 Reparo de Quebras de duplas fitas em mitocôndrias de células de mamíferos

Enquanto as vias de NHEJ e HR no núcleo estão bem descritas, pouco se sabe sobre a atuação desses mecanismos no reparo do DNA mitocondrial. Recombinação homóloga em mitocôndrias de mamíferos foi detectada por diferentes grupos usando estratégias diversas. Em experimentos *in vitro*, nos quais dois tipos diferentes de plasmídeos foram incubados com extratos mitocondriais de fibroblastos, após a recuperação e purificação dos mesmos, foram observados produtos de recombinação entre esses plasmídeos, sugerindo a existência da maquinaria molecular necessária para realizar os eventos recombinacionais (THYAGARAJAN; PADUA; CAMPBELL, 1996). Já experimentos de fusão de duas linhagens celulares, em que cada qual continha mtDNAs com polimorfismos diferentes, mostraram que parte dos mtDNAs presentes na célula resultante eram produtos recombinantes e possuíam marcadores genéticos de ambos os genomas parentais, como demonstrado por análises de polimorfismo de fragmentos de

restrição de produtos da reação em cadeia da polimerase além de *Southern blot* (D'AURELIO et al., 2004). Em outro enfoque experimental, endonucleases de restrição que possuem sequência de direcionamento mitocondrial (endonucleases *Scal* e *PstI*) e reconhecem sítios de clivagem no mtDNA foram expressas em células de fígado de rato, bem como em neurônios, que continham uma mistura de mtDNA (normal e com sítios para as endonucleases). Após a recuperação celular em tempos posteriores a expressão das endonucleases, o mtDNA foi analisado e foi observado que esses possuíam produtos de recombinação entre dois mtDNAs das células diferentes (BACMAN; WILLIAMS; MORAES, 2009). Adicionalmente, essas quebras de duplas fitas catalisadas pelas endonucleases foram acompanhadas por pequenas deleções flanqueadas por regiões repetidas, típicas de produtos de recombinação (FUKUI; MORAES, 2009; SRIVASTAVA; MORAES, 2005).

Em estudo usando células humanas, provenientes de coração de jovens e adultos, foram observadas moléculas de mtDNA em forma cruciforme (como ocorre na formação de junções de Holiday). Essas estruturas foram mantidas na presença de inibidores de topoisomerasas, evidenciando que as mesmas não foram artefatos resultantes de estresse topológico, causado por essas enzimas. Ademais, essas estruturas não são resultantes de intermediários da replicação do mtDNA, uma vez que na ausência da origem de replicação essas também foram observadas (KAJANDER et al., 2001; POHJOISMÄKI et al., 2009).

Foram detectadas recentemente em mitocôndrias de células de mamíferos proteínas envolvidas em recombinação tais como MRE11e Rad51. A primeira é componente do complexo MRN que é necessário para a ressecção nucleolítica 5'-3' gerando fragmento de fitas simples de DNA. Essas regiões são, então, substratos para a ligação da proteína Rad51 que busca por regiões homólogas na fita intacta. Em ambos os casos, as proteínas foram detectadas tanto em mitocôndrias isoladas quanto em células e a localização mitocondrial foi estimulada após a indução de danos ao mtDNA. Além disso, essas proteínas se associam ao mtDNA após estresse, o que sugere que isso ocorre para que o reparo seja efetuado (DMITRIEVA; MALIDE; BURG, 2011b; SAGE; GILDEMEISTER; KNIGHT, 2010).

As mitocôndrias de células de mamíferos aparentemente também são capazes de reparar quebras de duplas fitas no mtDNA usando o mecanismo de ligação de pontas não homólogas. Experimentos *in vitro* usando plasmídeos

linearizados com enzimas de restrição incubados com extratos mitocondriais mostraram que esses extratos mitocondriais de células de mamíferos são capazes de ligar as pontas livres, provenientes de substratos contendo tanto extremidades coesivas quanto não coesivas (COFFEY; LAKSHMIPATHY; CAMPBELL, 1999; LAKSHMIPATHY; CAMPBELL, 1999b). Adicionalmente, esse mesmo grupo detectou em mitocôndrias de células de hamster uma forma truncada da proteína 86 do heterodímero Ku70/86. Essa foi identificada como uma isoforma de 68 kDa baseando-se na sua mobilidade eletroforética. Além disso, essa proteína mostrou-se capaz de se ligar em plasmídeos contendo pontas livres (COFFEY; CAMPBELL, 2000).

Dessa forma, coletivamente os achados indicam que as mitocôndrias são capazes de reparar quebras de duplas fitas de DNA, tanto por HR quanto por NHEJ. Entretanto, a identificação molecular das proteínas envolvidas nessas vias, bem como a regulação das mesmas ainda não é clara, constituindo um amplo campo para novas descobertas.

2. Objetivos

2.1 Objetivo Geral

Dissecar, a nível molecular, o mecanismo de reparo de quebras de fita duplas em DNA mitocondrial de células humanas.

2.2 Objetivos Específicos

1. Identificar a localização mitocondrial das proteínas Rad51, Rad52, Ku70/86, DNA-PKCs e ATM, envolvidas em reparo de quebras de fitas duplas no DNA genômico, em células humanas.
2. Determinar a participação da proteína Rad52 nas respostas mitocondriais a tratamentos que induzem quebras de fitas duplas em DNA.
3. Caracterizar o heterodímero Ku mitocondrial e determinar sua participação na manutenção da integridade do DNA mitocondrial.

3. Materiais e Métodos

3.1 *Manutenções das culturas celulares*

As linhagens celulares humanas (HEK293T - fibroblasto derivado de rim embrionário; GM1310 - linfoblasto; MRC5C-VI - fibroblasto adulto; AT5-BIVA - fibroblasto humano deficiente em ATM) imortalizadas com *Simian virus 40* (SV40), foram rotineiramente mantidas em meio DMEM com alta concentração de glicose (DMEM Alta Glc, 4,5 g/L glicose – LGC Biotecnologia[®]) suplementado com 10 ou 15% de soro bovino fetal (SBF – GibcoTM) e 1% de solução de antibióticos (concentrações finais = estreptomicina 0,1 mg/mL e penicilina 10 U/mL – Invitrogen[®]) (meio de cultura completo), a 37 °C em estufa umidificada com atmosfera de 5% de CO₂.

3.2 *Transfecção de HEK293T com shRNA gene específico e geração de linhagens estáveis*

A diminuição da expressão dos genes de interesse foi obtida através da transfecção de células HEK293T com quatro plasmídeos que codificam shRNAs (*small hairpin* RNAs, de 29 nucleotídeos) específicos (OriGene[®] para Rad52 e Sigma Aldrich[®] para Ku70) e que contém gene de resistência ao antibiótico puromicina, além de um plasmídeo controle contendo uma sequência aleatória (*scrambled*). Para a transfecção utilizou-se uma mistura de Lipofectamina 2000 (Invitrogen[®]) e 1µg de cada plasmídeo, seguindo as recomendações do protocolo do fabricante.

As células foram semeadas em placas de 6 poços e cultivadas até atingirem cerca de 70% de confluência. Cerca de 2 horas antes da transfecção, o meio de cultura foi substituído por meio DMEM desprovido de soro fetal bovino (SFB) e antibióticos. O complexo DNA/Lipofectamina previamente preparado foi adicionado aos poços, sendo que em seguida as células foram cultivadas em meio DMEM, sem soro fetal bovino e puromicina, por 12h, em estufa com 5% de CO₂. Transcorrido esse tempo, adicionou-se 10% SFB e 1µg/ml de puromicina, previamente titulada para essa linhagem celular. A seleção com puromicina foi realizada por duas semanas, trocando o meio a cada dois dias durante o período. Em seguida, as

culturas selecionadas foram transferidas para garrafas, mantendo-se a concentração de 1µg/ml de antibiótico no meio de cultura completo.

Para verificar qual das quatro linhagens, resultantes da transfecção contendo quatro diferentes sequências de *shRNA*, apresentava maior redução da expressão dos genes de interesse, verificamos o nível proteico através de *western blot*, como descrito em 3.17. Para isso as proteínas totais foram extraídas em tampão RIPA (25 mM Tris-HCl pH 7,6, 150 mM NaCl, 1% NP-40, 1% desoxicolato de sódio, 0,1% SDS), por sonicação. O lisado proteico foi centrifugado (15.000 g, 15 min, a 4°C) e o sobrenadante retirado. A concentração proteica dos lisados foi mensurada pelo método de Bradford e cerca de 10µg de proteínas totais foram usadas em cada experimento de *western blot*.

Uma vez verificado qual *shRNA* resultou em maior silenciamento do gene de interesse, foi realizada a seleção clonal, a fim de obter culturas isogênicas. Para isso as células foram contadas, diluídas e plaqueadas individualmente em cada poço de uma placa de 96 poços. Colônias individuais resultantes foram então identificadas, selecionadas e expandidas para a utilização nos ensaios descritos.

3.3 Indução de danos ao DNA usando peróxido de hidrogênio

As células foram propagadas em placas de cultura de 60 x 15 mm e dividiu-se o experimento em dois grupos experimentais: células tratadas com peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e células controle. O primeiro grupo, referente às tratadas, foi submetido ao tratamento com uma solução de 100µM H₂O₂ em tampão fosfato salino (NaCl 137 mM, Fosfato 10 mM, KCl 2,7 mM, e um pH de 7.4 PBS– LGC Biotecnologia®) durante 30 minutos. O tratamento foi feito no escuro, a fim de evitar a degradação do H₂O₂ pela luz. Para isso, retirou-se o meio de cultura das placas, substituindo-o pela solução de H₂O₂, que ficou durante 30 minutos em contato com as células. Decorrido o tempo do tratamento, a solução de H₂O₂ foi retirada e as células foram lavadas com PBS e acrescidas de um novo meio de cultura completo. Em seguida, subdividiu-se o conjunto das células tratadas, que permaneceram a 37 °C em estufa umidificada com atmosfera de 5% de CO₂ por períodos de recuperação de 1, 3, 6 e 24 horas. Para o grupo das células que não foram tratadas com H₂O₂, apenas houve a troca do meio por solução de PBS, mantidas durante o tempo de 30min sob as mesmas condições dos grupos tratados. Transcorrido esse tempo, retirou-se o PBS e acrescentou-se meio de cultura completo, mantendo-se este meio

em contato com as células pelos mesmos tempos a 37 °C em estufa umidificada com atmosfera de 5% de CO₂.

Após cada tempo (1, 3, 6 ou 24h), as células controle e tratadas foram coletadas para o isolamento mitocondrial a fim de verificar o nível proteico no interior das mitocôndrias, bem como para experimentos de co-imunoprecipitação de mtDNA. Ambas as metodologias estão descritas a seguir.

3.4 Indução de danos ao DNA usando radiação gama

As células foram propagadas em placas de cultura de 60 x 15 mm e dividiu-se o experimento em dois grupos experimentais: células controle e células irradiadas com radiação gama (IR). O primeiro grupo, referente às células controle, consiste de células que não foram irradiadas. Sendo assim, o meio de cultura dessas placas foi apenas trocado. O segundo grupo, referente às células tratadas, foi exposto a uma dose de 5 Gy (Gray) de radiação gama por meio de um irradiador Gammacell 220 (*Atomic Energy of Canada Limited*) (Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, IPEN, São Paulo, SP). Em seguida, o meio foi trocado e subdividiu-se o conjunto das células tratadas em períodos de recuperação de 1, 3, 6 e 24 horas.

Após cada tempo (1, 3, 6 e 24h), amostras de células controle e irradiadas foram coletadas e processadas como descrito para o tratamento com H₂O₂.

3.5 Isolamento de mitocôndrias a partir de células em cultura

As frações mitocondriais de todas as linhagens celulares foram isoladas através de centrifugação diferencial e gradiente de Percoll (BioRad). Para isso as células foram cultivadas em 50 placas de Petri de 60cm² ou frascos de 75 cm² (TPP®) até atingir confluência de 70-80% (fase de crescimento logarítmico). 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 em 5 mL de tampão MSHE 1X (210 mM manitol, 70 mM sacarose, 10 mM HEPES, 1 mM EGTA, 2 mM EDTA, 5 mM DTT, pH 7,4), suplementados com coquetel inibidor de protease 1X [*Complete Mini – Roche*®]). O precipitado celular foi suspenso em 1-2 volumes MSHE 1X e tratado com alíquotas de 10 µL de 5% digitonina até que mais de 90% das células fossem permeabilizadas em análise com azul de tripan 0,4%. 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. O precipitado obtido, correspondendo à fração mitocondrial crua, foi suspenso em 500 µL de MSHE, cuidadosamente aplicado no topo de uma mistura contendo 50% Percoll e 50% MSHE 2X e centrifugado a 50.000 g durante 1 h e 10 min. 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 precipitada a 3.000 g, o sobrenadante descartado, suspensa em 250 µL de MSHE 1X e alíquotas de 50 µL foram armazenadas a -80 °C até o momento de uso.

3.6 *Produção de extratos celular total e mitocondrial*

Para a produção do extrato celular, as células foram coletadas através de centrifugação durante 10 min a 1.500 g. O volume do precipitado celular foi mensurado e acrescido de igual volume de tampão I (10 mM Tris-HCl (pH 7,8), 200 mM KCl, inibidores de proteases). O volume foi novamente mensurado e acrescido do dobro do volume presente no frasco, com tampão II (10 mM Tris-HCl (pH 7,8), 600 mM KCl, 40% glicerol, 0,1 mM EDTA and 0,2% Nonidet P-40). A solução permaneceu sob agitação por 2h a 4°C seguida de ultra centrifugação, nessa mesma temperatura, durante 20 min a 20.000 g. Posteriormente o sobrenadante, que constitui o extrato celular total, foi coletado e transferido para um novo tubo e mantido a -80°C até o uso. De semelhante modo, para a produção dos extratos mitocondriais foram usadas essas mesmas etapas. No entanto, o material inicial utilizado foram mitocôndrias isoladas através de centrifugação diferencial seguida pelo gradiente de Percoll, conforme descrito acima.

3.7 *Quantificação de proteínas em extratos celulares*

A determinação da concentração de proteínas em extratos celulares e subcelulares foi realizada usando o reagente Bradford (BioRad®). Para isso 0,5 ou 1 µL do extrato proteico foi incubado durante 5 min com 190 µL desse reagente. Em

seguida, procedeu-se a leitura da absorbância em 595 nm e a concentração de proteínas no extrato foi determinada por comparação com curva padrão feita com BSA (*bovine serum albumin*, BioRad®).

3.8 Ensaio in vitro para atividade de NHEJ

O DNA substrato usado nesse ensaio foi o plasmídeo pUC19 (Invitrogen®). Para isso o mesmo foi digerido com a enzima de restrição *EcoRI* (New England Biolabs®), de acordo com as condições indicadas pelo fabricante, gerando o substrato contendo extremidades 5' coesivas. O produto da clivagem foi submetido a eletroforese em gel de agarose 0,7% e posteriormente purificado, como descrito abaixo. Reações contendo 300 ng de pUC19-*EcoRI* foram incubadas com diferentes concentrações de extrato celular total ou de extrato mitocondrial, em tampão de reação (50 mM Tris [pH 7,8], 10 mM MgCl₂, 100 mM KCl, 1 mM ditioneitol [DTT], 1 mM EDTA, 1 mM ATP, 18 µg BSA, 7% glicerol, 250 µM cada de dATP, dGTP, dCTP, dTTP e inibidores de proteases). As reações foram incubadas a 25°C durante 2 horas, sendo ao final paralisadas com a adição de 50 mM EDTA, seguida por digestão com proteinase K (1 µg/µL; Roche®) por 1 hora a 37°C.

Para a visualização dos produtos foi adicionado a cada reação tampão de amostra para DNA 1X (Fermentas®) e os produtos foram resolvidos em gel de agarose 0,7%, a 100 V durante 3h. O DNA foi corado usando GelRed (Biotium) e as bandas visualizadas usando o Typhoon 8600 scanner (GE LifeSciences®) ou BioRad scanner.

3.9 Extração de DNA plasmidial de *E. coli*

Os plasmídeos foram extraídos utilizando os kits comerciais *QIAprep Spin Miniprep Kit* (250) ou *QIAprep Spin Midiprep Kit* (100) (Qiagen®), conforme instruções do fabricante.

3.10 Purificação de DNA a partir de gel de agarose

Os fragmentos de DNA obtidos por PCR ou clivagens com enzimas de restrição foram recuperados do gel de agarose utilizando o *Qiaquick Gel Extraction Kit* (Qiagen®, purificação do DNA por imobilização em coluna de troca iônica), conforme instruções do fabricante.

3.11 Quantificação de DNA

A concentração de DNA nas soluções foi estimada por espectrofotometria a 260 nm, em aparelho Nanodrop 1000 (Thermo Fisher Scientific Inc. ®)

3.12 Isolamento de DNA total e análise qualitativa do número de cópias e deleções no DNA mitocondrial

O DNA das amostras foi isolado através do *Kit DNeasy Blood & Tissue* (Qiagen®) e de acordo com as instruções do fabricante. Para a quantificação do número de cópias do mtDNA comparado ao nDNA, foi usado o q-PCR (*real time quantitative polimerase chain reaction*) com o *Kit Power SYBR Green PCR Master Mix* (Applied Biosystem®), em um termociclador 7500 Real Time PCR System (Applied Biosystem®). As reações foram feitas em volume final de 25 µL, contendo 12,5 µL de 2X SYBR® *Green PCR Master Mix*, *primers* 5 pmol cada e 20 ng de DNA total. Nas reações foi usado o programa padrão para qPCR, a saber: um ciclo de 95 °C por 10 minutos, 40 ciclos de 95 °C por 15 segundos e 60 °C por 1 minuto. Após a amplificação foi realizada uma curva de dissociação para verificar a especificidade dos *primers* utilizados, ou seja, a formação de um único produto alvo. Os seguintes genes foram escolhidos para a análise por qPCR: *HPRT* (hipoxantina fosforibosil transferase, gene nuclear de cópia única) para controle de carregamento do DNA nuclear, gene *ND1* (NADH desidrogenase subunidade mitocondrial 1) para medida do número de cópias de mtDNA e gene *ND4L* (NADH desidrogenase subunidade mitocondrial 4L) para medida do número relativo de deleções no mtDNA. *ND4L* foi escolhido como um marcador de deleção devido à grande frequência de deleções na região na qual esse gene está localizado, em populações humanas, em oposição à baixa frequência de deleções na região contendo o gene *ND1* (DAMAS et al., 2012). As sequências dos *primers* (Invitrogen ®) usados são mostradas na tabela, a seguir.

Tabela 1. *Primers* utilizados para qPCR para número de cópias de mtDNA.

Gene alvo	Símbolo oficial	mRNA RefSeq	Direção	Sequência (5'-3')
<i>HPRT</i>	Hprt	NM_000194.2	Sense	TGA CAT GTG CCG CCT GCG AG
			Antisense	GTG GTC GCT TTC CGT GCC GA
<i>ND1</i>	ND1	NC_012920.1	Sense	ACT ACG CAA AGG CCC CAA CG
			Antisense	GAG CTA AGG TCG GGG CGG TG
<i>ND4L</i>	ND4L	NC_011137.1	Sense	AAC CCT CAA CAC CCA CTC CCT CTT
			Antisense	TAGGCC CAC CGC TGC TTC GC

A partir dos dados de *cycle threshold* (CT) para cada par de *primers*, já padronizado anteriormente em nosso laboratório, foi calculada a eficiência de amplificação dos genes, conforme descrito abaixo, onde *slope* é inclinação da reta resultante do gráfico obtido de CT x massa de DNA, e E corresponde à eficiência do *primer*.

$$E_{\text{primer}} = 10^{-1/\text{Slope}}$$

A amplificação relativa para cada uma das amostras foi obtida através do uso da equação abaixo. A análise do número relativo de cópias de mtDNA foi feita calculando a eficiência de amplificação de uma sequência mitocondrial (*ND1*) relativa à amplificação de uma sequência nuclear (*HPRT*). Já para o número de deleções no mtDNA foi usada a amplificação da sequência mitocondrial raramente deletada (*ND1*) relativa à amplificação da sequência mitocondrial frequentemente deletada (*ND4L*).

$$\text{Amplificação Relativa} = \frac{E_{mtDNA}^{(C_{T\text{controle-mtDNA}} - C_{T\text{amostra-mtDNA}})}}{E_{HPRT}^{(C_{T\text{controle-HPRT}} - C_{T\text{amostra-HPRT}})}}$$

3.13 Análise de lesões em mtDNA por XL-PCR

Após o isolamento do DNA através do *Kit DNeasy Blood & Tissue* (Qiagen®), a quantidade de lesões em DNA foi quantificada por PCR de longa extensão (XL-PCR) utilizando *rTth* polimerase Kit XL (Life Technology®), de acordo com o protocolo do fabricante, e metodologia e *primers* (5'-TGA GGC CAA ATA TCA TTC TGA GGG GC-3' *sense*; 5'-TTT CAT CAT GCG GAG ATG TTG GAT GG-3' *antisense*) descritos por (KOVALENKO; SANTOS, 2009; SANTOS et al., 2006). As reações foram feitas em volume final de 50 µL, contendo 15 µL de tampão 3,3X XL PCR, 2,6 µL de 25

mM de acetato de magnésio (concentração final 1,3 mM), 0,5 µL de 10 mg/mL de BSA (concentração final 0,1 mg/mL), 2 µL de 10 µM *primer* cada (concentração final 20 pmol), 4 µL de 2,5 mM dNTP (concentração final 200 nM), 5 µL de 0,2 U/µL *rTth* DNA polimerase XL (1 U) e 5 µL de 3 ng/µL DNA (concentração final 15 ng). Uma etapa de anelamento de 30 s a 64 °C e um aumento na etapa de desnaturação para 30s foram adicionadas aos parâmetros do ciclo descritos em Kovalenko e Santos, 2009. Fragmentos mitocondriais grandes (16 Kb) das células normais e Ku70/86 *knockdown* foram amplificados e a eficiência de amplificação foi comparada para estimar a quantidade de lesões bloqueadoras de polimerases no mtDNA. Para normalização da quantidade de DNA utilizada em cada amostra foi usada a amplificação de um fragmento pequeno (200 pb) (*ND1*) do mtDNA. Os produtos da reação foram submetidos à separação eletroforética em gel de agarose 1% e a corrida procedeu-se a 100 V durante 4 h em tampão TAE (40 mM Tris-acetato pH 7,8, 1 mM EDTA). O gel foi corado em 2 mg/L de brometo de etídeo por 30 min e lavado em água deionizada por 10 min. As imagens foram captadas em ImageQuant 300 (GE Life Sciences®), usando o Typhoon 8600 scanner (GE LifeSciences ®), e analisadas em ImageJ.

3.14 Co-imunoprecipitação de mtDNA

Após os tratamentos com H₂O₂ ou radiação gama, descritos anteriormente, as células foram incubadas com 1% de formaldeído diluído em PBS durante 10 min. Decorrido esse tempo a reação foi finalizada com a adição de 125 mM glicina, seguida de incubação durante 10 min a 37 °C. Para esses experimentos foram usadas cerca de 1x10⁶ células para cada reação, em triplicata, usando o *Kit MAGnify™ Chromatin Immunoprecipitation System* (Invitrogen®), seguindo as recomendações do mesmo. Em continuidade ao protocolo, as células foram suspensas em 100 µL de tampão de lise e sonicadas (10 ciclos de 20 s cada, com 20% amplitude, condições padronizadas anteriormente) a fim de gerar fragmentos de DNA contendo entre 200 a 500 pb, o qual foi confirmado através de eletroforese em gel de agarose 1,5%. Para cada reação, cerca de 2,5 µg de anticorpos monoclonais, que reconhecem as proteínas alvo do nosso estudo (Ku70, Ku86, Rad52), bem como dos controles negativos (IgG não imune) foram ligadas às *dynabeads* do kit. Essa ligação processou-se por 1 hora a 4°C. Ao final desse tempo, os complexos (anticorpo + *dynabeads*) foram incubados durante 12 horas a

4°C com extrato celular obtido por sonicação. Transcorrido esse tempo, os complexos foram isolados usando placa magnética, lavados e posteriormente foi realizada a reversão da ligação covalente e purificação do DNA ligado aos complexos imunoprecipitados, de acordo com as recomendações do kit. Quantidades semelhantes de DNA imunoprecipitado usando os diferentes anticorpos, além do *input*, que consiste no material total utilizado para cada reação de imunoprecipitação, foram usados para a análise por qPCR para Rad52 e Ku70/86 ou PCR para Ku70/86, com reações feitas em triplicata. O enriquecimento do sinal de mtDNA foi determinado em relação ao controle negativo (IgG), o qual possui uma ligação basal ao mtDNA, e normalizado em relação ao sinal do *input*. Para as reações de PCR foram usados os *primers* *ND1* e *HPRT* já descritos anteriormente na tabela 1.

3.15 Western Blot

Após separação das proteínas por SDS-PAGE, as mesmas foram transferidas para membrana de PVDF (polivinidileno difluoreto, GE Healthcare®) em tampão de transferência gelado (25 mM Tris-HCl pH 8,3; 192 mM glicina; 15% metanol). Essa transferência foi feita com uma corrente constante de 45 mA por um período de 3 horas.

Após a transferência, a ligação inespecífica de proteínas à membrana foi bloqueada por incubação por 2 horas em 10 mL de solução contendo 5% BSA em tampão TBS-T (10mM Tris-HCl pH 7,6; 150 mM NaCl; 0,05% Tween) sob leve agitação a 25°C. Transcorrido esse tempo, a membrana foi incubada com o anticorpo primário por 12 horas em uma solução de TBS-T contendo 0,1% BSA sob agitação leve a 4°C. Neste trabalho foram usados os seguintes anticorpos primários: anti-Rad51 (Santa Cruz Biotechnology, sc53428, diluição 1:100), anti-Rad52 (Genetex-GTX 70301, diluição 1:500); anti-ATM (sc135663, diluição 1:500); anti-DNA-PKcs (Novus Biologicals® - NB. 600-1203, diluição 1:500) anti-Ku70 (sc365766, diluição 1:500); anti-Ku86 (sc1485 ou sc9034, diluição 1:500); anti-Ku86 N-terminal (sc56135, diluição 1:500); anti-COX4 (sc58348, diluição 1:250); anti-Mfn1 (sc50330, diluição 1:500) e anti-VDAC1 (sc32063, diluição 1:500).

Após a incubação com o anticorpo primário a membrana foi submetida a 3 lavagens de 15 minutos em TBS-T, sendo em seguida transferida para uma solução contendo o anticorpo secundário diluído 1:5.000 em solução de TBS-T 0,1% BSA

por 2 horas com agitação leve. Os anticorpos secundários conjugados com HRP (*horse radish peroxidase*) foram: anti-mouse IgG (sc2047), anti-goat IgG (sc2778) ou anti-rabbit IgG (sc2034). O excesso de anticorpo secundário foi retirado através de 3 lavagens da membrana com TBS-T durante 15 minutos cada.

Para a revelação do *western blot* foi usado o ECL *Western Blotting Detection System* (GE Healthcare®), o qual se baseia na quimioluminescência produzida pela reação de oxidação do luminol pela HRP, na presença de peróxido, em meio alcalino. O sinal obtido foi visualizado por exposição de filme de raios-X.

3.16 Ligação covalente do anticorpo Ku70 à proteína A/G agarose

Reações para a ligação covalente do anticorpo anti-Ku70 à proteína A/G agarose (Santa Cruz Biotechnology®) utilizaram 200 µL da resina. Para isso a mesma foi lavada 2 vezes com PBS gelado, e suspensa em igual volume desse tampão. A esse volume foram adicionados 200 µL de tampão de ligação (1 mg/ml BSA, em PBS) seguida por incubação, com agitação a 4° C, durante 10 minutos. Ao final desse tempo a amostra foi centrifugada (9.000 g durante 15 minutos a 4° C) sendo o sobrenadante descartado. Ao volume correspondente ao precipitado (cerca de 100µL) foi adicionado igual volume de tampão de ligação contendo 30 uL de anticorpo anti-Ku70, sendo a mistura posteriormente incubada com agitação a 4° C, durante 1 hora. Passado esse tempo a amostra foi centrifugada (9.000 g durante 15 minutos a 4° C) e o sobrenadante descartado. Procedeu-se a resuspensão do precipitado em tampão de ligação, seguida por nova incubação com agitação a 4° C, durante 5 minutos. Ao final dessa etapa a amostra foi centrifugada (9.000 g durante 15 minutos a 4° C) e novamente lavada com PBS gelado e foi posteriormente incubada com nova agitação a 4° C, durante 5 minutos com o tampão de lavagem (0,2 M trietanolamina em PBS). Ao final desse tempo a amostra foi centrifugada e suspensa em 100 µL desse tampão. Igual volume de solução de dimetil pimelimidato (DMP) (1 ml de solução de DMP 13 mg/ml + 1 ml de tampão de lavagem) foi adicionado e a amostra incubada com agitação a 4° C, durante 30 minutos, sendo essa etapa repetida por mais uma vez. Transcorrido esse tempo a amostra foi centrifugada e resuspendida em 100 µl de 50 mM etanolamina, seguida por incubação com agitação a 4° C, durante 5 minutos, seguida de uma nova lavagem com PBS gelado. Em etapa final, para a retirada do excesso de anticorpo não ligado,

foram realizadas duas incubações da amostra com glicina (1 M pH 3) durante 10 minutos, com agitação.

Uma vez realizada a etapa de ligação covalente do anticorpo à proteína A/G agarose, esse produto foi estocado a 4° C, sendo usadas cerca de 30 µL desse material em cada reação de co-imunoprecipitação.

3.17 Co-imunoprecipitação das proteínas Ku70/86 e DNA ligase III

Para os experimentos de co-imunoprecipitação, cerca de 100 µL das frações referentes ao núcleo e mitocôndrias foram adicionados a 400 µL de tampão de lise (150 mM NaCl, 10% glicerol, 50 mM Tris-HCl pH 7,4, 0,5% Triton X-100, 0,2% desoxicolato de sódio e inibidores de proteases [*Complete-Roche*®]) e incubados durante 2 horas a 4°C com agitação. Em seguida procedeu-se a centrifugação das amostras a 9.000 *g* durante 15 minutos a 4° C para a remoção de resíduos celulares. As proteínas do sobrenadante foram quantificadas, usando o método de Bradford, e para cada reação de co-imunoprecipitação foram usadas 600 µg de proteínas. Para a eliminação de proteínas que se ligam inespecificamente a resina, foi realizada o clareamento das amostras, que consistiu na incubação dos extratos proteicos com 20 µL de resina proteína A/G agarose, durante 50 minutos com leve agitação. Transcorrido esse tempo, as amostras foram centrifugadas a 9.000 *g* durante 10 minutos, sendo o sobrenadante novamente recuperado em um novo tubo e as *beads* da resina guardadas a -20°C, uma vez que as mesmas referem-se ao controle negativo do experimento.

As amostras clarificadas foram incubadas durante a noite com 2 µg de anti-Ku70, previamente ligado à resina proteína A/G agarose, com agitação. Para a recuperação das *beads* de agarose, foi realizada uma centrifugação das amostras a 9.000 *g* durante 10 minutos. Procedeu-se as lavagens das mesmas com tampão RIPA e resuspensão do precipitado obtido em 50 µL de tampão Laemmli. Em etapa posterior, as amostras foram fervidas em tampão de amostra e submetidas à SDS-PAGE e *western blot*, usando anticorpo para detectar a subunidade 86 do heterodímero Ku70/86 ou DNA ligase III.

3.18 Eletroforese proteica unidimensional (1D-SDS-PAGE)

As proteínas totais, bem como as mitocondriais, foram separadas através de eletroforese em gel de poliacrilamida. O gel para empacotamento continha

acrilamida: bis-acrilamida (29:1) 6%, Tris-HCl 300 mM pH 6,8; 0,1% SDS; 0,1% persulfato de amônio; 1 μ L/mL de TEMED; e o gel de separação continha acrilamida: bis-acrilamida (29:1) 12% ou 15%; Tris-HCl 380 mM pH 8,8; 0,1% SDS; 0,1% persulfato de amônio; 0,4 μ L/mL de TEMED. A preparação de ambos géis foi realizada usando o sistema *Mini-protean* da BioRad®. As amostras proteicas foram dissolvidas em tampão 4X Laemmli (250 mM Tris-HCl pH 6,8, 8% SDS, 40% glicerol, 20% β -mercaptoetanol, 80 μ g/mL azul de bromofenol), incubadas a 94°C por 5 minutos e em seguida aplicadas no gel. Esse foi submetido a voltagem de 110V em tampão de corrida Tris-glicina 1X (Tris-HCl 25 mM pH 7,2; glicina 250 mM; 0,1% SDS) por cerca de 2 horas.

3.19 Eletroforese proteica bidimensional (2D-PAGE)

A primeira dimensão (*Isoelectric focusing*, IEF) foi realizada utilizando *Ettan IPGphor 3 System* (GE Healthcare®). A separação de proteínas por ponto isoelétrico foi realizada em fitas com gradiente de pH imobilizado (2-14). Essas foram carregadas com as amostras proteicas resultantes da imunoprecipitação e a focalização foi realizada pela rampa 1000 V por mais 800 Vh; rampa 8000 V por mais 11300 Vh; segurando a 8000 V para 5400 Vh; dando origem a um total de cerca de 35000 Vh, tal como sugerido pelas instruções da GE Healthcare®. Para a segunda dimensão, as fitas foram previamente incubadas com 1% DTT no tampão de equilíbrio (75 mM Tris-HCl pH 8,8; 6 M uréia, 29% glicerol e 2% SDS) durante 15 min, seguido de 15 min em tampão de equilíbrio suplementado com 2,5% iodoacetamida. Posteriormente, essas foram lavadas com água e transferidas para o topo de um de gel SDS-poliacrilamida 15%, o qual foi sobreposto com uma solução de agarose 0,5% e posteriormente submetido a eletroforese, nas condições descritas acima. Após a separação, os géis foram corados com Coomassie coloidal para coloração de proteína total. Os géis foram escaneados em um Typhoon Trio (GE Healthcare®) e Image Scanner III (GE Healthcare®) para identificar as bandas proteicas. Após esses procedimentos as bandas foram recortadas do gel e submetidas ao protocolo para a identificação por HPLC/ESI/MS, conforme descrito adiante.

3.20 Identificação da subunidade 50 do heterodímero Ku70/50 por HPLC/ESI/MS após digestão trípica

As reações de imunoprecipitação foram realizadas como descrito anteriormente, no entanto, diante da necessidade de grande quantidade de proteínas para a identificação por HPLC/ESI/MS, usamos um volume de extrato equivalente a 10 ml para as reações de imunoprecipitação. As proteínas resultantes da imunoprecipitação foram resolvidas em gel SDS-PAGE ou gel 2D e, após eletroforese, as bandas foram coradas com azul de Coomassie. As bandas correspondendo a massa molar estimado entre 40 e 70 kDa foram retiradas do gel e picotadas para aumentar a superfície de contato com os reagentes a serem adicionados. As bandas foram descoradas com uma solução de metanol (50 %) e ácido acético (2,5 %) em água. Em seguida o gel foi desidratado pela adição de 200 µL de acetonitrila (100 %) e incubação por 5 min a temperatura ambiente. A acetonitrila foi removida e o gel foi reidratado com 200 µL de bicarbonato de amônio 100 mM por 10 min. O gel foi desidratado mais 2 vezes com acetonitrila e, após remoção da acetonitrila, foi tratado com tripsina (LGC Biotecnologia®) em uma proporção de 100:1 (massa/massa) a 37°C por 16 h. Os peptídeos resultantes da digestão foram extraídos do gel por tratamento com 5 % ácido fórmico e incubação por 20 min. O sobrenadante foi recolhido, e os peptídeos remanescentes no gel foram submetidos a uma segunda extração com uma solução de 5 % ácido fórmico e acetonitrila (50 %) e incubação por 10 min a temperatura ambiente. Esta extração foi repetida novamente. Os sobrenadantes de todas as extrações foram combinados e secos em um equipamento *Speed-Vac*. Os produtos de imunoprecipitação foram analisados em um sistema Nano LC - Shimadzu *1D-nanoLC system CBM-20A* utilizando um *trap* monolítico para concentração e dessalinização das amostras da GLScience (0.075x150 mm). A coluna utilizada para nano HPLC foi ZORBAX 300SB-C18 de 150 mm x 75 µm, tamanho de partícula 3,5 µm (Agilent Technologies), com o fluxo da coluna a 300 nL/min e o fluxo do *trap* a 36 µL/min utilizando como solventes: água:acetonitrila (95:5% com 0,1% ácido fórmico) (Eluente A), acetonitrila:água (95:5% com 0,1% ácido fórmico) (Eluente B) e 100% água com 0,1% ácido fórmico (Eluente C). O gradiente empregado consistiu de 100% de C por 2,50 min, 5-40% de B por 40 min, 40-95% de B até 40,1 min, 95% de B até 45 min e 5% de B até 60 min. Todos os hidrolisados foram analisados por

espectrometria de massa utilizando um espectrômetro MS da Bruker Daltonics MaXis 3G - UHR q-TOF, tendo como fonte de ionização o *Captive spray nano ESI* em modo positivo. Parâmetros da fonte foram: fluxo de 300 nL/min, voltagem do capilar 1700 V, temperatura de desolvatação 150 °C. Como gás de colisão para MS/MS foi utilizado nitrogênio. A calibração interna foi realizada utilizando *lock mass calibrant* (m/z 1221, 9906) e como calibrante externo *low concentration Tune mix*, da Agilent Technologies®. Os peptídeos identificados foram analisados usando os softwares BioTools e Mascote.

3.21 Medida da atividade da enzima Citrato Sintase

A citrato sintase catalisa a reação no qual ocorre a condensação do oxalacetato à molécula de acetil-coenzima A e água, formando citrato e CoA-SH. Para analisar a atividade dessa enzima o ensaio consiste em promover a reação irreversível na qual o CoA-SH gerado reagirá com o DTNB (ácido 5,5-ditiobis (2-nitrobenzóico)), produzindo o TNB (ácido tionitrobenzóico) mais CoA-S-S-TNB. A formação de TNB pode, então, ser seguida espectrofotometricamente. Para a realização desse ensaio, foram utilizadas cerca de 8×10^6 células homogeneizadas em homogeneizador de vidro do tipo Potter-Elvehjem, em tampão PBS gelado. A seguir, as amostras foram centrifugadas a 3.000 g por 2 min a 4°C e o sobrenadante foi recolhido para as análises enzimáticas. A concentração proteica das amostras foi determinada utilizando-se o método de Bradford, usando-se com BSA como padrão. Foram usadas cerca de 3,0 µg de proteínas por amostra em cada poço, sobre as quais foi adicionado uma mistura de reagentes contendo Tris-HCl 0,1 M (pH 7,1), oxaloacetato 250 µM, DNTB 100 µM e acetil-coenzima A 50 µM. Procedeu-se a agitação, monitoramento da absorbância em 412 nm durante 5 minutos a 30 °C e posteriormente o calculo da inclinação por minuto do branco (todos os reagentes exceto proteínas) e das amostras. Utilizando-se o coeficiente de absorvidade molar para o TNB ($13,6 \text{ mM}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$), foram efetuados os cálculos do valor da atividade enzimática em mU/mL. Foi feita a correção para o caminho óptico referente ao volume de 0,2 mL utilizado nesse ensaio, além da normalização dos dados em relação à quantidade de proteína adicionada em cada reação e a atividade final foi apresentada em mU/mg de proteína (nmoles/min/mg proteína).

3.22 Ensaio de proteção da digestão por proteinase K

Para o ensaio de proteção da digestão por proteinase K, cerca de 50 µg de frações mitocondriais foram usadas em cada condição. As reações foram realizadas no gelo, em tampão (20 mM Hepes-KOH, pH 7.4, 250 mM de sacarose, 80 mM KOAc e 5 mM MgOAc) e para as condições testadas cada fração foi incubada na presença ou ausência de digitonina (0,2 mg/ml), SDS (1%) e 100 µg/ml de proteinase K, durante 10 min. Transcorrido esse tempo, as reações foram paralisadas com a adição de 2 volumes de 20% ácido tricloroacético, seguida de incubação no gelo por mais 20 min. As proteínas foram lavadas e precipitadas com acetona gelada, seguido de resuspensão em tampão Laemmli e análise por *western blot*.

3.23 Análises estatísticas

Os dados experimentais foram expressos como a média dos valores $\pm$ erro padrão da média (média $\pm$ e.p.m.), submetidos ao teste *t-Student* não-pareado ou ANOVA. Todas as figuras apresentadas nos resultados são representativas de pelo menos três experimentos independentes. Valor-*p* < 0,05 foi considerado como diferença estatisticamente significativa.

4. Resultados

Ao longo desse trabalho, duas vias de reparo de quebras de duplas fitas, recombinação homóloga e ligação de pontas não homólogas, foram alvo da nossa investigação. No sentido de facilitar a sequência e linearidade de apresentação e discussão, os resultados pertinentes a cada via serão expostos em tópicos separados.

4.1 Análise da pureza das frações mitocondriais isoladas

Uma vez que as proteínas alvo do nosso estudo são conhecidas como componentes de vias de reparo presentes no núcleo e algumas também estão presentes no citoplasma, inicialmente verificamos a pureza das frações mitocondriais utilizadas. Essa análise é fundamental pois a existência de contaminação nuclear, na fração mitocondrial, consistiria em um artefato importante na identificação inequívoca da presença ou não das proteínas de interesse na mitocôndria. Sendo assim, foi realizado *western blot* utilizando amostras de cada fração subcelular, separadas ao longo da nossa purificação, bem como da fração mitocondrial final.

Como proteínas marcadoras, foram usadas Lamina B2, uma proteína nuclear (65 KDa) bastante abundante, e o Fator de Transcrição Mitocondrial A (TFAM), proteína exclusivamente mitocondrial (25 kDa). Os resultados desse *western blot*, como pode ser observado na figura 1, mostram que não houve imunodeteção de Lamina B2 na fração referente às mitocôndrias, o que evidencia a inexistência de contaminação nuclear na fração mitocondrial, tanto em amostras isoladas da linhagem HEK293T, quanto da linhagem GM1310 (Figura 1, painel A para HEK293T e B para GM1310). Nesse sentido, uma vez que confirmamos que as frações mitocondriais estavam livres de contaminação nuclear, em ambas linhagens celulares, essas foram usadas para os demais experimentos que serão descritos adiante. Adicionalmente, a cada novo isolamento mitocondrial, essa etapa de verificação foi realizada.

Figura 8. Análise da pureza das frações subcelulares através da imunodeteção de Lamina B2 (65 kDa) como marcador nuclear e TFAM (25 kDa) como marcador mitocondrial. Em cada ensaio, 20 µg das diferentes frações celulares obtidas da linhagem HEK293T (A) ou da linhagem GM1310 (B) foram analisados como descrito em Métodos. Em ambos os painéis Cito= Citosol, N= Núcleo, E.T= Extrato Total, Mito= Mitocôndria. A pureza das frações foi analisada através da ausência de marcação de Lamina B2 nos extratos mitocondriais.

4.2 Recombinação Homóloga na mitocôndria

4.2.1 Verificação da presença das proteínas envolvidas em Recombinação Homóloga (ATM, Rad51 e Rad52) em mitocôndrias isoladas de células humanas

Uma vez obtidas frações mitocondriais livres de contaminação nuclear, as mesmas foram usadas, em experimentos de *western blot*, para verificar a presença de proteínas envolvidas em DSBR. As quebras de duplas fitas no DNA, entre outros eventos, desencadeiam a ativação de quinases que controlam *checkpoints* do ciclo celular. Uma proteína importante na ativação das respostas celulares desencadeadas por quebras de dupla fita é a proteína ATM (*Ataxia Telangiectasia Mutated*), cuja atividade quinase é necessária para a fosforilação e ativação de complexos proteicos envolvidos em reparo (BRANZEI; FOIANI, 2008; LUKAS; LUKAS; BARTEK, 2004). Além disso, o envolvimento dessa proteína na manutenção do DNA mitocondrial havia sido sugerido anteriormente (EATON et al., 2007), apesar da localização mitocondrial da proteína não ter sido demonstrada. Diante disso, resolvemos analisar se esta proteína estava presente nas frações mitocondriais. Como pode ser observado na figura abaixo, uma banda reconhecida pelo anticorpo

anti-ATM, cuja massa molar é equivalente às demais encontradas nas outras frações celulares, foi imunodetectada na fração mitocondrial (figura 9).

Figura 9. Verificação da presença da proteína ATM em diferentes frações celulares. *Western blot* usando anticorpo contra a proteína ATM em diferentes frações celulares da linhagem HEK293T. Foram usadas 50 µg de proteína total em cada canaleta. Cito= Citosol, N= Núcleo, E.T= Extrato Total, Mito= Mitocôndria. Nota-se que foi detectada uma banda semelhante em todas as frações celulares.

Em prosseguimento, buscamos pelas proteínas envolvidas em HR Rad51 e Rad52. Nesses experimentos de *western blot*, usando anticorpo monoclonal anti-Rad51, bandas semelhantes, de cerca de 50 kDa, foram imunodetectadas em todas as frações celulares (figura 10 B). Já para a proteína Rad52, usando anticorpo monoclonal contra essa proteína, nas frações mitocondriais foram imunodetectadas duas diferentes bandas (50 e 43 kDa), ao passo que na fração nuclear, o mesmo anticorpo detectou quatro diferentes bandas (figura 10 B). As bandas detectadas na fração mitocondrial não correspondem à banda majoritária detectado no citosol, nem a nenhuma das bandas detectadas em extratos nucleares.

Figura 10. Verificação da presença da proteína Rad51 e Rad52 em diferentes frações celulares. *Western blot* usando anticorpo contra as proteínas Rad51 (A) e Rad52 (B) em diferentes frações celulares da linhagem HEK293T. Em ambos os casos foram usadas 20 µg de proteína total em cada canaleta. Cito= Citosol, N= Núcleo, E.T= Extrato Total, Mito= Mitocôndria.

4.2.2 Geração de linhagens knockdown para a proteína de HR Rad52

A proteína Rad52 é sabidamente um componente da via de reparo de quebras de duplas fitas através de recombinação homóloga. Diante da identificação

de duas possíveis isoformas distintas dessa proteína na mitocôndria, intentamos saber se a proteína desempenha um papel funcional na manutenção da integridade do genoma mitocondrial, o que poderia ser estudado através de fenótipos mitocondriais, decorrentes da ausência ou diminuição desses níveis proteicos. Para a geração de linhagens isogênicas com níveis reduzidos de Rad52, as células HEK293T foram transfectadas com 4 construções diferentes, consistindo de plasmídeos comerciais, e que expressam *shRNAs* com sequências distintas e específicas para o RNA mensageiro do gene *RAD52*, bem como um *shRNA* contendo uma sequência aleatória, e que não reconhece nenhum alvo no transcriptoma humano.

Após a transfecção das células com *shRNA* específicos procedeu-se a seleção das células transfectadas, o que foi feito através do uso do antibiótico puromicina, cuja concentração foi previamente titulada para essa linhagem celular. A diminuição da expressão do gene *RAD52* foi mensurada a nível proteico, através de experimentos de *western blot*, usando extratos celulares totais das linhagens selecionadas. A quantificação dos níveis de Rad52, apresentada na figura 11, mostra que a sequência de *shRNA* número 1 resultou na redução significativa na expressão, quando comparada ao controle negativo (-), resultante da transfecção com o plasmídeo que codifica para um *shRNA* com sequencia aleatória. A linhagem obtida após a transfecção com o *shRNA* 1 apresentou redução significativa em todas as bandas imunodetectadas pelo anticorpo, sugerindo que todas as possíveis isoformas proteicas foram diminuídas.

Figura 11. Verificação dos níveis proteicos de Rad52 em células HEK293T transfectadas com *shRNA* específico para o produto do gene *RAD52*. *Western blot* usando extrato celular total das linhagens de HEK293T transfectadas para *knockdown* de *RAD52*. (-) transfecção com plasmídeo com sequência *shRNA* aleatória; (1,2,3,4) clones transfectados com plasmídeos contendo diferentes sequências de *shRNAs*. A intensidade da banda obtida com o anticorpo anti-PCNA foi utilizada para normalizar a quantidade de proteína total carregada em cada canaleta.

Uma vez geradas linhagens com expressão reduzida de *Rad52*, a linhagem com maior nível de silenciamento (*shRNA* número 1) foi escolhida para os experimentos que serão descritos a seguir.

4.2.3 Análise relativa do número de cópias de mtDNA e deleções do genoma mitocondrial na linhagem knockdown para *Rad52*

Centenas de mitocôndrias podem existir em um dado tipo celular, com cada organela possuindo entre 2 a 10 cópias do mtDNA. Uma vez que demonstramos a existência de duas possíveis isoformas de *Rad52* na mitocôndria, intentamos elucidar se as mesmas possuem função na manutenção do número de cópias e integridade do mtDNA. Para essa finalidade fizemos experimentos para determinar o número relativo de cópias de mtDNA, em células não transfectadas, transfectada com *shRNA* aleatório e na linhagem com nível reduzido de *Rad52* (linhagem transfectada com *shRNA* número 1).

O número relativo de cópias de mtDNA foi determinado através de PCR quantitativo (qPCR), usando DNA total isolado das linhagens. Para a análise comparativa do número de cópias do mtDNA, os experimentos de qPCR utilizaram a amplificação de uma sequência do genoma mitocondrial de 250 pb, localizada no gene ND1, bem como uma sequência localizada no gene nuclear de cópia única HPRT, o qual foi usado como normalizador para a quantidade total de DNA utilizada como molde. Dessa forma, é possível obter uma quantificação relativa de mtDNA em relação ao DNA nuclear.

Na figura abaixo pode ser observado que a diminuição do nível proteico de *Rad52* resultou na redução significativa do número de cópias do mtDNA, quando comparado tanto ao controle não transfectada quanto ao controle *scrambled* (figura 12).

Figura 12. Verificação da quantidade relativa de mtDNA nas linhagens controle e *knockdown* para *Rad52*. DNA isolado de células HEK293T, transfectadas com plasmídeo com sequência *shRNA* aleatória (*scrambled*) ou com plasmídeos contendo a sequência de *shRNA* (*Rad52 KD*; clone 1) foi submetido a qPCR. Para a quantificação relativa de mtDNA o gene usado como normalizador foi HPRT (ND1/HPRT). As quantificações apresentadas representam a média $\pm$ erro de dois experimentos independentes. * Valor- $p < 0,05$.

Quebras de duplas fitas no mtDNA, se não reparadas corretamente, podem resultar em deleções no mtDNA bem como deficiências na cadeia respiratória (KRISHNAN et al., 2008a; TANG et al., 2000). Sendo assim resolvemos analisar sobre essas deleções. Para a análise qualitativa de deleções no genoma mitocondrial usamos qPCR, amplificando duas sequências distintas desse mesmo genoma. Os genes usados nessa análise foram o ND1, que apresenta frequências de deleção bastante baixas, em análises de populações humanas, e o gene ND4L, que ao contrário do gene ND1, apresenta alta frequência de deleções. Portanto, a razão entre a amplificação de ND1 e ND4L indica a razão entre moléculas de mtDNA intactas e moléculas com deleções que abrangem a região contendo ND4L (HE et al., 2002). Quando analisamos deleções no genoma das mesmas linhagens utilizadas no experimento anterior, verificamos que a diminuição dos níveis da proteína Rad52 resultou em maiores níveis de deleções no genoma mitocondrial, quando comparado ao controle (figura 13).

Figura 13. Verificação das quantidades relativas de deleções no mtDNA nas linhagens controle e *knockdown* para *Rad52*. DNA isolado de células HEK293T não transfectadas, transfectadas com plasmídeo com sequência *shRNA* aleatória (*scrambled*) ou com plasmídeos contendo a sequência de *shRNA* (*Rad52 KD*; clone 1) foram submetidos a qPCR. Para a quantificação relativa de deleções foi usada a relação de amplificação ND1/ND4. As quantificações apresentadas representam a média $\pm$ erro de dois experimentos independentes.

A relação entre redução dos níveis proteicos de *Rad52* e aumento do número de deleções no genoma mitocondrial, podem ser indícios que nessa situação os eventos recombinacionais estão ocorrendo de forma reduzida ou ineficiente (incompletos), o que tem resultado em diminuição de deleções nesse genoma. Sendo assim, os resultados apresentados nas figuras 5 e 6, sugerem que a localização mitocondrial proteína *Rad52* está atrelada a manutenção do número de cópias desse genoma bem como sua integridade.

4.2.4 Verificação do nível proteico intra-mitocondrial da proteína *Rad52* após danos ao DNA induzidos por H_2O_2 e radiação gama

A localização mitocondrial da proteína *Rad52* mostrou-se relacionada com sua atuação na manutenção do número de cópias e integridade desse genoma. Para manutenção da integridade genômica, após a exposição das células a danos ao DNA, várias respostas são induzidas, entre as quais está a translocação de proteínas para compartimentos celulares. Foi recentemente mostrado que o tratamento de células humanas com glicose oxidase, que gera radicais ânion superóxido, além de radiação gama induz a translocação de *Rad51* para o interior da mitocôndria (SAGE; GILDEMEISTER; KNIGHT, 2010). De semelhante modo,

essa translocação proteica para a mitocôndria após a indução de lesões em DNA também foi verificada para proteínas da via de reparo por excisão de bases (FROSSI et al., 2002). Sendo assim procuramos saber se a indução de danos ao DNA induziria translocação das isoformas mitocondriais de Rad52 para a organela.

Para a indução de danos, foram usados dois tratamentos: exposição a 100 μ M de peróxido de hidrogênio por 30 min., e exposição a 5 Gray de radiação gama. Após os tratamentos, as culturas foram incubadas em meio completo por diferentes tempos, até 24 hr. Ao final de cada tempo, as células foram coletadas, as mitocôndrias foram isoladas e os níveis proteicos intra-mitocondriais foram analisados através de *western blot*.

Para a isoforma de 43 kDa, tanto em resposta ao tratamento com peróxido de hidrogênio à radiação gama, seus níveis intra-mitocondriais aumentaram significativamente após os tratamentos. Um rápido e significativo aumento nos níveis intramitocondriais dessa isoforma são observados imediatamente (0h) após o tratamento e permaneceram aumentados por até 6h, retornando aos níveis basais apenas 24 h após a exposição. Um aumento significativo na concentração intramitocondrial dessa isoforma em células irradiadas é detectado 1 h após a exposição, no entanto os níveis proteicos ainda estão aumentados, em relação ao controle não irradiado, 24 h depois da irradiação, indicando uma recuperação mais lenta (figura 14, painel A).

A isoforma de 50 kDa apresentou uma resposta similar a isoforma de 43 kDa em células irradiadas, aonde a concentração intramitocondrial da proteína aumentou significativamente 1 h após a exposição e continuou significativamente aumentada após 24 h. No entanto, em células expostas a peróxido de hidrogênio, a isoforma de 50 kDa apresentou uma resposta distinta da isoforma de 43 kDa, apresentando uma diminuição nos níveis intramitocondriais imediatamente após ao tratamento, que retornaram a níveis não diferentes do controle após 6 h (figura 14, painel B). Conjuntamente, esses resultados indicam que existe uma resposta de translocação ativa das isoformas mitocondriais de Rad52 para o interior da organela após a exposição das células a tratamentos que podem induzir quebras de fitas duplas no mtDNA. No entanto, uma vez que fizemos apenas um ensaio biológico, novos ensaios biológicos precisam ser realizados para verificar sobre a continuidade desse resultado.

Figura 14. Determinação dos níveis intra-mitochondriais da proteína Rad52 após tratamento com H₂O₂ (A) e radiação gama (B). Western Blot realizado utilizando 10µg de proteínas mitocondriais totais. Para a imunodetecção foi utilizado anticorpo específico contra a proteína Rad52. As análises são resultantes de três experimentos de um único ensaio biológico. Os histogramas foram construídos a partir dos dados de análises densiométricas fornecidos pelo Image J ®.

4.2.5 Verificação da associação da proteína Rad52 ao mtDNA após danos ao DNA induzidos por H₂O₂ e radiação do tipo gama

A localização mitocondrial das isoformas da proteína Rad52, associada com o aumento na concentração intramitocondrial após exposição a agentes que causam danos ao DNA, bem como sua atuação na manutenção do número de cópias e integridade do genoma mitocondrial, sugeriu-nos que a mesma pudesse estar envolvida em reparo de quebras de fita dupla no mtDNA. No reparo por HR, após a detecção das quebras de duplas fitas ocorre a ressecção nucleolítica da fita de DNA no sentido 5´-3´ por um complexo chamado MRN (Mre11-Rad50-Nbs1), produzindo fitas simples (ssDNA) contendo -OH livres nos terminais 3´, que são alvo de ligação da proteína Rad51, auxiliada pelos mediadores BRCA2, XRC2, XRC, e Rad52. Este

complexo permite então a formação do fragmento pré-sináptico (Rad51ssDNA) para a procura de regiões de homologia (SAN FILIPPO; SUNG; KLEIN, 2008). Sendo assim, considerando que o papel funcional de Rad52 em HR envolve sua ligação ao DNA lesionado, procuramos saber se as possíveis isoformas da proteína Rad52 associam ao mtDNA em condições normais ou após a indução danos ao DNA.

Os danos ao DNA foram novamente induzidos com pelo tratamento com peróxido de hidrogênio e radiação gama, conforme descrito no item anterior e seguindo a mesma metodologia. Ao final de cada tempo, células controle e tratadas foram coletadas e a associação das proteínas ao mtDNA foi mensurada, usando anti-Rad52 para co-imunoprecipitar DNA ligado à proteína Rad52

Os resultados dessa análise, apresentados na figura 15, mostram que, nas condições testadas, não foi possível detectar associação de Rad52 ao mtDNA, tanto na condição controle ou até mesmo após a indução de danos. Em nenhuma condição experimental, a quantidade de mtDNA associada a Rad52 foi significativamente diferente da quantidade de mtDNA precipitada usando um anticorpo não específico (IgG-mouse), o qual é usado como controle de ligação de baixa afinidade e inespecífica (figura 15). Dessa forma, inferimos que a atuação da proteína Rad52 na manutenção do número de cópias e integridade do genoma mitocondrial pode ocorrer de forma indireta e independente de sua ligação ao mtDNA.

Figura 15. Associação da proteína Rad52 ao mtDNA após tratamento com H₂O₂ ou radiação gama. Células HEK293T foram submetidas à exposição a 100 μ M de H₂O₂ durante 30min (A) ou expostas a radiação gama (5Gy) (B) seguidos de recuperação por 1, 3 e 6 horas. Após cada tempo de recuperação as células tratadas, bem com as controles, foram incubadas com formaldeído. O mtDNA foi imunoprecipitado usando anti-Rad52 e IgG mouse, sendo este último o controle de ligação inespecífica. Os DNAs foram analisados por qPCR e os enriquecimentos na ligação das proteínas ao DNA foram calculados relativos ao controle de ligação inespecífica (IgG mouse). Todos os imunoprecipitados foram normalizados pelo sinal de amplificação do *input*, que consiste no DNA total, o qual foi usado para a imunoprecipitação. Os dados acima são resultantes de experimentos em triplicata a partir de dois ensaios biológicos usando as médias e erros.

4.3 Ligação de pontas não homólogas (NHEJ) na mitocôndria

4.3.1 Identificação das proteínas de NHEJ (DNA-PKCs e Ku70/86) em mitocôndrias isoladas

Para verificar se proteínas envolvidas em reparo através de NHEJ, estavam presentes nas mitocôndrias, realizamos experimentos de *western blot*, com anticorpos específicos para as proteínas de interesse e usando frações mitocondriais purificadas, como foi descrito anteriormente. Os experimentos foram iniciados com a proteína DNA-PKCs, já que a mesma, juntamente com o heterodímero Ku70/86, são constituintes essenciais da via de reparo por ligação de pontas não homólogas (NHEJ)(DOBBS; TAINER; LEES-MILLER, 2010; KURIMASA et al., 1999b; LIEBER, 2010b; YOO; DYNAN, 1999). Além disso essa consiste em um alvo de fosforilação da proteína ATM (CHEN et al., 2007), o qual também identificamos em mitocôndrias. Nos experimentos de *western blot*, usando dois diferentes anticorpos contra DNA-PKCs, imunodetectamos uma banda semelhante, com cerca de 460 kDa, em todas as frações celulares (figura 16).

Figura 16. Verificação da presença da proteína DNA-PKCs em diferentes frações celulares.

Western blot usando anticorpo contra a proteína DNA-PKCs em diferentes frações celulares da linhagem HEK293T. Foram usadas 50µg de proteína em cada canaleta. Cito= Citosol, N= Núcleo, E.T= Extrato Total, Mito= Mitocôndria. A seta indica a região esperada de detecção de uma proteína de 460 kDa.

Em continuidade, passamos para a identificação do heterodímero Ku70/86. Inicialmente usamos anticorpo anti-Ku70 para identificar essa subunidade do heterodímero. Em todas as frações celulares, foi imunodetectada uma única banda, com migração relativa correspondente a cerca de 70 kDa. Resultados semelhantes foram obtidos usando duas linhagens celulares humanas diferentes, HEK293 e GM1310 (figura 17, painel A para HEK293T e B para GM1310).

Figura 17. Verificação da presença da proteína Ku70 em diferentes frações celulares. *Western blot* usando anticorpo contra a subunidade 70 do heterodímero Ku70/86 em diferentes frações celulares das linhagens HEK293T (A) e GM1310 (B). Em todos os casos foram usadas 20µg de proteína total em cada canaleta. Em todos os painéis Cito= Citosol, N= Núcleo, E.T= Extrato Total, Mito= Mitocôndria. As setas referentes à 70 kDa referem-se a Ku70.

Após a detecção da subunidade 70 do heterodímero Ku70/86, realizamos experimentos, usando anticorpos monoclonais contra a subunidade 86. Como pode ser observado, uma banda de massa molar aparente de 86kDa foi imunodetectada nas frações referentes ao núcleo, citosol e extrato total. Em contraposição, somente na fração mitocondrial, a banda imunodetectada possui cerca massa molar aparente de 50 kDa (figura 18).

Figura 18. Verificação da presença da proteína Ku86 em diferentes frações celulares. *Western blot* usando anticorpo contra a subunidade 86 do heterodímero Ku70/86 em diferentes frações celulares da linhagem HEK293T. Foram usadas 20 µg de proteína total em cada canaleta. Cito= Citosol, N= Núcleo, E.T= Extrato Total, Mito= Mitocôndria. Nota-se que na mitocôndria usando esse anticorpo foi detectada uma proteína menor.

Como os resultados anteriores indicaram a possibilidade da existência de uma possível isoforma diferente da subunidade Ku86 na mitocôndria, realizamos um novo experimento, dessa vez utilizando no ensaio de *western blot* a mistura dos dois anticorpos (anti-Ku70 e anti-Ku86), para confirmar a presença das duas subunidades do complexo na mitocôndria. Nessas condições, os resultados obtidos assemelham-

se aos obtidos com os experimentos contendo os anticorpos individualmente, em que verificamos a presença de bandas semelhantes correspondentes a Ku70 em todas as frações subcelulares, e uma banda distinta no extrato mitocondrial de cerca de 50 kDa (figura 19).

Figura 19. Verificação da presença das proteínas Ku70/86 em diferentes frações celulares.

Western blot usando a mistura dos anticorpos anti-Ku70 e anti-Ku86 em diferentes frações celulares da linhagem HEK293T. Em todos os casos foram usadas 20 µg de proteína total em cada canaleta. Cito= Citosol, N= Núcleo, E.T= Extrato Total, Mito= Mitocôndria. A seta marcando a banda de 70 kDa refere-se a Ku70. A seta marcando 86 kDa refere-se à subunidade 86 do heterodímero. Nota-se que novamente na mitocôndria, usando o anticorpo contra a subunidade 86 foi detectada uma proteína menor.

No experimento mostrado acima havíamos utilizado dois diferentes anticorpos anti-Ku86 distinto, porém ambos produzidos contra um epítipo na região C-terminal (resíduos 433- 732) da proteína. Para tentar identificar em quais domínios se diferem as proteínas Ku86 mitocondrial e nuclear, realizamos um novo experimento de *western blot* usando uma mistura dos anticorpos para Ku70 e Ku86. No entanto, foi utilizado um anticorpo produzido contra um epítipo na região N-terminal da proteína (resíduos 1- 374), para verificarmos se essa proteína menor, observada somente nas frações mitocondriais, resultava de uma possível perda de sequência nessa região. Uma vez que a proteína mitocondrial possui cerca de 50 kDa, usamos como controle de carregamento a proteína PCNA (antígeno de proliferação celular e nuclear) visto que a mesma possui massa molar menor (35 kDa). Como pode ser visto na figura 20, a banda mitocondrial de cerca de 50 kDa que tinha sido observada com o anticorpo que reconhece a região C-terminal de Ku86 não foi detectada com este anticorpo. Observamos apenas uma leve marcação para PCNA, que pode ser resultante de uma pequena contaminação nuclear. Adicionalmente, essa inexistência de marcação não foi resultado da ausência de amostra, uma vez

que nesta canaleta houve marcação para a subunidade 70 do heterodímero Ku (figura 20). Em conjunto, os dados apresentados até aqui mostram que as proteínas de NHEJ localizam na mitocôndria e que a subunidade 86 mitocondrial do heterodímero Ku difere na região N-terminal da subunidade 86 nuclear.

Figura 20. Imunodeteção das proteínas Ku70 e Ku86 (região N-terminal) em diferentes frações celulares. *Western blot* usando uma mistura dos anticorpos anti-Ku70 e anti-Ku86-N terminal (resíduos 1-374) em diferentes frações celulares da linhagem HEK293T. Em todos os casos foram usadas 10 µg de proteína total em cada canaleta. Cito= Citosol, N= Núcleo, E.T= Extrato Total, Mito= Mitocôndria. A seta marcando 70 kDa referem-se a Ku70, e a seta marcando 86 kDa refere-se à subunidade 86 do heterodímero. Nota-se que na mitocôndria, usando o anticorpo contra a região N terminal subunidade 86 (50 kDa) não foi detectada nenhuma proteína. A proteína PCNA (35 kDa) foi usada como controle de carregamento.

4.3.2 Verificação da localização mitocondrial das proteínas Ku70/86

Os experimentos de *western blot* permitiram a identificação, entre outras, do heterodímero Ku em mitocôndrias. Em continuidade, passamos a investigar em qual compartimento mitocondrial essas proteínas estavam localizadas. Para isso, mitocôndrias isoladas foram submetidas ao tratamento com proteinase K, na ausência ou presença de digitonina, o qual solubiliza a membrana mitocondrial externa, bem como SDS, o qual solubiliza ambas membranas mitocondriais, e consequentemente a exposição de todo conteúdo intramitocondrial à digestão pela proteinase K. Como controles usamos TFAM, uma proteína que está associada ao nucleóide e presente na matriz mitocondrial, bem como COXIV, uma subunidade do complexo IV da cadeia respiratória, que se localiza na membrana mitocondrial interna, voltado para a matriz mitocondrial (ALAM et al., 2003; HATEFI, 1985).

Como pode ser observado na figura abaixo (figura 21) a adição de digitonina, que permeabiliza a membrana mitocondrial externa, mas não a membrana mitocondrial interna, não resultou em alterações significativas no sinal das bandas correspondentes ao heterodímero Ku. Somente após a adição de SDS, que permeabiliza a membrana mitocondrial interna, as bandas correspondentes ao heterodímero foram perdidas com o tratamento com proteinase K, assim como ocorreu para as proteínas intramitocondriais TFAM e COXIV. Isso mostra que as proteínas do heterodímero estão, de fato, localizadas na matriz mitocondrial, e não somente proteínas associadas à face externa da membrana mitocondrial.

Figura 21. Ensaio de digestão proteica por proteinase K na presença ou ausência de detergentes. Mitocôndrias isoladas foram tratadas com proteinase K na presença ou ausência de digitonina e SDS. O volume total da reação foi separado em gel de SDS-PAGE seguido de *western blot* usando anticorpos contra as proteínas Ku70, Ku86, TFAM e COXIV.

4.3.3 Investigação da localização mitocondrial da proteína Ku86 *in silico*

A translocação de proteínas nucleares à mitocôndria está relacionada, na maioria dos casos, à presença de resíduos básicos na região N-terminal, que caracterizam um peptídeo-sinal de translocação para a organela. Após a entrada da proteína na mitocôndria, é comum que ocorra clivagem desse peptídeo-sinal por peptidases de processamento mitocondrial, MPPS, que removem as pré-sequências necessárias à entrada na mitocôndria (CHACINSKA et al., 2009). Uma vez que os estudos realizados mostraram que as subunidades do heterodímero Ku localizam-se

na matriz mitocondrial, e proteínas localizadas nesta região comumente apresentam resíduos básicos e sítios de clivagem por MPP, trabalhou-se com a hipótese de que a proteína Ku86 fosse clivada após a entrada na mitocôndria, gerando a isoforma menor detectada na matriz mitocondrial. Para isto, buscou-se avaliar a probabilidade da proteína Ku86 ser direcionada à mitocôndria com base em sua sequência proteica (estrutura primária), focando-se na análise de sua região N-terminal e características físico-químicas da proteína (carga líquida, número de resíduos básicos e ácidos da região analisada) por meio do programa MitoProt II (CLAROS; VINCENS, 1996). Com base nos dados da sequência anotada de Ku86, a proteína apresenta uma baixa probabilidade de ser encontrada na mitocôndria (a saber, 0,0429), logo a hipótese de que Ku86 possua sítios de clivagens na região N-terminal foi descartada (figura 22).

MITOPROT:
Prediction of mitochondrial targeting sequences

Enter your query sequence:
(Spaces, numbers, non-alphabetic characters will be automatically removed)

MVRSNGKAAVVLCHMDVGFMTMSNSIPGIESPFEQAKKVITMFVQRQVFAENKDEIALVLFGT
DGTDNPLSG
GDQYQNTVHRHMLPDPFDLLEDIESKIQPGSQQADFLDALIVSMDVIQHETIGKKFEKRHI
EIFTDLSS
RFSKSQLDIIHSLKKCDISLQFFLPFSLGKEDGSGDRGDGPFRLLGGHGPSFPLKGITEQQK
EGLEIVKM
VMISLEGEDGLDEIYSFSESLRKL CVFKKIERHSIHWPCRLTIGSNLSIRIAAYKSILQERVKK
TWTVVD
AKTLKKEDIQKETVYCLNDDDETEVLKEDI IQGFYGSDIVPFSKVDEEQMKYKSEGKCFSV
LGFCSSQ

Sequence name (optional): Ku86

Submit Clear

MitoProt calculates the N-terminal protein region that can support a Mitochondrial Targeting Sequence and the cleavage site. A complete description of the method to make the prediction is available in: M.G. Claros, P. Vincens. *Computational method to predict mitochondrially imported proteins and their targeting sequences*. Eur. J. Biochem. 241, 779-786 (1996).
The MitoProt software is available by:
<ftp://ftp.biologie.ens.fr/pub/molbio>

Number of basic residues in targeting sequence : 2
Number of acidic residues in targeting sequence : 0
Cleavage site : not predictable
Cleaved sequence :

HYDROPHOBIC SCALE USED

	GES	KD	GVH1	ECS
H17	1.159	1.871	0.138	0.595
MesoH	-0.563	0.339	-0.360	0.233
MuHd_075	10.881	1.933	3.313	1.710
MuHd_095	30.880	13.737	9.218	5.810
MuHd_100	21.385	12.437	6.917	5.000
MuHd_105	16.475	10.293	3.850	4.910
Hmax_075	15.050	11.667	3.248	4.503
Hmax_095	14.875	15.400	4.020	5.084
Hmax_100	16.000	18.000	4.434	5.660
Hmax_105	7.933	15.167	2.508	4.223

PROBABILITY

of export to mitochondria: 0.0429

Figura 22. Análise da probabilidade de direcionamento mitocondrial da sequência primária de Ku86 através do programa MitoProt II – A sequência proteica anotada (NP_066964.1) de Ku86 (732 aminoácidos) foi utilizada como sequência de entrada.

A análise dos dados fornecidos indica que a proteína não possui sítios de clivagem por MPPs e baixa probabilidade de direcionamento mitocondrial (0,0429). No entanto uma vez que essas sequências também poderiam estar presentes nas regiões mais internas da proteína, isso foi usado como suporte para a busca por motivos internos de clivagem e direcionamento mitocondrial na sequência de Ku86. Desta forma, avaliou-se a presença de motivos internos de clivagem por meio da ferramenta *sigcleave* do software Emboss (RICE; LONGDEN; BLEASBY, 2000). O resultado obtido é mostrado na figura 23. Dois sítios de clivagem relevantes foram obtidos, sendo o sítio 2 (aminoácidos 371 e 383) o de maior relevância para o trabalho, já que gera um fragmento C-terminal de 349 aminoácidos, correspondente a 40 kDa e abrangendo a região C terminal reconhecida pelos anticorpos anti-Ku86 usadas nesse trabalho (433 a 732). No entanto novas buscas usando diferentes programas, em análises mais refinadas, bem como levado em consideração a localização desse sítio na estrutura tridimensional da proteína precisam ser realizadas a fim de fundamentar esse resultado.

OUTPUT FILE [outfile](#)

```
#####
# Program: sigcleave
# Rundate: Wed 3 Dec 2014 19:10:47
# Commandline: sigcleave
#   -auto
#   -sequence /geninf/prog/www/htdocs/tools/emboss/output/745327/.sequence
#   -minweight 3.5
#   -noprokaryote
#   -outfile outfile
#   -rformat2 motif
# Report_format: motif
# Report_file: outfile
#####

#=====
#
# Sequence:      from: 1   to: 732
# HitCount: 2
# Reporting scores over 3.50
#=====

(1) Score 4.557 length 13 at residues 158->170

Sequence: DISLQFFLPFSLG
          |             |
          158           170
mature_peptide: KEDGSGDRGDGPFRLLGGHGPSFPLKGITEQQKEGLEIVKMMISLEGEDG

(2) Score 3.808 length 13 at residues 371->383

Sequence: EAAVALSSLIHA
          |             |
          371           383
mature_peptide: LDOLDHVAIVRYAYDKRANPQGVAFPHIKHNYECLVYVQLPFMEDLRQY

#-----
#-----

#-----
# Total_sequences: 1
# Total_hitcount: 2
#-----
```

Figura 23. Avaliação da existência de sítios de clivagem internos na sequência proteica de Ku86 através do programa Emboss – A sequência proteica anotada de Ku86 (732 aminoácidos) foi utilizada como sequência de entrada. Os dados fornecidos indicam que a proteína possui dois sítios internos de clivagem: (1) resíduos 158 a 170, resultando em sequências com 13, 158 e 561 aminoácidos e (2) resíduos 371 a 383, resultando em sequências com 13, 348 e 371 aminoácidos.

4.3.4 Co-imunoprecipitação do heterodímero Ku nas frações mitocondriais e nucleares

Visto que os experimentos de *western blot*, usando anticorpo anti-Ku86, identificaram uma subunidade mitocondrial putativa de Ku86 de massa molar aparente de 50 kDa, procuramos descobrir se a mesma, juntamente com a subunidade de 70 kDa, formaria um heterodímero Ku mitocondrial. Para isso fizemos experimentos de co-imunoprecipitação de proteínas. Nesses experimentos a subunidade 70 foi usada como “isca”, uma vez que a mesma isoforma é encontrada em ambas as frações, mitocondrial e nuclear. Para a imunodeteção dos complexos

imunoprecipitados, usamos anticorpo contra a subunidade 86. Como pode ser visto na figura 17, na faixa de migração correspondente a massa molar aparente de 86 kDa, na fração nuclear, pode ser observado que a subunidade 86 do heterodímero Ku70/86 foi co-imunoprecipitada. Em contraposição, na fração mitocondrial, nessa faixa de migração, nenhuma proteína imunoreativa foi detectada. Já na região referente a 50 kDa, a mesma banda identificada nos experimentos utilizando extratos mitocondriais totais foi detectada. Diante disso, esses dados sugerem a existência de heterodímeros diferentes, no núcleo e na mitocôndria, formados pelas subunidades Ku70/86 no núcleo, e Ku70/50 na mitocôndria (figura 24).

Figura 24. Co-imunoprecipitação do heterodímero Ku70/86 nas frações mitocondrial e nuclear da linhagem HEK293T. O imunoprecipitado obtido usando o anticorpo contra a subunidade 70 do heterodímero Ku foi analisado por *western blot* usando anticorpo contra a subunidade 86 desse heterodímero (painéis superiores), e anticorpo anti-Ku70 (painel inferior), para confirmar a imunoprecipitação dessa subunidade. IP Núcleo= imunoprecipitado da fração nuclear; IP Mito = imunoprecipitado da fração mitocondrial; N. Control= controle negativo (sem anticorpo).

4.3.5 Identificação da subunidade mitocondrial do heterodímero Ku por HPLC/ESI/MS após digestão triptica

Como foi relatado até então, observamos na mitocôndria a existência de uma subunidade alternativa de Ku86 e constituinte do heterodímero mitocondrial Ku70/50. A sequência primária da subunidade 86 do heterodímero nuclear Ku70/86 é conhecida e disponível em bancos de dados. No entanto, para a subunidade mitocondrial de 50 kDa, nosso conhecimento estava baseado até então, apenas em informações referentes as regiões que são reconhecidas por anticorpos, visto que ambas proteínas são reconhecidas por anticorpos específicos para epítomos na região C-terminal da subunidade 86, ao passo que o anticorpo para a região N terminal de Ku86 não reconhecia a proteína mitocondrial. Diante disso, propomos a hipótese que Ku50 poderia ser uma isoforma distinta da subunidade nuclear, no qual

a região C-terminal foi mantida em ambas as proteínas, mas que sofreu processamento na região N-terminal, como é comum para proteínas que são transportadas para a matriz mitocondrial. Desta forma, para melhor caracterizar a sequência da subunidade mitocondrial, fizemos experimentos de sequenciamento utilizando material obtido através de co-imunoprecipitação, usando como “isca” a subunidade Ku70, seguida por separação dos produtos imunoprecipitados em gel de SDS-PAGE (1D e 2D).

Visto que o nosso interesse consistia em identificar a subunidade de 50 kDa, todos os produtos imunoprecipitados cuja migração correspondeu à faixa de massa molar entre 40 - 70 kDa para o gel 1D, e todos os *spots* do gel 2D foram recuperados dos géis. As amostras recuperadas, tanto para o gel 1D quanto para o gel 2D estão assinaladas na figura 25, painéis A e B, respectivamente. Essas amostras foram submetidas à digestão trípica e os peptídeos identificados, em espectrômetro de massa MS/MS. Os peptídeos obtidos foram, então, utilizados para busca de homologia em um banco de dados, o qual continha a sequência da subunidade 86 nuclear, após a digestão trípica teórica. Usando essa estratégia, para a banda cortada do gel 1D (marcada pela flecha) identificamos 16 peptídeos correspondentes a peptídeos obtidos da digestão trípica da subunidade 86 (figura 25 A e tabela 2). de No *spot* 5 do gel 2D (indicado pela flecha) foram identificados 14 peptídeos correspondentes a peptídeos teóricos de Ku86 (figura 25 B e tabela 2).

Figura 25. Caracterização do heterodímero mitocondrial Ku70/50 a partir de células HEK293T.

Os complexos de proteínas foram imunoprecipitados utilizando um anticorpo contra a subunidade Ku70 e separados em gel 1D-SDS PAGE (A) ou 2D (B). Mito IP e Núcleo IP referem-se aos imunoprecipitados de frações mitocondriais e nucleares, respectivamente; M.E. refere-se a extratos

mitocondriais; Controle negativo refere-se a resina, depois da incubação com extratos nucleares e mitocondriais. As setas mostram as proteínas que foram usadas para sequenciamento e comparação com a sequência de Ku86, e mostradas na tabela 2. C) Homologia entre os peptídeos identificados por HPLC/ESI/MS, a partir da digestão triptica da banda obtida no gel 1D-SDS PAGE com a sequência da proteína Ku86 nuclear.

Tabela 2. Análise comparativa dos peptídeos obtidos a partir da digestão teórica de Ku86 por tripsina com os peptídeos identificados por HPLC/ESI/MS nas amostras imunoprecipitadas

Sequência Ku 86 (Posição)	Massa teórica (MH)⁺	1-D banda (~50kDa)	2-D Spot 5
KVITMFVQR (36-44)	1121.6	-	1121.6
VITMFVQRQVFAENK (37-51)	1809.9	1809.9	-
FEKRHIEIFDLSSRFSK (127-144)	2240.1	-	-
RHIEIFDLSSR (130-141)	1473.7	-	-
RHIEIFDLSSRFSK (130-144)	1835.9	1835.9	1835.9
FEKRHIEIFDLSSR (127-141)	1877.9	1877.9	-
FSKSQLDIIHSLKK (142-156)	1757.0	-	-
SQLDIIHSLKK (145-156)	1394.8	1394.8	1394.8
CDISLQFFLPFSLGK (157-171)	1714.8	-	1714.8
EDGSGDRGDGPFR (172-184)	1364.5	-	1364.5
LGGHGPSFPLK (185-195)	1109.6	-	1109.6
LGGHGPSFPLKGITEQIHSLK (185-205)	2216.2	2216.2	-
KCDISLQFFLPFSLGK (206-221)	1900.0	1900.0	-
EDGSGDRGDGPFR LGGHGPSFPLK (222-245)	2455.1	2455.1	-
IAAYK (261-265)	565.3	-	565.3
SILQERVKK (266-274)	1100.6	-	1100.6
TWTVVDK (275-282)	919.4	919.4	-
TLKKEDIQK (183-291)	1102.6	-	1102.6
EDIIQGFR (308-315)	977.5	-	977.5
EDIIQGFYRGSDIVPFSKVDEEQMK (308-332)	2930.4	2930.4	-
YGSDIVPFSKVDEEQMK (316-322)	1971.9	-	-
VDEEQMKYK (326-334)	1169.5	1169.5	-
CFSVLGFCKSSQVQR (339-353)	1802.8	-	1802.8
SSQVQRRFFMGNQVLK (348-363)	1925.0	-	-
RFFMGNQVLKVFAAR (354-368)	1783.9	1783.9	-
RANPQVGVAFPHIK (400-413)	1533.8	1533.8	-
QYMFSSLKNSKK (432-443)	1460.7	1460.7	1460.7
YAPTEAQLNAVDALIDMSLAK (444-465)	2321.1	2321.1	-
DEKTDLTLEDLPPTTK (467-481)	1752.8	-	1752.8
LFQCLLHR (490-497)	1029.5	-	1029.5
EPLPPIQQHIWNMLNPPAEVTTK (503-525)	2653.3	2653.3	-
IKTLFPLIEAKKK (533-545)	1528.9	1528.9	-

Na figura 25 C, os 16 peptídeos identificados no gel 1D, visto que foram mais abundantes, foram alinhados com a sequência de Ku86 nuclear, e conforme pode ser observado estes, esses cobriam principalmente regiões mais distais da sequência de Ku86, sendo que somente um peptídeo identificado mapeou nos primeiros 100 aminoácidos da proteína. Ademais se comparamos na tabela 2, que apresenta todos os peptídeos obtidos da digestão teórica de Ku86, e se cada um desses foi identificado no gel 1D, 2D, ambos ou nenhum amostra, com exceção dos dois peptídeos teóricos abrangendo os aminoácidos 127-144, 142-156 e um peptídeo em 348-363, todos os outros foram identificados nas amostras mitocondriais. Dessa forma esses resultados, juntamente com os experimentos de *western blot* descritos anteriormente, suportam a hipótese de que a subunidade mitocondrial Ku50 é uma isoforma variante da proteína Ku86 nuclear.

4.3.6 Co-imunoprecipitação da proteína DNA ligase III com os heterodímeros Ku70/86 nas frações mitocondriais e nucleares

O reparo de DNA por NHEJ, no núcleo, tem início com a associação do heterodímero Ku70/86 às pontas livres do DNA. Uma vez ligado, esse heterodímero é responsável pelo recrutamento dos demais fatores envolvidos no reparo e que formarão um complexo proteico que, entre outras atividades, processam as fitas simples do DNA, quando necessário. Já na última etapa existe a associação das proteínas DNA ligase IV/XLF, XRCC4 e demais fatores associados a esse complexo que, em conjunto, serão responsáveis pela ligação das pontas do DNA (DING et al., 2003; KURIMASA et al., 1999a; LIEBER, 2010a; MISTELI; SOUTOGLOU, 2009).

Em mitocôndrias DNA ligase III é a única DNA ligase identificada até o momento (LAKSHMIPATHY; CAMPBELL, 1999a; SIMSEK et al., 2011). Uma vez que no núcleo DNA ligase III está envolvida em reparo, intentamos saber se na mitocôndria a mesma também constitui um componente do complexo envolvido em reparo através de NHEJ. Para isso fizemos experimentos de co-imunoprecipitação usando Ku70 como “isca”, uma vez que ela possui isoformas semelhantes em ambas frações, mitocondrial e nuclear. Para a imunodeteção do ligante, usamos anticorpo contra DNA ligase III, na tentativa de identificar a interação física entre DNA ligase III e o heterodímero Ku. Como pode ser visto na figura 26, detectamos, nos imunoprecipitados, bandas com migração aparente de 104 kDa, correspondente a massa molar de DNA ligase III, que co-imunoprecipitaram com Ku70. Bandas

similares foram detectadas nos extratos mitocondrial e nuclear, o qual foi usado como controle positivo para a detecção e faixa de migração da proteína. Diante disso, esses dados sugerem a associação da DNA ligase III aos diferentes heterodímeros, nuclear (Ku70/86) bem como ao mitocondrial (Ku70/50), o que indica que a mesma também atue no reparo de quebras de duplas fitas no DNA mitocondrial.

Figura 26. Co-imunoprecipitação da proteína DNA ligase III com o heterodímero Ku nas frações mitocondrial e nuclear da linhagem HEK293T. O imunoprecipitado obtido usando o anticorpo anti-Ku70 foi analisado por *western blot*, usando anticorpo anti-DNA ligase III. Cerca de 10 µg de extratos mitocondrial (Mito +) e nuclear (Núcleo +) foram utilizados como controles positivos do *western blot*. IP Núcleo= imunoprecipitado da fração nuclear; IP Mito = imunoprecipitado da fração mitocondrial; C. Negativo= resina após a incubação com os extratos mitocondriais e nucleares. Para a fração nuclear foram usados dois volumes diferentes (20 µL e 10 µL) do imunoprecipitado. Já para a fração mitocondrial foram usados três volumes diferentes (20 µL, 10 µL e 40 µL) do imunoprecipitado.

4.3.7 A estabilidade proteica do heterodímero mitocondrial Ku70/50 é regulada por ATM

Recentemente foi demonstrado que extratos mitocondriais provenientes de células com mutação em ATM, quando incubados com plasmídeos linearizados com enzima de restrição, apresentavam atividade de ligação dos plasmídeos diminuída em comparação com extratos de células selvagens, o que foi atribuído à diminuição da estabilidade da proteína DNA ligase III (SHARMA et al., 2014). Uma vez que os experimentos de co-imunoprecipitação demonstraram que DNA ligase III forma um complexo proteico estável com o heterodímero mitocondrial Ku70/50, verificamos se assim como ocorre para a DNA ligase III, ATM também modularia a estabilidade do heterodímero mitocondrial Ku70/50. Para isso analisamos, através de *western blot* os níveis das subunidades do heterodímero em células selvagens e em células contendo uma mutação em ATM. Como pode ser observado na figura abaixo, os

níveis das proteínas Ku70 e Ku50 são significativamente menores em extratos mitocondriais da célula mutante para ATM, quando comparados ao controle. Sendo assim, além de DNA ligase III, ATM também regula a estabilidade proteica das subunidades do heterodímero Ku70/50 mitocondrial (figura 27).

Figura 27. ATM regula a estabilidade do heterodímero mitocondrial Ku70/50. Western blot quantitativo para determinação dos níveis do heterodímero Ku70/50 em mitocôndrias isoladas de células normais e mutadas em ATM. VDAC1 (Voltage-Dependent Anion Channel) foi utilizado como a proteína normalizadora. O histograma apresenta os dados referentes à análise densitométrica de dois ensaios biológicos (n = 2), realizados em triplicata.

4.3.8 Envolvimento do heterodímero Ku70/50 em NHEJ na mitocôndria e associação ao mtDNA após tratamento com H₂O₂

Diante da caracterização do heterodímero Ku70/50 mitocondrial, procuramos investigar se esse desempenha um papel funcional em NHEJ mitocondrial e na manutenção da integridade do genoma mitocondrial. Para essa finalidade inicialmente geramos células com níveis proteicos diminuídos do heterodímero. Para isso as células HEK293T foram transfectadas com 4 construções diferentes consistindo de plasmídeos comerciais que expressam *shRNAs* com sequências distintas para o RNA mensageiro *Xrcc6* (*Ku70*), bem como um *shRNA* contendo uma sequência aleatória. Usamos como alvo a subunidade 70, já que suas isoformas mitocondriais e nucleares são semelhantes. Além disso, é descrito na literatura que na ausência de uma de suas subunidades, o heterodímero é instável (BERTOLINI et al., 2007).

A verificação da redução da expressão dos genes de interesse foi mensurada a nível proteico, através de experimentos de *western blot*, usando extratos celulares totais das linhagens obtidas após a transfecção e seleção. Através dessa estratégia obtivemos um clone (3) que apresentou redução significativa nos níveis de ambas subunidades Ku70 e Ku86, quando comparada ao controle negativo (figura 28).

Figura 28. Verificação dos níveis proteicos do heterodímero Ku em células HEK293T transfectadas com shRNA específico para o produto do gene XRCC6 (Ku70). *Western blot* usando extrato celular total dos clones de HEK293T transfectadas com shRNAs específicos para *Xrcc6*. (-) transfecção com plasmídeo com sequência shRNA *scrambled*; (1,2,3) clones transfectados com plasmídeos contendo a sequências alvo.

Uma vez gerada essa linhagem *knockdown* para Ku70/86, procuramos investigar se esse heterodímero está envolvido em NHEJ em mitocôndrias, assim como ocorre no núcleo. As evidências já reportadas para a existência de mecanismos que reparam quebras de duplas fitas de DNA nas mitocôndrias vêm de experimentos *in vitro* utilizando plasmídeos linearizados pela clivagem com enzima de restrição, cuja re-ligação ocorreu após a incubação com extratos mitocondriais (LAKSHMIPATHY; CAMPBELL, 1999b; THYAGARAJAN; PADUA; CAMPBELL, 1996). Diante disso, produzimos extratos mitocondriais das linhagens normais e *knockdown* para Ku70. Esses extratos foram incubados com o substrato linearizado (pUC19 *EcoRI*) durante 2h a 25°C. Ao final desse tempo os produtos de ligação foram analisados em gel de agarose.

Visto que queríamos comparar a formação de produtos em extratos mitocondriais distintos, inicialmente fizemos experimentos para estabelecer a faixa de concentração de extrato que resulta em formação de produto na fase linear da curva de atividade enzimática. Para isso foram usadas diferentes quantidades do extrato mitocondrial da linhagem controle, bem como extrato celular total. Nesse

ensaio o extrato celular total foi usado como o controle das condições, uma vez que estas foram pré estabelecidas usando-o, devido a sua facilidade de obtenção. Adicionalmente, usamos a incubação do substrato com T4-DNA ligase comercial como um controle de faixa de migração dos produtos no gel. Dessa forma, estabelecemos que o uso de 50 µg ou 100 µg de extrato mitocondrial em cada ensaio permite a detecção de produtos, ainda na faixa linear da curva de atividade (figura 29 A).

Uma vez estabelecidas as condições do ensaio, essas foram aplicadas em ensaios usando extratos mitocondriais das linhagens controle e *knockdown* para Ku70/86. Nessas condições, observamos que os extratos mitocondriais provenientes da linhagem *knockdown* para Ku70/86 geraram significativamente menos produtos de ligação dos plasmídeos, em comparação com a linhagem controle (figura 29 B), sugerindo um papel essencial do heterodímero mitocondrial Ku70/50 em NHEJ.

Figura 29. Ensaio *in vitro* para a medida da atividade de NHEJ. (A) Em cada reação foram usadas 0, 50 ou 100 µg de extrato mitocondrial da linhagem controle, bem como 100 µg de extrato celular total dessa mesma linhagem. Como controle positivo foi usado o substrato (pUC19 linearizado com *EcoRI*) incubado com T4-DNA ligase. (B) Foram usadas 0, 50 ou 100 µg de extrato mitocondrial da linhagem controle (Scr) ou da linhagem *knockdown* para Ku70/86 (Ku:KD). Para cada reação, 200 ng de DNA (pUC19 linearizado com *EcoRI*) foram incubados com as diferentes concentrações de extratos em tampão de reação. As imagens apresentadas representam resultados típicos de pelo menos dois experimentos independentes. As setas pretas e vermelhas assinalam a migração dos monômeros e dímeros, respectivamente.

4.3.9 Associação das proteínas de NHEJ (Ku70/50, DNA-PKCs e DNA ligaseIII) ao mtDNA após tratamento com H_2O_2 .

Durante NHEJ no núcleo, a ligação do heterodímero Ku70/86 às extremidades do DNA fita simples constitui o evento inicial dessa via (LIEBER, 2010a). Visto que já identificamos que o heterodímero Ku70/50 está presente e atua em NHEJ mitocondrial, procuramos saber se o mesmo, bem como as demais proteínas da via (DNA-PKCs e DNA ligaseIII), associam ao mtDNA após indução de danos. Para a indução de danos foi usado um tratamento com 100 μ M de peróxido de hidrogênio por 30 min, seguido de troca de meio e repouso por tempos de 1, 3, 6 horas. Ao final de cada tempo, as células controle e tratadas foram coletadas e a associação das proteínas ao mtDNA foi mensurada, usando co-imunoprecipitação de DNA, como descrito anteriormente. O mtDNA co-imunoprecipitado com cada anticorpo específico foi submetido a PCR e os produtos visualizados em gel de agarose. Os resultados apresentados na figura 30 mostram que após o tratamento, para ambas proteínas DNA ligase III (1h após a indução de danos) e DNA-PKCs (3h após a indução de danos) corre um desligamento das mesmas do mtDNA, comparado a situação controle. Em contraposição, para as proteínas Ku70 e Ku50, 3h após a indução de danos houve aumento de cerca de duas vezes na quantidade de mtDNA associado às duas subunidades do heterodímero Ku, o qual retorna para níveis normais no tempo de 6h (figura 30 A e B).

Figura 30. Associação das proteínas Ku70/50, DNA ligase III e DNA-PKCs ao mtDNA após o tratamento com H_2O_2 . **A**-Células HEK293T foram submetidas à exposição a $100\mu M$ de H_2O_2 durante 30min seguidos de repouso por 1, 3 e 6 horas. Após cada tempo, as culturas foram incubadas com formaldeído. O mtDNA foi imunoprecipitado usando os anticorpos indicados e IgG mouse, sendo este último o controle de ligação inespecífica. Os DNAs foram analisados por PCR os fragmentos de DNA foram separados em um gel de agarose 0,7%, corado com brometo de etídeo. Os enriquecimentos na ligação das proteínas ao DNA foram verificados relativos ao controle de ligação inespecífica (IgG-mouse). **B**- O mtDNA imunoprecipitado usando os anticorpos Ku70/86 e (IgG mouse) foram analisados através de qPCR e os enriquecimentos na ligação das proteínas ao DNA foram também foram calculados relativos ao controle de ligação inespecífica (IgG mouse).

Diante do aumento da associação das proteínas Ku70/50, que também foi confirmada usando experimentos de qPCR, procuramos distinguir se esse aumento era decorrente do aumento da concentração intramitocondrial das proteínas ou da maior ligação ao mtDNA de proteínas já presentes na matriz mitocondrial. Nesse sentido, ao final de cada tempo, as células controle e tratadas foram coletadas, mitocôndrias foram isoladas e os níveis proteicos do heterodímero Ku70/50 foram

mensurados usando *western blot*. Através desse experimento verificamos que não houve aumento significativo nos níveis proteicos intramitocondriais tanto de Ku70 quanto de Ku50, que permaneceram inalterados por até 24 h após o tratamento (figura 31). Sendo assim o aumento da associação dessas proteínas ao mtDNA é decorrente de resposta ao tratamento com H₂O₂, e não apenas resultado de aumento de translocação das mesmas para a mitocôndria. Nesse sentido esse resultado reforça a proposição de que essas proteínas atuam em reparo de mtDNA.

Figura 31. Determinação dos níveis intra-mitocondriais do heterodímero Ku70/50 após o tratamento com H₂O₂. *Western blot* realizado utilizando 5 µg de proteínas mitocondriais. Para a imunodeteção foram utilizados anticorpos anti-Ku70 e anti-KU86 e VDAC1.. O histograma apresenta dados resultantes de análise densiométrica utilizando Image J ®. Os resultados apresentados são media ± erro de três experimentos de dois ensaios biológicos

4.3.10 NHEJ e a integridade do mtDNA

Demonstramos que proteínas de NHEJ estão presentes em mitocôndrias humanas. Além disso, o heterodímero Ku70/50 se associa ao mtDNA após tratamento que pode induzir quebras de fitas duplas de DNA (H₂O₂) e é necessário para atividade de NHEJ em extratos mitocondriais *in vitro*. Sendo assim, intentamos elucidar se a via NHEJ, mediada pelo heterodímero Ku70/50, possui função na manutenção do número de cópias e integridade do mtDNA. Para essa finalidade usamos células com diminuição dos níveis das proteínas do heterodímero Ku70/50, para analisarmos o número de cópias do mtDNA.

Para a determinação do número relativo de cópias do mtDNA foi usado o PCR quantitativo (qPCR), com o DNA isolado das linhagens *knockdown* para Ku70/86, normal ou transfectada com um *shRNA* de sequência aleatória. Nesses experimentos observamos que a diminuição dos níveis proteicos de Ku70/50

resultou em uma redução significativa do número de cópias do genoma mitocondrial, comparado as linhagens controle não transfectada e *scrambled* (figura 32).

Figura 32. Verificação das quantidades relativas de mtDNA nas linhagens controle e *knockdown* para Ku70. DNAs totais isolados de células da linhagem HEK293T selvagem, transfectadas com plasmídeo com sequência *shRNA* aleatória (*scrambled*) ou com plasmídeos contendo a sequência de *shRNA* (Ku70/86 KD; clone 3) foram submetidos a qPCR. Para a quantificação relativa de mtDNA o gene usado como normalizador foi HPRT (ND1/HPRT). Os valores C_t foram analisados pelo método $\Delta\Delta C_t$. Os dados apresentados representam a média $\pm$ erro de experimentos em triplicata de dois ensaios biológicos diferentes.

Em geral, um dado tipo celular possui centenas de mitocôndrias, sendo que cada uma possui várias cópias do mtDNA. Sendo assim procuramos discernir se o efeito observado nas células *knockdown* para Ku70/86 era resultado de uma diminuição do número de cópias de mtDNA por mitocôndria ou da diminuição do número de mitocôndrias por célula, o que também resultaria numa diminuição na razão mtDNA/nDNA, como observado. Para isso, medimos a atividade de citrato sintase, uma enzima exclusivamente mitocondrial, cuja atividade não varia significativamente em resposta a várias condições ambientais e durante o ciclo celular (SRERE, 1969), e que é, portanto, utilizada como um indicador do conteúdo mitocondrial por célula. Analisando a atividade dessa enzima não observamos diferenças significativas entre as linhagens (figura 33), sugerindo que a ausência do heterodímero Ku70/50 causa uma diminuição no número de cópias de mtDNA por organela, sem alterações na massa mitocondrial.

Figura 33. Atividade de Citrato Sintase em células controle e Ku70 knockdown. A conversão de DTNB a TNB pela enzima citrato sintase foi monitorada, durante 5 minutos (412 nm), em ensaios contendo 3,0 µg de proteína total de cada linhagem. Os valores são apresentados como média ± e.p.m. (n=4).

Uma vez que a perda do número de cópias do mtDNA observada na linhagem *knockdown* para Ku70/86 não foi resultante de alterações na massa mitocondrial isso sugeriu-nos que esse fenótipo pudesse ser decorrente da deficiência em reparo, o que resultaria em acúmulo de lesões e consequentemente a perda do mtDNA. Sendo assim, usamos um ensaio de PCR de longa extensão (XL-PCR) para analisar a integridade do genoma mitocondrial. Esse ensaio baseia-se na amplificação de um fragmento grande do genoma (16 Kb) e uma vez que algumas lesões bloqueiam a progressão da DNA-polimerase podemos correlacionar diretamente a eficiência de amplificação com o número de lesões presentes no DNA molde, após a normalização da quantidade de DNA em cada reação, que é feita amplificando um fragmento pequeno (200pb) do mtDNA, no qual a probabilidade de a DNA polimerase encontrar uma lesão bloqueadora é bastante reduzida. Comparando a amplificação do fragmento longo nas duas linhagens pode-se observar que a diminuição dos níveis proteicos de Ku70/50 correlaciona-se positivamente com diminuição da eficiência de amplificação, sugerindo que o mtDNA das células *knockdown* contem significativamente mais lesões que bloqueiam a progressão da DNA polimerase do que o mtDNA das células controle (figura 34).

Figura 34. Medida do número de lesões bloqueadoras de polimerases em DNA por XL-PCR. A amplificação de um fragmento de 16 kb do mtDNA foi realizada como descrito. Para normalização foi usada a amplificação de um fragmento pequeno do gene ND1. Os resultados apresentados representam a média $\pm$ erro de 3 experimentos resultantes de dois ensaios biológicos independentes.

Processamento errôneo ou incompleto do DNA durante a replicação ou reparo podem gerar deleções no mtDNA (KRISHNAN et al., 2008b). Sendo assim, procuramos verificar se a diminuição dos níveis proteicos de Ku70/50 estariam também relacionados com aumento de deleções no genoma.

Para a análise qualitativa de deleções no genoma mitocondrial usamos o qPCR, através da amplificação das duas sequências localizadas nos genes ND1 e ND4L, como descrito anteriormente. Embora tenhamos observado uma pequena diminuição na amplificação relativa entre ND1/ ND4L em células transfectadas com shRNA de sequência aleatória (*scrambled*) e células *knockdown* para Ku70/86 (Ku-Kd), em comparação com células HEK293T selvagem, não observamos nenhuma diferença na frequência de deleções em células com expressão reduzida de Ku70/50 (figura 35).

Figura 35. Análise relativa de deleções no mtDNA. DNAs totais isolados de células da linhagem HEK293T selvagem, transfectadas com plasmídeo com sequência *shRNA* aleatória (*scrambled*) ou com plasmídeos contendo a sequência de *shRNA* (Ku70/86 KD; clone 3) foram submetidos a qPCR. O nível relativo das deleções foi analisado utilizando qPCR para amplificar duas regiões do mtDNA (ND1 e ND4L) que são diferencialmente enriquecidos em deleções. Os resultados apresentados representam a amplificação relativa ND1/ND4L, e são resultantes de dois experimentos em triplicata.

Em conjunto, os resultados obtidos indicam que o heterodímero mtKu70/50 é necessário para a manutenção da integridade do mtDNA, mesmo na ausência de tratamentos que induzem lesões em DNA, e que participa diretamente no reparo de lesões induzidas ao mtDNA endogenamente.

5. Discussão

A homeostase celular depende da integridade funcional e da coordenação entre os diversos sub-sistemas que coexistem intracelularmente. Esses, muitas vezes estão separados espacialmente, embora em um pequeno espaço celular de apenas alguns micrômetros. Nesse espaço, cada sub-sistema desempenha papéis distintos mas complementares, no qual o “produto” formado em um é usado em outras reações o que culmina em uma rede necessária para todo o funcionamento da maquinaria celular. Um integrante dessa rede intracelular são as mitocôndrias, organelas nas quais ocorre a oxidação de biomoléculas e a produção de ATP, que é necessário para diversos eventos celulares. Além dessa função, essas organelas também estão envolvidas em eventos de sinalização bem como diferentes tipos de morte celular (GALLUZZI et al., 2012; MCBRIDE; NEUSPIEL; WASIAK, 2006).

Para que haja o funcionamento mitocondrial e aporte energético celular é necessária a expressão coordenada dos dois genomas, mitocondrial e nuclear, a fim de sintetizar todos os componentes estruturais e funcionais dessa organela. Essa coordenação envolve a síntese de todas as subunidades dos complexos que compõe a cadeia de transporte de elétrons, o transporte das mesmas até a mitocôndria além da montagem adequada desses complexos com a combinação das subunidades codificadas por ambos genomas (SCARPULLA; VEGA; KELLY, 2012). Sendo assim, a manutenção da integridade do genoma mitocondrial é também essencial para sua integridade funcional, uma vez que mutações nesse genoma, tanto nos genes que codificam diretamente as subunidades dos complexos respiratórios bem como mutações nos genes envolvidos na síntese proteica (tRNA ou rRNA), podem resultar em deficiência na produção de proteínas intramitocondrial, comprometimento ou perda da atividade dos complexos respiratórios além de aumento da produção mitocondrial de EROs, bem como desbalanço redox (LAGOUGE; LARSSON, 2013; LARSSON, 2010; WALLACE, 2010).

Disfunções mitocondriais estão envolvidas em várias patologias humanas como câncer, diabetes, neurodegeneração e também com o envelhecimento normal. Em muitas dessas patologias, disfunção e comprometimento mitocondrial estão associadas à ineficiência na produção energética bem como no aumento da geração de EROs decorrentes de mutações no mtDNA. Em humanos mais de 150 mutações

patogênicas já foram identificadas no mtDNA e a prevalência dessas mutações na população é estimada em aproximadamente 1 a cada 5.000 nascidos. Dessa forma, fica evidente o impacto na saúde pública causado pelas disfunções mitocondriais (KAJANDER; KARHUNEN; JACOBS, 2002; KUJOTH et al., 2005; LAGOUGE; LARSSON, 2013; WALLACE, 2010; YANG et al., 2008).

O mtDNA está associado com a membrana mitocondrial interna e muito próximo a cadeia de transporte de elétrons e aos sítios de geração de EROs, o que faz com que esse seja um alvo primário do ataque dessas espécies, resultando no acúmulo preferencial de bases oxidadas e quebras de fita simples, quando comparado ao DNA nuclear (LAGOUGE; LARSSON, 2013). Espécies reativas de oxigênio podem causar quebras de fitas simples e essas, quando próximas e em fitas antiparelas, geram em um quebra de fita dupla no mtDNA. Sendo assim, a exposição a essas espécies reativas correlaciona-se com a geração de quebras de duplas fitas no mtDNA e dessa forma podemos inferir que esse tipo de lesão também deve ser muito maior no mtDNA quando comparada ao DNA nuclear.

Quebras de duplas fitas introduzidas no mtDNA através do uso de endonucleases de restrição direcionadas para a mitocôndria resultaram em perda do mtDNA e consequentemente fenótipos bioenergéticos. Adicionalmente disfunções bioenergéticas também foram observadas em células contendo mtDNA com mutações pontuais em nível heteroplásmico superior a 60% e com a presença de deleções. Além disso, em experimentos usando camundongos expressando a polimerase replicativa mitocondrial (polimerase γ) com deficiência na atividade revisora, foram observados acúmulo de mutações pontuais espalhadas pelo genoma mitocondrial bem como de deleções, que parecem conduzir para o fenótipo de envelhecimento e redução no ciclo de vida do animal. Em concordância com a relação de envelhecimento e deleções no genoma mitocondrial diferentes grupos tem mostrado que essas deleções no mtDNA vão se acumulando com a idade em diferentes tecidos, incluindo cérebro humano, músculo esquelético além de fígado (CORRAL-DEBRINSKI et al., 1992; HAYASHI et al., 1991; KRAYTSBERG et al., 2006; SRIVASTAVA; MORAES, 2005; SULIMAN et al., 2002; TRIFUNOVIC, 2006; VERMULST et al., 2008; WANG et al., 2007).

O surgimento de deleções no mtDNA ainda não é claro mecanisticamente e várias linhas de evidência sugere que essas são resultantes de eventos incompletos

de reparo de quebras de duplas fitas, em regiões de micro-homologia (KRISHNAN et al., 2008a). De fato, atividades de reparo de quebras de dupla fitas em mitocôndrias de células de mamíferos, plantas, *Drosophila* e fungos foram detectadas por diferentes grupos (ALEXEYEV et al., 2013). Uma vez que foram detectadas essas atividades, atualmente a literatura tem se dedicado a tentar entender quais proteínas são responsáveis por tais atividades. Nesse sentido esse estudo possibilitou o avanço no entendimento dessas vias, uma vez que mostramos que tanto proteínas envolvidas em NHEJ (Ku70/86, DNA-PKCs) quanto em recombinação homóloga (ATM, Rad51, Rad52), estão presentes nas mitocôndrias de células humanas. Para a via de HR também foi identificada em mitocôndrias, a proteína Mre11, constituinte do complexo MRN (Mre11-Rad50-Nbs1), responsável pela ressecção nucleolítica da fita 5'-3' de DNA, necessária para a recombinação homóloga em células de mamíferos (DMITRIEVA; MALIDE; BURG, 2011a). Adicionalmente, Sage *et al* demonstraram que a proteína Rad51 também está presente em mitocôndrias e possivelmente participa na manutenção da integridade do genoma mitocondrial (SAGE; GILDEMEISTER; KNIGHT, 2010).

Nesse trabalho imunodetectamos quatro isoformas da proteína Rad52 no núcleo, ao passo que duas dessas também estão presentes nas mitocôndrias. Usando bibliotecas de cDNA provenientes de testículos e cérebro humano Kito *et al* identificaram 3 diferentes isoformas de Rad52, as quais foram designadas de Rad52 beta (~28kDa), gama (~18kDa), delta (~14kDa) além da proteína original previamente descrita e designada de Rad52 alfa (48kDa). Dentre essas, somente Rad52 alfa interage com Rad51 em experimentos *in vitro* e possui sinal de localização nuclear na região C- terminal, sendo as demais truncadas nessa região (KITO et al., 1999). Dessa forma, aparentemente apenas a isoforma de Rad52 alpha (48kDa), a qual também identificamos no núcleo, citoplasma e extrato total é comum nos dois estudos. As proteínas as quais identificamos em mitocôndrias também estavam presentes em extratos nucleares. Na mitocôndria, entretanto, identificamos uma proteína de maior peso molecular e outra com menor, comparada aquela presente no citoplasma. É possível que a isoforma de menor massa molar detectada na mitocôndria seja resultante da, clivagem proteolítica da proteína citoplasmática após a entrada na mitocôndria, processo comum no direcionamento proteico para essa organela (CHACINSKA et al., 2009). A isoforma de maior massa

molar, que está enriquecida apenas em mitocôndrias, não pode ser identificada nesse estudo. Contudo, vale ressaltar que modificações pós-traducionais de proteínas, como fosforilação e acetilação, resultam em alterações na migração eletroforéticas dessas (AHRER; JUNGBAUER, 2006).

A presença de Rad52 na mitocôndria mostrou-se importante para a manutenção da estabilidade do genoma mitocondrial, uma vez que a diminuição da expressão dessa proteína resultou em redução do número de cópias de mtDNA. Além disso, os maiores níveis de deleções nessa linhagem, comparada com o controle, podem ser resultantes de um aumento em eventos incompletos de recombinações no genoma mitocondrial, devido à falta de Rad52 para auxiliar nas etapas de invasão da fita homóloga. Esses eventos incompletos de recombinação poderiam, então, serem resolvidos por outras vias, resultando na formação de deleções no mtDNA (KRISHNAN et al., 2008c). No núcleo, o papel canônico de Rad52 em estabilidade genética depende de sua função na etapa de busca de homologia e invasão da região homóloga durante a HR (SAN FILIPPO; SUNG; KLEIN, 2008). No entanto, foi demonstrado que esta proteína também pode ligar-se diretamente às pontas livres de DNA, de forma concorrente com o heterodímero Ku e, como esse, ser capaz de proteger as pontas livres do DNA da degradação por endonucleases e direcionar o reparo através de HR (VAN DYCK et al., 1999). Entretanto, não observamos em nossos resultados aumento da associação de Rad52 ao mtDNA após a indução de danos, o que sugere que o papel de Rad52 na manutenção de mtDNA não envolve sua atuação direta no processamento inicial de quebras de duplas fitas.

Por outro lado, Souza-Pinto et al. (2009) demonstraram que Rad52 interage funcionalmente com a DNA glicosilase OGG1, estimulando sua atividade catalítica em substratos contendo 8-OH-dG (DE SOUZA-PINTO et al., 2009b). Essa DNA glicosilase é a principal responsável pela remoção de purinas oxidadas do mtDNA e camundongos *knockout* para essa enzima acumulam significativamente mais 8-OH-dG no mtDNA do que no genoma nuclear (DE SOUZA-PINTO et al., 2001). Dessa forma, também podemos especular que a diminuição na quantidade mitocondrial de Rad52 resulte em um acúmulo de purinas oxidadas, que se posicionadas em nucleotídeos adjacentes ou opostos, poderiam resultar em quebras de fita dupla

durante seu processamento pelas enzimas da via de BER (YANG; CHAUDHRY; WALLACE, 2006).

As atividades enzimáticas e interações proteicas já identificadas para Rad52 sugerem que seu principal papel em mitocôndrias seja como proteína recombinacional. Devido a alta exposição do mtDNA a EROs, é bastante provável que o mtDNA sofra constantes eventos de quebras de duplas fitas. Uma vez que várias cópias do genoma mitocondrial coexistem no mesmo espaço, esse cenário é bastante propício para o reparo dessas quebras de duplas fitas através da recombinação. Sendo assim, podemos levantar a hipótese que após a quebra de dupla fita em uma cópia mtDNA essa lesão seria alvo do processamento pela atividade exonucleásica da proteína Mre11, presente na mitocôndria, o qual geraria extremidade contendo fitas simples e 3' OH livres. No núcleo, essas extremidades são rapidamente cobertas pela proteína RPA, que ainda não foi identificada em mitocôndrias. Entretanto, na mitocôndria essa atividade poderia ser realizada por mtssB, que de forma análoga ao que ocorre com RPA no DNA nuclear, se liga a mtDNA fita simples durante a replicação (RAJALA et al., 2014). Em etapa posterior, também a semelhança do que ocorre no núcleo, esses filamentos cobertos por mtssB seriam alvos da ligação da proteína Rad51 que seria assessorada pelos mediadores Rad52 e Rad51C, os quais também foram detectados em mitocôndrias. Esse complexo (Rad51 + mediadores) uma vez ligados ao mtDNA, catalisariam a invasão da fita intacta de uma outra cópia de mtDNA procurando por regiões de homologia, o que seria facilitado pela presença de várias cópias do genoma. Em etapa posterior formar-se-iam as estruturas cruciformes, análogas às junções de Holiday, que já foram detectadas nessas organelas (POHJOISMÄKI et al., 2009). Após a formação dessas junções a síntese do novo fragmento de mtDNA poderia ser realizada pela polimerase replicativa mitocondrial (polimerase γ), seguida pela resolução das possíveis junções de Holiday por proteínas ainda não identificadas. Os fragmentos sintetizados seriam selados pela DNA ligase III mitocondrial o que finalizaria o reparo mitocondrial através de recombinação. De fato, um papel essencial para DNA ligase III em manutenção do mtDNA, mas não do DNA nuclear foi demonstrado; e a ausência dessa ligase em mitocôndrias resultou em uma depleção significativa no conteúdo de mtDNA (LAKSHMIPATHY; CAMPBELL, 1999a; SIMSEK et al., 2011). Dessa forma, conjuntamente, os dados obtidos até

aqui e dados recentes da literatura descartam a existência de grandes diferenças mecânicas entre o processo de recombinação no núcleo e mitocôndria, uma vez que compartilham a maioria das isoformas proteicas.

Além da recombinação homóloga, a via de ligação de pontas não homólogas também participa da manutenção da integridade do mtDNA. Para essa via detectamos o heterodímero Ku e DNA-PKs nas mitocôndrias, o que sugere a existência de um mecanismo canônico de NHEJ nessa organela. Adicionalmente, mostramos que o reconhecimento das pontas livres de DNA é realizado por uma versão modificada do heterodímero Ku, o qual é composto por uma isoforma alternativa de Ku86 que se difere da isoforma nuclear na região N-terminal, sendo por isso denominado mtKu70/50. Embora os heterodímeros nucleares e mitocondriais sejam diferentes, a proteína mitocondrial (Ku50) aparenta conservar a região C-terminal da proteína nuclear, como indicado pelo reconhecimento por um anticorpo contra um epítipo específico nessa região.

Os resultados obtidos por espectrometria de massas em ambos os casos (gel 1D ou 2D) forneceram pistas sobre a identidade da proteína mitocondrial mtKu50, o que pode ajudar a explicar as possíveis discrepâncias entre nossos resultados e os relatados anteriormente. Campbell e colaboradores (2000) identificaram uma isoforma mitocondrial da subunidade Ku86, que diferia na região C terminal da proteína e mantinha a região N terminal (COFFEY; CAMPBELL, 2000). Uma vez que as regiões específicas que são reconhecidas pelo anticorpo não foram detalhadas nesse artigo isso deixa a comparação um pouco mais difícil. Em nosso trabalho, os anticorpos usados para as regiões N- e C-terminais reconhecem os resíduos de aminoácidos 1 a 374 e 433-732 respectivamente. Nos experimentos de espectrometria de massas nenhum peptídeo foi mapeado nos 30 resíduos iniciais ou o últimos 100 aminoácidos da região C-terminal. Por outro lado, identificou-se o mapeamento de vários peptídeos para a região entre os resíduos 334-449. Apesar de não termos obtido uma ampla cobertura da região C-terminal da proteína nos experimentos de sequenciamento, quando consideramos os dois procedimentos realizados, um total de seis peptídeos foram mapeados nessa região (4 para gel 1D e 2 para gel 2D). Sendo assim, esses poderiam ser suficientes para o reconhecimento do anticorpo o qual usamos, uma vez que o peptídeo usado para gerar o anticorpo compreende uma região relativamente extensa da proteína (299

resíduos). Por outro lado, não podemos excluir a possibilidade que essa proteína possa ser truncada em uma região bem mais próxima do final do domínio C terminal (últimos 100 resíduos por exemplo), o que justificaria a inexistência de reconhecimento por parte de um anticorpo contra uma região mais específica, que pode ter sido o caso do anticorpo usando por Campbell e colaboradores. Dessa forma uma proteína truncada tanto na região N terminal quanto C terminal poderia existir e em concordância com as observações de ambos grupos. No entanto a inexistência de dados sobre a sequência dessa proteína mitocondrial, associada a maiores informações sobre possíveis processamentos que a mesma pode ter sofrido para localizar na mitocôndria fazem com que embora tenhamos dados de experimentais reprodutíveis, nossas conclusões sobre os domínios presentes nessa proteína ainda sejam restritas.

Estudos estruturais e bioquímicos indicam que a região C-terminal de Ku86 é responsável pelo recrutamento de DNA-PKCs, associação com Ku70 e o prosseguimento do reparo de NHEJ após o reconhecimento e ligação das pontas livres pelo heterodímero Ku (WANG; DONG; REEVES, 1998; WU; LIEBER, 1996). Nesse sentido, uma vez que esse domínio, bem como seus ligantes, no caso DNA-PKCs e Ku70, são encontrados no compartimento mitocondrial, podemos sugerir uma conservação de função desses parceiros nos dois compartimentos celulares.

O heterodímero mitocondrial Ku70/50 participa, de fato, no reparo de mtDNA através de NHEJ, uma vez que extratos mitocondriais de células com diminuição nos níveis dessas proteínas mostraram redução na capacidade de catalisar ligação de substratos contendo quebras de duplas fitas em um ensaio *in vitro*. Sendo assim, mostramos que as atividades de reparo de quebras de duplas fitas descritas até então na literatura dependem, em parte, da atuação do heterodímero Ku70/50. Além disso, após a formação de lesões, induzidas com peróxido de hidrogênio, observamos um aumento na associação dessas proteínas com o mtDNA. Esse aumento na ligação, detectado por um ensaio análogo ao ensaio de imunoprecipitação de cromatina, ocorreu de forma independente do aumento da concentração intramitocondrial de qualquer uma das duas subunidades do heterodímero, que se manteve constante até 24 horas após o tratamento. Uma vez que o heterodímero Ku possui maior afinidade por pontas livres de DNA, é possível que nessa condição as quebras de duplas fitas induziram o aumento da ligação ao

mtDNA, observada após o tratamento (MIMORI; HARDIN, 1986; WALKER; CORPINA; GOLDBERG, 2001). Dessa forma, isso refletiria em aumento na afinidade das proteínas presentes na matriz mitocondrial ao mtDNA, ou a outras proteínas ligadas ao mtDNA, para a formação de um "complexo de reparo". O mtDNA está, normalmente, empacotado em um grande complexo nucleoproteico denominado nucleóide mitocondrial, o qual está associado com a membrana mitocondrial interna. Além disso, proteínas da via BER também cofracionam com a membrana mitocondrial interna, sugerindo que estão fisicamente associadas com o nucleóide (STUART et al., 2005). Desta forma, é possível que após a indução de quebras de duplas fitas o nucleóide seja remodelado, alterando a acessibilidade do mtDNA para a ligação de proteínas da via NHEJ, como o heterodímero Ku o que resultaria em aumento da sua associação com o mtDNA. De fato, no núcleo após a formação de quebras ocorrem várias modificações nas histonas tais como fosforilação da H2AX, acetilação, poliribosilação da cromatina catalisada pela poliADP-ribose polimerase. Essas modificações induzidas pelo reconhecimento das lesões promovem o remodelamento da cromatina e relaxamento da estrutura compactada do nucleossoma, o que permite o acesso da maquinaria de reparo a lesão no DNA (PRICE; D'ANDREA, 2013). De forma análoga, uma vez que o mtDNA se compacta em associação com proteínas, é possível que eventos semelhantes sejam necessários para o reparo de quebras de duplas fitas. Sendo assim, já foi demonstrado que a ligação de TFAM, um dos principais componentes proteicos do nucleóide, ao DNA, dificulta o acesso de enzimas da via BER ao sitio da lesão, e que essa ligação pode ser modulada por p53 para dar acesso às proteínas de reparo (CANUGOVI et al., 2010).

A localização mitocondrial do heterodímero Ku, bem como sua atividade em NHEJ, aparentemente estão associadas à manutenção da integridade mitocondrial *in vivo*. Em células com níveis reduzidos desse heterodímero observamos uma redução no número de cópias de mtDNA, bem como aumento de lesões que bloqueiam a progressão da DNA-polimerase, como foi mensurado usando LX-PCR, mesmo na ausência de danos induzidos por agentes externos. Uma vez que a massa mitocondrial nessas células não foi alterada, como verificamos usando a atividade da enzima citrato sintase, isso sugeriu-nos que o aumento de lesões e perda do mtDNA seriam resultantes do acúmulo de lesões induzidas

endogenamente e que não foram reparadas nesse genoma. É sabido que células de mamíferos mantidas em cultura em atmosfera ambiente, ou seja submetidas a 20% de pressão de oxigênio, estão em condição de hiperóxia quando comparadas com células no organismo, cuja pressão normal de oxigênio é de cerca de 3%. Essa condição de cultura resulta em fenótipos de senescência acompanhados por aumento de mutações, muitas das quais características de dano oxidativo no DNA, como transversões G:C para T:A (BUSUTIL et al., 2003). Nesse sentido, o stress oxidativo crônico, resultante das condições normais de crescimento celular em cultura, induziria lesões oxidadas, algumas das quais podem ser quebras de duplas fitas, cujo reparo requereria a presença do heterodímero Ku, bem como a via de NHEJ. Uma vez não reparadas essas lesões, devido à ausência dessa via, acumulariam e resultariam em perda do mtDNA e provavelmente disfunção mitocondrial. Embora não tenhamos observado aumento na quantidade de deleções na linhagem com diminuição dos níveis proteicos desse heterodímero, é possível que isso só seria observado em tempos maiores após a transfecção das células, o que possibilitaria a fixação dessas alterações nos clones celulares. Uma vez que existem várias cópias de mtDNAs por organela e centenas a milhares por célula, mutações ou deleções se tornam tóxicas somente quando acumulam e excedem o chamado "limiar fenotípico". Para que isso aconteça é necessária expansão clonal de uma única molécula mutante inicial que, através de alguma vantagem replicativa e após várias divisões, geram populações de mitocôndrias com conteúdo genético (mtDNA normal e mutado) diferentes. Em humanos, genomas mitocondriais que contêm mutações ou deleções que ocorreram no início do desenvolvimento necessitam de muitos ciclos de replicação para suplantarem as moléculas selvagens e se propagarem pelos tecidos atingindo esse "limiar fenotípico" (CHINNERY et al., 2004; NICHOLAS et al., 2009). Portanto, é razoável especularmos que eventuais deleções geradas em função da diminuição da concentração de mtKu70/50 não se acumularam em níveis detectáveis devido ao tempo do experimento.

Apresentamos dados mostrando que o heterodímero Ku70/50 faz parte de um complexo juntamente com a DNA ligase mitocondrial (DNA ligase III), que é essencial nessa organela (LAKSHMIPATHY; CAMPBELL, 2000; SIMSEK et al., 2011). No núcleo, onde a DNA ligase III também está presente, juntamente com a DNA ligase IV, diferentes grupos já demonstraram que estas fazem parte do

complexo proteico envolvido em reparo de quebras de duplas fitas por NHEJ (DROUET et al., 2005; ELLENBERGER; TOMKINSON, 2008; LEPPARD et al., 2003, 2003). Adicionalmente, em extratos nucleares a presença do heterodímero Ku aumenta significativamente a atividade de NHEJ, catalisada pela DNA ligase III (RAMSDEN; GELLERT, 1998). Sendo assim, a interação física de DNA ligase III com o heterodímero mitocondrial Ku70/50, além do aumento de sua associação ao mtDNA, após estresse oxidativo, sugere a existência de um complexo mitocondrial, mecanicamente semelhante ao do núcleo, envolvido no reparo de quebras de duplas fitas através de NHEJ. Em concordância a isso, foi demonstrado que a inativação de DNA ligase III em neurônios resulta em perda de mtDNA (LAKSHMIPATHY; CAMPBELL, 1999a, 2000; SIMSEK et al., 2011). Uma vez que essa proteína também está envolvida em BER na mitocôndria, isso nos leva a crer que essa perda de mtDNA pode ser resultante da ineficiência de reparo das lesões endógenas, devido disfunções tanto na via de NHEJ, bem como BER. De fato, foi demonstrado recentemente que a diminuição da estabilidade da DNA ligase III em células mutantes para ATM resulta em diminuição da atividade de NHEJ, bem como danos persistentes ao mtDNA (SHARMA et al., 2014). Diversas evidências mostram que ATM está envolvida na manutenção da integridade mitocondrial. Diferentes grupos usando células deficientes em ATM, tanto por silenciamento gênico usando *siRNA*, quanto mutantes no gene *Atm* provenientes de pacientes A-T ou células de camundongo nocaute, observaram alterações mitocondriais como aumento na geração de EROs, alterações na permeabilidade de membrana bem como danos persistentes ao mtDNA, possivelmente em decorrência de deficiência no reparo de lesões oxidadas (AMBROSE; GOLDSTINE; GATTI, 2007; PATEL et al., 2011; SHARMA et al., 2014; VALENTIN-VEGA et al., 2012). Além disso, a ausência de ATM leva a perda de mtDNA, decorrente da sua função na regulação da ribonucleotídeo redutase, necessária para a produção de deoxiribonucleotídeos trifosfatados (EATON et al., 2007). Uma vez que ATM localiza-se na mitocôndria e também regula a estabilidade proteica do heterodímero Ku70/50, como demonstramos através de *western blot*, isso sugere que os fenótipos decorrentes da depleção de ATM ou da patologia decorrente de mutações nessa proteína podem ser atribuídos, em parte, a sua função na manutenção da estabilidade genômica

mitocondrial pelas vias de reparo de BER bem como NHEJ, através da participação na estabilidade da DNA ligase III e do heterodímero Ku70/50.

Em suma, nossos resultados sugerem que mitocôndrias humanas possuem as vias canônicas para o reparo de quebras de duplas fitas, NHEJ e HR, e que essas são mecanisticamente conservadas no núcleo e mitocôndria além de compartilharem a maioria dos seus componentes. A identificação e caracterização parcial dessas vias em mitocôndrias desenvolvidas nesse trabalho, no entanto, coloca muitas outras questões que devem agora ser abordadas, como: i) como essas vias são reguladas e relacionam-se com outras vias de reparo distintas presentes nas mitocôndrias; ii) quais são os sinais necessários para que essas proteínas sejam direcionadas à essa organela e atuem na manutenção da integridade mitocondrial, e da célula como um todo; e iii) qual a participação dessa via na manutenção da integridade funcional da mitocôndria sobre condições normais e em resposta a diferentes estresses genotóxicos e metabólicos.

6. Conclusão

- Mitocôndrias de células humanas possuem proteínas envolvidas nas duas principais via de DSBR, HR e NHEJ, a saber Ku70/86, DNA-PKCs, ATM, Rad51, Rad52 estão.
- A proteína Rad52 participa da manutenção da integridade do mtDNA, mesmo na ausência de tratamentos genotóxicos, uma vez que a diminuição na concentração de Rad52 ocasiona diminuição no número de cópias de mtDNA e aumento de deleções nesse genoma.
- A mitocôndria possui uma isoforma distinta da proteínas Ku86, a qual difere da isoforma nuclear na região N terminal, que se associa à proteína Ku70 formando o heterodímero mitocondrial Ku70/50.
- O heterodímero mitocondrial Ku70/50 interage fisicamente com a DNA ligase III mitocondrial e tem sua estabilidade regulada pela proteína ATM.
- O heterodímero Ku70/50 atua em NHEJ na mitocôndria e sua localização mitocondrial está relacionada com a manutenção do número de cópias de mtDNA bem como a integridade desse genoma.

7. Referências Bibliográficas

- ADACHI, N. et al. Hypersensitivity of nonhomologous DNA end-joining mutants to VP-16 and ICRF-193: Implications for the repair of topoisomerase II-mediated DNA damage. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, p. 35897–35902, 2003.
- AHRER, K.; JUNGBAUER, A. **Chromatographic and electrophoretic characterization of protein variants** **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, 2006.
- ALAM, T. I. et al. Human mitochondrial DNA is packaged with TFAM. **Nucleic acids research**, v. 31, p. 1640–1645, 2003.
- ALBERTS, B. **Molecular Biology of the Cell**. . 2008, p. 1601.
- ALEXEYEV, M. et al. **The maintenance of mitochondrial DNA integrity--critical analysis and update**. **Cold Spring Harbor perspectives in biology**, 2013.
- AMBROSE, M.; GATTI, R. A. **Pathogenesis of ataxia-telangiectasia: the next generation of ATM functions**. **Blood**, 2013.
- AMBROSE, M.; GOLDSTINE, J. V; GATTI, R. A. Intrinsic mitochondrial dysfunction in ATM-deficient lymphoblastoid cells. **Human molecular genetics**, v. 16, p. 2154–2164, 2007.
- ANDERSON, S. et al. Sequence and organization of the human mitochondrial genome. **Nature**, v. 290, p. 457–465, 1981.
- ANDERSSON, S. G. et al. The genome sequence of *Rickettsia prowazekii* and the origin of mitochondria. **Nature**, v. 396, p. 133–140, 1998.
- BACMAN, S. R.; WILLIAMS, S. L.; MORAES, C. T. Intra- and inter-molecular recombination of mitochondrial DNA after in vivo induction of multiple double-strand breaks. **Nucleic Acids Research**, v. 37, p. 4218–4226, 2009.
- BARTEK, J.; LUKAS, J. **DNA damage checkpoints: from initiation to recovery or adaptation** **Current Opinion in Cell Biology**, 2007.
- BELL, O. et al. Determinants and dynamics of genome accessibility. **Nature reviews. Genetics**, v. 12, p. 554–564, 2011.
- BERTOLINI, L. R. et al. Transient depletion of Ku70 and Xrcc4 by RNAi as a means to manipulate the non-homologous end-joining pathway. **Journal of Biotechnology**, v. 128, p. 246–257, 2007.
- BLASIAK, J. et al. **Mitochondrial and nuclear DNA damage and repair in age-related macular degeneration** **International Journal of Molecular Sciences**, 2013.

BOGENHAGEN, D. F. **Mitochondrial DNA nucleoid structure***Biochimica et Biophysica Acta - Gene Regulatory Mechanisms*, 2012.

BOHR, V. A. DNA damage and its processing. relation to human disease. **Journal of inherited metabolic disease**, v. 25, p. 215–222, 2002.

BRANZEI, D.; FOIANI, M. Regulation of DNA repair throughout the cell cycle. **Nature reviews. Molecular cell biology**, v. 9, p. 297–308, 2008.

BREEN, A. P.; MURPHY, J. A. **Reactions of oxyl radicals with DNA***Free Radical Biology and Medicine*, 1995.

BURMA, S.; CHEN, B. P. C.; CHEN, D. J. **Role of non-homologous end joining (NHEJ) in maintaining genomic integrity***DNA Repair*, 2006.

BUSUTTIL, R. A. et al. Oxygen accelerates the accumulation of mutations during the senescence and immortalization of murine cells in culture. **Aging cell**, v. 2, p. 287–294, 2003.

CADET, J.; RICHARD WAGNER, J. DNA base damage by reactive oxygen species, oxidizing agents, and UV radiation. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 5, 2013.

CALVO, S. E.; MOOTHA, V. K. The mitochondrial proteome and human disease. **Annual review of genomics and human genetics**, v. 11, p. 25–44, 2010.

CAMPBELL, C. T.; KOLESAR, J. E.; KAUFMAN, B. A. Mitochondrial transcription factor A regulates mitochondrial transcription initiation, DNA packaging, and genome copy number. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1819, p. 921–9, 2012.

CANUGOVI, C. et al. The mitochondrial transcription factor A functions in mitochondrial base excision repair. **DNA repair**, v. 9, p. 1080–1089, 2010.

CHACINSKA, A. et al. **Importing Mitochondrial Proteins: Machineries and Mechanisms***Cell*, 2009.

CHAPMAN, J. R.; TAYLOR, M. R. G.; BOULTON, S. J. Playing the end game: DNA double-strand break repair pathway choice. **Molecular cell**, v. 47, n. 4, p. 497–510, 24 ago. 2012.

CHEN, B. P. C. et al. Ataxia telangiectasia mutated (ATM) is essential for DNA-PKcs phosphorylations at the Thr-2609 cluster upon DNA double strand break. **Journal of Biological Chemistry**, v. 282, p. 6582–6587, 2007.

CHINNERY, P. F. et al. Risk of developing a mitochondrial DNA deletion disorder. **Lancet**, v. 364, p. 592–596, 2004.

CHU, W. K.; HICKSON, I. D. RecQ helicases: multifunctional genome caretakers. **Nature reviews. Cancer**, v. 9, p. 644–654, 2009.

CICCIA, A.; ELLEDGE, S. J. **The DNA Damage Response: Making It Safe to Play with Knives** *Molecular Cell*, 2010.

CIMPRICH, K. A.; CORTEZ, D. ATR: an essential regulator of genome integrity. **Nature reviews. Molecular cell biology**, v. 9, p. 616–627, 2008.

CLAROS, M. G.; VINCENS, P. Computational method to predict mitochondrially imported proteins and their targeting sequences. **European journal of biochemistry / FEBS**, v. 241, p. 779–786, 1996.

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, p. 2777–2781, 1974.

COFFEY, G.; CAMPBELL, C. An alternate form of Ku80 is required for DNA end-binding activity in mammalian mitochondria. **Nucleic acids research**, v. 28, p. 3793–3800, 2000.

COFFEY, G.; LAKSHMIPATHY, U.; CAMPBELL, C. Mammalian mitochondrial extracts possess DNA end-binding activity. **Nucleic acids research**, v. 27, n. 16, p. 3348–54, 15 ago. 1999.

CORRAL-DEBRINSKI, M. et al. Mitochondrial DNA deletions in human brain: regional variability and increase with advanced age. **Nature genetics**, v. 2, p. 324–329, 1992.

D'AURELIO, M. et al. Heterologous mitochondrial DNA recombination in human cells. **Human molecular genetics**, v. 13, p. 3171–9, 2004.

DAMAS, J. et al. Mitochondrial DNA deletions are associated with non-B DNA conformations. **Nucleic Acids Research**, v. 40, p. 7606–7621, 2012.

DAVIS, A. J.; CHEN, D. J. DNA double strand break repair via non-homologous end-joining. **Translational cancer research**, v. 2, p. 130–143, 2013.

DE SOUZA-PINTO, N. C. et al. 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, p. 5378–5381, 2001.

DE SOUZA-PINTO, N. C. et al. Novel DNA mismatch-repair activity involving YB-1 in human mitochondria. **DNA Repair**, v. 8, p. 704–719, 2009a.

DE SOUZA-PINTO, N. C. et al. The recombination protein RAD52 cooperates with the excision repair protein OGG1 for the repair of oxidative lesions in mammalian cells. **Molecular and cellular biology**, v. 29, p. 4441–4454, 2009b.

DIANOV, G. L. et al. Base excision repair in nuclear and mitochondrial DNA. **Prog Nucleic Acid Res Mol Biol**, v. 68, p. 285–297, 2001.

DIFILIPPANTONIO, M. J. et al. DNA repair protein Ku80 suppresses chromosomal aberrations and malignant transformation. **Nature**, v. 404, p. 510–514, 2000.

DING, Q. et al. Autophosphorylation of the catalytic subunit of the DNA-dependent protein kinase is required for efficient end processing during DNA double-strand break repair. **Mol Cell Biol**, v. 23, p. 5836–5848, 2003.

DMITRIEVA, N. I.; MALIDE, D.; BURG, M. B. Mre11 is expressed in mammalian mitochondria where it binds to mitochondrial DNA. **American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology**, v. 301, p. R632–R640, 2011a.

DMITRIEVA, N. I.; MALIDE, D.; BURG, M. B. Mre11 is expressed in mammalian mitochondria where it binds to mitochondrial DNA. **American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology**, v. 301, n. 3, p. R632–40, set. 2011b.

DOBBS, T. A.; TAINER, J. A.; LEES-MILLER, S. P. **A structural model for regulation of NHEJ by DNA-PKcs autophosphorylation** DNA Repair, 2010.

DOHERTY, A. J.; JACKSON, S. P.; WELLER, G. R. **Identification of bacterial homologues of the Ku DNA repair proteins [2]**FEBS Letters, 2001.

DOWNS, J. A.; JACKSON, S. P. A means to a DNA end: the many roles of Ku. **Nature reviews. Molecular cell biology**, v. 5, p. 367–378, 2004.

DROUET, J. et al. DNA-dependent protein kinase and XRCC4-DNA ligase IV mobilization in the cell in response to DNA double strand breaks. **The Journal of biological chemistry**, v. 280, p. 7060–7069, 2005.

DUDLEY, D. D. et al. **Mechanism and control of V(D)J recombination versus class switch recombination: similarities and differences.**Adv Immunol, 2005.
Disponível em:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15705419>

DYNAN, W. S.; YOO, S. Interaction of Ku protein and DNA-dependent protein kinase catalytic subunit with nucleic acids. **Nucleic acids research**, v. 26, p. 1551–1559, 1998.

EATON, J. S. et al. Ataxia-telangiectasia mutated kinase regulates ribonucleotide reductase and mitochondrial homeostasis. **The Journal of clinical investigation**, v. 117, p. 2723–2734, 2007.

ELLENBERGER, T.; TOMKINSON, A. E. Eukaryotic DNA ligases: structural and functional insights. **Annual review of biochemistry**, v. 77, p. 313–338, 2008.

EVERS, B.; JONKERS, J. Mouse models of BRCA1 and BRCA2 deficiency: past lessons, current understanding and future prospects. **Oncogene**, v. 25, p. 5885–5897, 2006.

FALKENBERG, M.; LARSSON, N.-G.; GUSTAFSSON, C. M. DNA replication and transcription in mammalian mitochondria. **Annual review of biochemistry**, v. 76, p. 679–699, 2007.

FERGUSON, D. O. et al. The nonhomologous end-joining pathway of DNA repair is required for genomic stability and the suppression of translocations. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 97, p. 6630–6633, 2000.

FRIEDBERG, E. C.; FRIEDBERG, E. C. DNA damage and repair. **Nature**, v. 421, p. 436–40, 2003.

FRIT, P. et al. Alternative end-joining pathway(s): Bricolage at DNA breaks. **DNA Repair**, v. 17, p. 81–97, 2014.

FROSSI, B. et al. H₂O₂ induces translocation of APE/Ref-1 to mitochondria in the Raji B-cell line. **Journal of cellular physiology**, v. 193, n. 2, p. 180–6, nov. 2002.

FUKUI, H.; MORAES, C. T. Mechanisms of formation and accumulation of mitochondrial DNA deletions in aging neurons. **Human Molecular Genetics**, v. 18, p. 1028–1036, 2009.

GALLUZZI, L. et al. **Mitochondrial control of cellular life, stress, and death** *Circulation Research*, 2012.

GIGLIA-MARI, G.; ZOTTER, A.; VERMEULEN, W. DNA damage response. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 3, p. 1–19, 2011.

GREDILLA, R.; BOHR, V. A.; STEVNSNER, T. Mitochondrial DNA repair and association with aging - An update. **Experimental Gerontology**, v. 45, p. 478–488, 2010b.

GREDILLA, R.; BOHR, V. A.; STEVNSNER, T. Mitochondrial DNA repair and association with aging--an update. **Experimental gerontology**, v. 45, p. 478–488, 2010a.

GRUNDY, G. J. et al. One ring to bring them all-The role of Ku in mammalian non-homologous end joining. **DNA Repair**, v. 17, p. 30–38, 2014.

GU, J. et al. DNA-PKcs regulates a single-stranded DNA endonuclease activity of Artemis. **DNA Repair**, v. 9, p. 429–437, 2010.

HARPER, J. W.; ELLEDGE, S. J. The DNA Damage Response: Ten Years After. **Molecular Cell**, v. 28, p. 739–745, 2007.

HATEFI, Y. **The mitochondrial electron transport and oxidative phosphorylation system** *Annual Review of Biochemistry*, 1985. Disponível em: <<http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-0021891869&partnerID=tZOtx3y1>>

HAYASHI, J. et al. Introduction of disease-related mitochondrial DNA deletions into HeLa cells lacking mitochondrial DNA results in mitochondrial dysfunction. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 88, p. 10614–10618, 1991.

HE, L. et al. Detection and quantification of mitochondrial DNA deletions in individual cells by real-time PCR. **Nucleic acids research**, v. 30, p. e68, 2002.

HEGDE, M. L.; IZUMI, T.; MITRA, S. Oxidized base damage and single-strand break repair in mammalian genomes: Role of disordered regions and posttranslational modifications in early enzymes. **Progress in Molecular Biology and Translational Science**, v. 110, p. 123–153, 2012.

HEYER, W. D. et al. **Rad54: The Swiss Army knife of homologous recombination?** **Nucleic Acids Research**, 2006.

HEYER, W.-D.; EHMSN, K. T.; LIU, J. Regulation of homologous recombination in eukaryotes. **Annual review of genetics**, v. 44, p. 113–139, 2010.

HOEIJMAKERS, J. H. J. DNA damage, aging, and cancer. **The New England journal of medicine**, v. 361, p. 1475–1485, 2009.

HOUTGRAAF, J. H.; VERSMISSEN, J.; VAN DER GIESSEN, W. J. A concise review of DNA damage checkpoints and repair in mammalian cells. **Cardiovascular Revascularization Medicine**, v. 7, p. 165–172, 2006.

HSU, F.-M.; ZHANG, S.; CHEN, B. P. C. Role of DNA-dependent protein kinase catalytic subunit in cancer development and treatment. **Translational cancer research**, v. 1, p. 22–34, 2012.

HUMM, D.G., HUMM, J. H. Hybridization of mitochondrial RNA with mitochondrial and nuclear DNA in agar. v. 55, p. 114–119, 1966.

JACKSON, S. P.; BARTEK, J. The DNA-damage response in human biology and disease. **Nature**, v. 461, p. 1071–1078, 2009.

JANSEN, R. P. Origin and persistence of the mitochondrial genome. **Human reproduction (Oxford, England)**, v. 15 Suppl 2, p. 1–10, 2000.

JAZAYERI, A. et al. Mre11-Rad50-Nbs1-dependent processing of DNA breaks generates oligonucleotides that stimulate ATM activity. **The EMBO journal**, v. 27, p. 1953–1962, 2008.

KAJANDER, O. A. et al. Prominent mitochondrial DNA recombination intermediates in human heart muscle. **EMBO reports**, v. 2, p. 1007–1012, 2001.

KAJANDER, O. A.; KARHUNEN, P. J.; JACOBS, H. T. The relationship between somatic mtDNA rearrangements, human heart disease and aging. **Human molecular genetics**, v. 11, p. 317–324, 2002.

KARANJAWALA, Z. E. et al. The nonhomologous DNA end joining pathway is important for chromosome stability in primary fibroblasts. **Current Biology**, v. 9, p. 1501–1504, 1999.

KASS, E. M.; JASIN, M. **Collaboration and competition between DNA double-strand break repair pathways** **FEBS Letters**, 2010.

KAZAK, L.; REYES, A.; HOLT, I. J. Minimizing the damage: repair pathways keep mitochondrial DNA intact. **Nature reviews. Molecular cell biology**, v. 13, n. 10, p. 659–71, out. 2012.

KEENEY, S.; NEALE, M. J. Initiation of meiotic recombination by formation of DNA double-strand breaks: mechanism and regulation. **Biochemical Society transactions**, v. 34, p. 523–525, 2006.

KITO, K. et al. Identification of novel isoforms of human RAD52. v. 1489, p. 303–314, 1999.

KONDO, N. et al. DNA damage induced by alkylating agents and repair pathways. **J Nucleic Acids**, v. 2010, p. 543531, 2010.

KOVALENKO, O. A.; SANTOS, J. H. Analysis of oxidative damage by gene-specific quantitative PCR. **Current protocols in human genetics / editorial board, Jonathan L. Haines ... [et al.]**, v. Chapter 19, p. Unit 19.1, 2009.

KOWALTOWSKI, A. J. et al. Mitochondria and reactive oxygen species. **Free radical biology & medicine**, v. 47, n. 4, p. 333–43, 15 ago. 2009.

KRAYTSBERG, Y. et al. Mitochondrial DNA deletions are abundant and cause functional impairment in aged human substantia nigra neurons. **Nature genetics**, v. 38, p. 518–520, 2006.

KREJCI, L. et al. **Homologous recombination and its regulation** **Nucleic Acids Research**, 2012.

KRISHNAN, K. J. et al. What causes mitochondrial DNA deletions in human cells? **Nature genetics**, v. 40, p. 275–279, 2008a.

KRISHNAN, K. J. et al. What causes mitochondrial DNA deletions in human cells? **Nat Genet**, v. 40, p. 275–279, 2008b.

KRISHNAN, K. J. et al. What causes mitochondrial DNA deletions in human cells? **Nature Genetics**, v. 40, p. 275–279, 2008c.

KUJOTH, G. C. et al. Mitochondrial DNA mutations, oxidative stress, and apoptosis in mammalian aging. **Science**, v. 309, p. 481–4, 2005.

KULKARNI, R.; THOMAS, R. A.; TUCKER, J. D. Expression of DNA Repair and Apoptosis Genes in Mitochondrial Mutant and Normal Cells Following Exposure to Ionizing Radiation. v. 237, n. May 2010, 2011.

KURIMASA, A. et al. Requirement for the kinase activity of human DNA-dependent protein kinase catalytic subunit in DNA strand break rejoining. **Molecular and cellular biology**, v. 19, p. 3877–3884, 1999a.

KURIMASA, A. et al. Requirement for the kinase activity of human DNA-dependent protein kinase catalytic subunit in DNA strand break rejoining. **Mol Cell Biol**, v. 19, p. 3877–3884, 1999b.

LAGOUGE, M.; LARSSON, N.-G. The role of mitochondrial DNA mutations and free radicals in disease and ageing. **Journal of internal medicine**, v. 273, p. 529–43, 2013.

LAKSHMIPATHY, U.; CAMPBELL, C. The Human DNA Ligase III Gene Encodes Nuclear and Mitochondrial Proteins. **Molecular and cellular biology**, v. 19, p. 3869–3876, 1999a.

LAKSHMIPATHY, U.; CAMPBELL, C. Double strand break rejoining by mammalian mitochondrial extracts. **Nucleic acids research**, v. 27, n. 4, p. 1198–204, 15 fev. 1999b.

LAKSHMIPATHY, U.; CAMPBELL, C. Mitochondrial DNA ligase III function is independent of Xrcc1. **Nucleic acids research**, v. 28, p. 3880–3886, 2000.

LAMARCHE, B. J.; ORAZIO, N. I.; WEITZMAN, M. D. **The MRN complex in double-strand break repair and telomere maintenance** **FEBS Letters**, 2010.

LARSSON, N.-G. Somatic mitochondrial DNA mutations in mammalian aging. **Annual review of biochemistry**, v. 79, p. 683–706, 2010.

LEDOUX, S. P. et al. Repair of mitochondrial DNA after various types of DNA damage in Chinese hamster ovary cells. **Carcinogenesis**, v. 13, p. 1967–1973, 1992.

LEHMANN, A. R.; FUCHS, R. P. Gaps and forks in DNA replication: Rediscovering old models. **DNA Repair**, v. 5, p. 1495–1498, 2006.

LEPPARD, J. B. et al. Physical and functional interaction between DNA ligase III α and poly(ADP-Ribose) polymerase 1 in DNA single-strand break repair. **Molecular and cellular biology**, v. 23, p. 5919–5927, 2003.

LI, M. L.; GREENBERG, R. A. **Links between genome integrity and BRCA1 tumor suppression** **Trends in Biochemical Sciences**, 2012.

LI, X.; HEYER, W.-D. Homologous recombination in DNA repair and DNA damage tolerance. **Cell research**, v. 18, p. 99–113, 2008.

LIEBER, M. R. The mechanism of double-strand DNA break repair by the nonhomologous DNA end-joining pathway. **Annual review of biochemistry**, v. 79, p. 181–211, 2010a.

LIEBER, M. R. The mechanism of double-strand DNA break repair by the nonhomologous DNA end-joining pathway. **Annual review of biochemistry**, v. 79, n. D, p. 181–211, jan. 2010b.

LINDAHL, T.; BARNES, D. E. **Repair of endogenous DNA damage**Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology. **Anais...**2000

LORD, C. J.; ASHWORTH, A. **The DNA damage response and cancer therapy***Nature*, 2012.

LUKAS, J.; LUKAS, C.; BARTEK, J. **Mammalian cell cycle checkpoints: Signalling pathways and their organization in space and time***DNA Repair*, 2004.

MA, Y.; SCHWARZ, K.; LIEBER, M. R. The Artemis:DNA-PKcs endonuclease cleaves DNA loops, flaps, and gaps. **DNA Repair**, v. 4, p. 845–851, 2005.

MAGNANDER, K.; ELMROTH, K. **Biological consequences of formation and repair of complex DNA damage***Cancer Letters*, 2012.

MASON, P. A.; LIGHTOWLERS, R. N. Why do mammalian mitochondria possess a mismatch repair activity? **FEBS Letters**, v. 554, p. 6–9, 2003.

MCBRIDE, H. M.; NEUSPIEL, M.; WASIAK, S. **Mitochondria: More Than Just a Powerhouse***Current Biology*, 2006.

MCKINNON, P. J. DNA repair deficiency and neurological disease. **Nature reviews. Neuroscience**, v. 10, p. 100–112, 2009.

MENCK, C. F. M.; MUNFORD, V. DNA repair diseases: What do they tell us about cancer and aging? **Genetics and Molecular Biology**, v. 37, p. 220–233, 2014.

MIMORI, T. et al. Characterization of a high molecular weight acidic nuclear protein recognized by autoantibodies in sera from patients with polymyositis-scleroderma overlap. **Journal of Clinical Investigation**, v. 68, p. 611–620, 1981.

MIMORI, T.; HARDIN, J. A. Mechanism of interaction between Ku protein and DNA. **Journal of Biological Chemistry**, v. 261, p. 10375–10379, 1986.

MIMORI, T.; HARDIN, J. A.; STEITZ, J. A. Characterization of the DNA-binding protein antigen Ku recognized by autoantibodies from patients with rheumatic disorders. **The Journal of biological chemistry**, v. 261, p. 2274–2278, 1986.

MISTELI, T.; SOUTOGLOU, E. The emerging role of nuclear architecture in DNA repair and genome maintenance. **Nature reviews. Molecular cell biology**, v. 10, n. 4, p. 243–54, abr. 2009.

MOORHEAD, G. B. G.; TRINKLE-MULCAHY, L.; ULKE-LEMÉE, A. Emerging roles of nuclear protein phosphatases. **Nature reviews. Molecular cell biology**, v. 8, p. 234–244, 2007.

MORTENSEN, U. H. et al. DNA strand annealing is promoted by the yeast Rad52 protein. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 93, p. 10729–10734, 1996.

MOSHOUS, D. et al. Partial T and B lymphocyte immunodeficiency and predisposition to lymphoma in patients with hypomorphic mutations in Artemis. **Journal of Clinical Investigation**, v. 111, p. 381–387, 2003.

MOYNAHAN, M. E. The cancer connection: BRCA1 and BRCA2 tumor suppression in mice and humans. **Oncogene**, v. 21, p. 8994–9007, 2002.

MOYNAHAN, M. E.; JASIN, M. Mitotic homologous recombination maintains genomic stability and suppresses tumorigenesis. **Nature reviews. Molecular cell biology**, v. 11, n. 3, p. 196–207, mar. 2010.

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

MURPHY, M. P. How mitochondria produce reactive oxygen species. **The Biochemical journal**, v. 417, p. 1–13, 2009.

NAIR, U.; BARTSCH, H.; NAIR, J. **Lipid peroxidation-induced DNA damage in cancer-prone inflammatory diseases: A review of published adduct types and levels in humans** *Free Radical Biology and Medicine*, 2007.

NASS, M. M.; NASS, S. INTRAMITOCHONDRIAL FIBERS WITH DNA CHARACTERISTICS. I. FIXATION AND. **The Journal of cell biology**, v. 19, p. 593–611, 1963.

NICHOLAS, A. et al. On the timing and the extent of clonal expansion of mtDNA deletions: Evidence from single-molecule PCR. **Experimental Neurology**, v. 218, p. 316–319, 2009.

NUNNARI, J.; SUOMALAINEN, A. **Mitochondria: In sickness and in health** *Cell*, 2012.

NUSSENZWEIG, A. et al. Hypersensitivity of Ku80-deficient cell lines and mice to DNA damage: The effects of ionizing radiation on growth, survival, and development. **Proceedings of the National Academy of Sciences** , v. 94 , p. 13588–13593, 1997.

OGAWA, T. et al. Similarity of the yeast RAD51 filament to the bacterial RecA filament. **Science (New York, N.Y.)**, v. 259, p. 1896–1899, 1993.

PASCUCCI, B. et al. DNA repair of UV photoproducts and mutagenesis in human mitochondrial DNA. **Journal of molecular biology**, v. 273, p. 417–427, 1997.

PATEL, A. Y. et al. Ataxia telangiectasia mutated influences cytochrome c oxidase activity. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 405, p. 599–603, 2011.

POHJOISMÄKI, J. L. O. et al. Human heart mitochondrial DNA is organized in complex catenated networks containing abundant four-way junctions and replication forks. **Journal of Biological Chemistry**, v. 284, p. 21446–21457, 2009.

POLO, S. E.; JACKSON, S. P. Dynamics of DNA damage response proteins at DNA breaks: a focus on protein modifications. **Genes & development**, v. 25, p. 409–433, 2011.

PRICE, B. D.; D'ANDREA, A. D. **Chromatin remodeling at DNA double-strand breaks**Cell, 2013.

RAJALA, N. et al. Replication factors transiently associate with mtDNA at the mitochondrial inner membrane to facilitate replication. **Nucleic Acids Research**, v. 42, p. 952–967, 2014.

RAMSDEN, D. A.; GELLERT, M. Ku protein stimulates DNA end joining by mammalian DNA ligases: a direct role for Ku in repair of DNA double-strand breaks. **The EMBO journal**, v. 17, p. 609–614, 1998.

REBELO, A. P.; DILLON, L. M.; MORAES, C. T. **Mitochondrial DNA transcription regulation and nucleoid organization**Journal of Inherited Metabolic Disease, 2011.

REICH, D. J. L. L. A. E. DNA IN MITOCHONDRIA OF NEUROSPORA CRASSA. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 1964.

RICE, P.; LONGDEN, I.; BLEASBY, A. EMBOS: the European Molecular Biology Open Software Suite. **Trends in genetics : TIG**, v. 16, p. 276–277, 2000.

ROBERTS, S. A. et al. Ku is a 5'-dRP/AP lyase that excises nucleotide damage near broken ends. **Nature**, v. 464, p. 1214–1217, 2010.

RUPNIK, A.; LOWNDES, N. F.; GRENON, M. **MRN and the race to the break**Chromosoma, 2010.

SAGE, J. M.; GILDEMEISTER, O. S.; KNIGHT, K. L. Discovery of a novel function for human Rad51: maintenance of the mitochondrial genome. **The Journal of biological chemistry**, v. 285, p. 18984–18990, 2010.

SAN FILIPPO, J.; SUNG, P.; KLEIN, H. Mechanism of eukaryotic homologous recombination. **Annual review of biochemistry**, v. 77, p. 229–257, 2008.

SANTOS, J. H. et al. Quantitative PCR-based measurement of nuclear and mitochondrial DNA damage and repair in mammalian cells. **Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)**, v. 314, p. 183–199, 2006.

SCARPULLA, R. C.; VEGA, R. B.; KELLY, D. P. **Transcriptional integration of mitochondrial biogenesis**Trends in Endocrinology and Metabolism, 2012.

SCHWARTZ, R. M.; DAYHOFF, M. O. Origins of prokaryotes, eukaryotes, mitochondria, and chloroplasts. **Science (New York, N.Y.)**, v. 199, p. 395–403, 1978.

SHADEL, G. S. **Expression and maintenance of mitochondrial DNA: new insights into human disease pathology.** *The American journal of pathology*, 2008.

SHARMA, N. K. et al. Intrinsic mitochondrial DNA repair defects in Ataxia Telangiectasia. **DNA repair**, v. 13, p. 22–31, jan. 2014.

SILVA, A. L.; ROMÃO, L. **The mammalian nonsense-mediated mRNA decay pathway: To decay or not to decay! Which players make the decision?** *FEBS Letters*, 2009.

SIMSEK, D. et al. Crucial role for DNA ligase III in mitochondria but not in Xrcc1-dependent repair. **Nature**, v. 471, p. 245–248, 2011.

SIMSEK, D.; JASIN, M. Alternative end-joining is suppressed by the canonical NHEJ component Xrcc4-ligase IV during chromosomal translocation formation. **Nature structural & molecular biology**, v. 17, p. 410–416, 2010.

SINGLETON, M. R. et al. Structure of the single-strand annealing domain of human RAD52 protein. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 99, p. 13492–13497, 2002.

SRERE, P. A. [1] Citrate synthase. [EC 4.1.3.7. Citrate oxaloacetate-lyase (CoA-acetylating)]. **Methods in Enzymology**, v. 13, p. 3–11, 1969.

SRIVASTAVA, S.; MORAES, C. T. Double-strand breaks of mouse muscle mtDNA promote large deletions similar to multiple mtDNA deletions in humans. **Human Molecular Genetics**, v. 14, p. 893–902, 2005.

STORICI, F. et al. Conservative repair of a chromosomal double-strand break by single-strand DNA through two steps of annealing. **Molecular and cellular biology**, v. 26, p. 7645–7657, 2006.

STUART, J. A. et al. Localization of mitochondrial DNA base excision repair to an inner membrane-associated particulate fraction. **Nucleic acids research**, v. 33, p. 3722–3732, 2005.

SU, T. T. Cellular responses to DNA damage: one signal, multiple choices. **Annual review of genetics**, v. 40, p. 187–208, 2006.

SULIMAN, H. B. et al. Rapid mtDNA deletion by oxidants in rat liver mitochondria after hemin exposure. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 32, p. 246–256, 2002.

SVILAR, D. et al. Base excision repair and lesion-dependent subpathways for repair of oxidative DNA damage. **Antioxidants & redox signaling**, v. 14, p. 2491–2507, 2011.

SYMINGTON, L. S. Role of RAD52 epistasis group genes in homologous recombination and double-strand break repair. **Microbiology and molecular biology reviews : MMBR**, v. 66, p. 630–670, table of contents, 2002.

TAANMAN, J. W. The mitochondrial genome: structure, transcription, translation and replication. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1410, p. 103–123, 1999.

TACCIOLI, G. E. et al. Ku80: product of the XRCC5 gene and its role in DNA repair and V(D)J recombination. **Science (New York, N.Y.)**, v. 265, p. 1442–1445, 1994.

TANG, Y. et al. Rearrangements of human mitochondrial DNA (mtDNA): new insights into the regulation of mtDNA copy number and gene expression. **Molecular biology of the cell**, v. 11, p. 1471–1485, 2000.

TAYLOR, A. M. R.; GROOM, A.; BYRD, P. J. **Ataxia-telangiectasia-like disorder (ATLD) - Its clinical presentation and molecular basis** DNA Repair, 2004.

TEWARI KK, JAYARAMAN J, M. H. Separation and characterization of mitochondrial DNA from yeast. **Biochem Biophys Res Commun.**, v. 21, p. 141–148, 1965.

THYAGARAJAN, B.; PADUA, R. A.; CAMPBELL, C. Mammalian mitochondria possess homologous DNA recombination activity. **Journal of Biological Chemistry**, v. 271, p. 27536–27543, 1996.

TRIFUNOVIC, A. Mitochondrial DNA and ageing. **Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics**, v. 1757, p. 611–617, 2006.

VALENTIN-VEGA, Y. A. et al. Mitochondrial dysfunction in ataxia-telangiectasia. **Blood**, v. 119, p. 1490–1500, 2012.

VAN DER BURG, M. et al. A DNA-PKcs mutation in a radiosensitive T-B- SCID patient inhibits Artemis activation and nonhomologous end-joining. **Journal of Clinical Investigation**, v. 119, p. 91–98, 2009.

VAN DER SCHANS, G. P. Gamma-ray induced double-strand breaks in DNA resulting from randomly-inflicted single-strand breaks: temporal local denaturation, a new radiation phenomenon? **International journal of radiation biology and related studies in physics, chemistry, and medicine**, v. 33, p. 105–120, 1978.

VAN DYCK, E. et al. Binding of double-strand breaks in DNA by human Rad52 protein. **Nature**, v. 398, p. 728–731, 1999.

VARON, R. et al. Nibrin, a novel DNA double-strand break repair protein, is mutated in Nijmegen breakage syndrome. **Cell**, v. 93, p. 467–476, 1998.

VENKITARAMAN, A. R. Cancer suppression by the chromosome custodians, BRCA1 and BRCA2. **Science (New York, N.Y.)**, v. 343, p. 1470–5, 2014.

VERCESI, A. E. et al. Mitochondrial energy metabolism and redox state in dyslipidemias. **lubmb Life**, v. 59, p. 263–268, 2007.

VERMULST, M. et al. DNA deletions and clonal mutations drive premature aging in mitochondrial mutator mice. **Nature genetics**, v. 40, p. 392–394, 2008.

WALKER, J. R.; CORPINA, R. A.; GOLDBERG, J. Structure of the Ku heterodimer bound to DNA and its implications for double-strand break repair. **Nature**, v. 412, p. 607–614, 2001.

WALLACE, D. C. **Mitochondrial DNA mutations in disease and aging** *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 2010.

WANG, J.; DONG, X.; REEVES, W. H. A model for Ku heterodimer assembly and interaction with DNA. Implications for the function of Ku antigen. **The Journal of biological chemistry**, v. 273, p. 31068–31074, 1998.

WANG, L. et al. Analysis of Common Deletion (CD) and a novel deletion of mitochondrial DNA induced by ionizing radiation. **International journal of radiation biology**, v. 83, p. 433–442, 2007.

WANG, X. et al. Mutational analysis of thirty-two double-strand DNA break repair genes in breast and pancreatic cancers. **Cancer Research**, v. 68, p. 971–975, 2008.

WARMERDAM, D. O.; KANAAR, R. **Dealing with DNA damage: Relationships between checkpoint and repair pathways** *Mutation Research - Reviews in Mutation Research*, 2010.

WATERS, C. A. et al. Nonhomologous end joining: A good solution for bad ends. **DNA Repair**, v. 17, p. 39–51, 2014.

WEINSTOCK, D. M.; BRUNET, E.; JASIN, M. Formation of NHEJ-derived reciprocal chromosomal translocations does not require Ku70. **Nature cell biology**, v. 9, p. 978–981, 2007.

WU, X.; LIEBER, M. R. Protein-protein and protein-DNA interaction regions within the DNA end-binding protein Ku70-Ku86. **Molecular and cellular biology**, v. 16, p. 5186–5193, 1996.

WYMAN, C.; KANAAR, R. DNA double-strand break repair: all's well that ends well. **Annual review of genetics**, v. 40, p. 363–83, jan. 2006.

YAKES, F. M.; VAN HOUTEN, B. Mitochondrial DNA damage is more extensive and persists longer than nuclear DNA damage in human cells following oxidative stress. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 94, p. 514–519, 1997.

YANG, J.-L. et al. Mitochondrial DNA damage and repair in neurodegenerative disorders. **DNA repair**, v. 7, p. 1110–1120, 2008.

YANG, N.; CHAUDHRY, M. A.; WALLACE, S. S. Base excision repair by hNTH1 and hOGG1: A two edged sword in the processing of DNA damage in ??-irradiated human cells. **DNA Repair**, v. 5, p. 43–51, 2006.

YANG, W. **Surviving the sun: Repair and bypass of DNA UV lesions****Protein Science**, 2011.

YOO, S.; DYNAN, W. S. Geometry of a complex formed by double strand break repair proteins at a single DNA end: recruitment of DNA-PKcs induces inward translocation of Ku protein. **Nucleic acids research**, v. 27, p. 4679–4686, 1999.

YUAN, S. S. F. et al. BRCA2 is required for ionizing radiation-induced assembly of Rad51 complex in vivo. **Cancer Research**, v. 59, p. 3547–3551, 1999.

ZHANG, S. et al. Congenital bone marrow failure in DNA-PKcs mutant mice associated with deficiencies in DNA repair. **Journal of Cell Biology**, v. 193, p. 295–305, 2011.

8. Anexos