

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA

Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Bioquímica)

PAULO NEWTON TONOLLI

**O PAPEL DO FATOR DE TRANSCRIÇÃO
MITOCONDRIAL A (TFAM) NA PROTEÇÃO
DO DNA MITOCONDRIAL CONTRA LESÕES
OXIDADAS**

Versão original da dissertação defendida

SÃO PAULO

Data de depósito na SPG:

06/12/2013

PAULO NEWTON TONOLLI

**O PAPEL DO FATOR DE TRANSCRIÇÃO
MITOCONDRIAL A (TFAM) NA PROTEÇÃO DO
DNA MITOCONDRIAL CONTRA LESÕES
OXIDADAS**

Dissertação apresentada ao Instituto de
Química da Universidade de São Paulo
para a obtenção do título de Mestre em
Bioquímica

Orientadora: Profa. Dra. Nadja C. Souza-Pinto

SÃO PAULO

2013

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

Tonolli, Paulo Newton
T666p O papel do fator de transcrição mitocondrial A na proteção
do DNA mitocondrial contra lesões oxidadas / Paulo Newton
Tonolli. -- São Paulo, 2013.
78p.

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

1. Genoma : Biologia molecular 2. Radical livre : Bioquímica
I. T. II. Souza-Pinto, Nadja Cristhina de, orientador.

574.88 CDD

TONOLLI, Paulo Newton. O Papel do Fator de Transcrição Mitocondrial A (TFAM) na Proteção do DNA Mitocondrial contra as Lesões Oxidadas

Dissertação apresentada ao Instituto de Química da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Mestre em Bioquímica e Biologia Molecular

Aprovado em: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição _____

Assinatura _____

Prof. Dr. _____

Instituição _____

Assinatura _____

Prof. Dr. _____

Instituição _____

Assinatura _____

Dedico com gratidão e carinho este trabalho aos meus pais, Miriam e Sebastião, à minha irmã, Joyce, e também àquelas pessoas de bom coração que cruzaram a minha vida.

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, a Deus por me abençoar, dar-me perseverança e tudo aquilo que foi necessário para dar mais esse passo na minha vida.

À minha orientadora, Profa. Dra. Nadja C. Souza Pinto, pela oportunidade de realizar este trabalho em seu laboratório, pelos ensinamentos nesses anos, e pela orientação.

Às agências de fomento, que financiaram e permitiram a realização e divulgação deste projeto: ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

À Profa. Dra. Alicia J. Kowaltowski pelo apoio e recursos necessários para a realização deste projeto.

Aos meus colegas de trabalho Mateus Mori, Valquiria Santos, Daniela Soltys, Felipe Ravagnani, Felipe Godoy, Carolina Parga, Danielle Nascimento, Andressa Costa, Gustavo, pelo apoio e auxílio durante a execução desse projeto. Agradeço a grande presteza e prontidão em ajudar da Adriana P. Wendel, técnica do nosso laboratório, e à Camile Caldeira, técnica do laboratório de Bioenergética e Metabolismo Mitocondrial. Sem elas nosso trabalho não seria possível. Aos colegas e amigos de Departamento, Bruno Chausse, Erich Tahara, Bruno Quelicone, Darlene Pena, Leila Magalhães, Gilberto Kaihama, Maira, Tiago, Dani, Max Durvale, Marcos Demasi, Fernanda Cunha, Luis, Philippe Pessoa, Maria Fernanda, Gabriel, Nicole Torelli, Felipe Macedo, Wilson. Agradeço à todos aqueles que me ajudaram e contribuíram de forma importante nessa etapa da minha vida. À amizade, apoio, e incentivo do Mateus Mori e Bruno Chausse.

Aos docentes do Departamento de Bioquímica. Prof. Sandro Marana, pelo empréstimo da cepa bacteriana para a expressão de TFAM. Ao Prof. Frederico Gueiros pelo empréstimo da cepa bacteriana de clonagem. À Profa. Bettina Malnic e Profa. Glaucia, pelo fotodocumentador dos géis de DNA. À Profa. Maria Júlia, pelo termociclador do PCR Real Time. À Profa. Mari Cleide Sogayar pela ultracentrífuga e tubos. Ao Prof. Chuck Farah pela discussão da expressão heteróloga de TFAM recombinante. Ao Prof. Etelvino Bechara. Ao Prof. Bayardo Torres pelo imenso aprendizado didático e teórico na monitoria da sua disciplina. Ao Prof. Dr. Vadim Viviani (UFSCar), que me deu a oportunidade de aprender e a gostar de Bioquímica, de realizar iniciação científica no seu laboratório, e chegar onde estou. Aos meus amigos do lab do Prof. Vadim, que incentivaram e fizeram parte da minha aprendizagem científica: Rogilene Prado, Danilo Amaral, Valéria Scorsato, Gabriele Verônica, Jaqueline Rodrigues, Deimison Neves.

Aos funcionários do Instituto de Química e da Secretaria de Pós-Graduação.

À todos aqueles que de alguma forma especial fizeram parte da minha vida ao longo desses anos. Agradeço cordialmente cada um.

“Viver é muito perigoso... Porque aprender a viver é que é o viver mesmo... Travessia perigosa, mas é a da vida. Sertão que se alteia e abaixa... O mais difícil não é um ser bom e proceder honesto, dificultoso mesmo, é um saber definido o que quer, e ter o poder de ir até o rabo da palavra” (Guimarães Rosa, Grande Sertão: Veredas)

RESUMO

TONOLLI, P. N. **O Papel do Fator de Transcrição Mitocondrial A (TFAM) na Proteção do DNAMitocondrial contra Lesões Oxidadas.** 2013, 70 p., Dissertação – Programa de Pós-Graduação em Bioquímica. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

O fator de transcrição mitocondrial A (TFAM) pertence ao grupo das proteínas de alta mobilidade, apresentando um importante papel para a replicação, transcrição e estrutura/organização do DNA mitocondrial (DNAMt). O DNAMt está organizado em um complexo nucleoprotéico, chamado de nucleóide, do qual TFAM é o principal componente protéico, empacotando o DNAMt de forma análoga às histonas no DNA nuclear. Em analogia ao DNA nuclear, foi sugerido que esse empacotamento pode proteger o DNAMt do ataque de espécies oxidantes, enquanto que, por outro lado, poderia também impedir o acesso das enzimas de reparo. Este trabalho visou esclarecer qual o papel de TFAM na proteção do DNAMt e entender como TFAM influencia o reparo do DNAMt. Nossos resultados indicaram que o empacotamento do DNAMt por TFAM pode proteger o DNA da formação de lesões em condições de estresse oxidativo. Células com redução na expressão de TFAM apresentaram taxas alteradas de proliferação e uma menor viabilidade celular após o tratamento com o fotossensibilizador azul de metileno, indicando que TFAM pode contribuir para a manutenção da integridade funcional da mitocôndria. A velocidade do reparo do DNAMt, em células Kd-TFAM, foi aparentemente maior, o que indicou a importância da modulação da interação de TFAM com o DNAMt para um reparo rápido e eficiente das lesões oxidadas. Portanto, TFAM desempenha um papel importante para a estabilidade genômica mitocondrial, protegendo o DNAMt dos efeitos deletérios das lesões oxidadas no estresse oxidativo, e também modulando a velocidade do reparo do DNAMt, provavelmente através de modificações/interações que permitam que as enzimas de reparo acessem as lesões no DNAMt.

Palavras-chave: TFAM, lesões DNAMt, reparo DNAMt, EROs, mitocôndria, lesões oxidadas.

ABSTRACT

TONOLLI, P. N. **The Role of Mitochondrial Transcription Factor A (TFAM) in the Mitochondrial DNA Protection Against Oxidative Damage.** 2013, 70 p., Master Thesis –Graduate Program in Biochemistry. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

The mitochondrial transcription factor A (TFAM) belongs to the high mobility group box proteins, and is essential for replication, transcription and structure/organization of the mitochondrial DNA (mtDNA). The mtDNA is organized in a nucleoproteic complex called the nucleoid, where TFAM is the main protein component, packaging mtDNA in a manner similar to histones in the nuclear DNA. In analogy to the histone role in nuclear DNA, it was suggested that mtDNA packaging by TFAM could protect the mtDNA against oxidized lesions. On the other hand, it could also prevent the access of repair enzymes. This study aimed to understand whether TFAM plays a role in mtDNA stability through these opposing effects of protecting from damage and preventing repair. Our results indicated that TFAM protects the mtDNA against lesion formation upon oxidative stress. Cells with reduced expression of TFAM showed altered proliferation and lower cellular viability after treatment with the photoactivated dye methylene blue, indicating an important role for TFAM in maintaining mitochondrial function and cell survival. MtDNA repair rate was apparently higher in Kd-TFAM cells, which indicated the importance of modulating the interaction of TFAM with mtDNA for a quick and efficient repair of oxidized lesions. Therefore, TFAM plays an important role in maintaining mitochondrial genomic stability by protecting the mtDNA of the deleterious effects of oxidized lesions in oxidative stress, also modulating mtDNA repair, likely through modifications/interactions that modulate its DNA binding activity and access to lesions in mtDNA by DNA repair enzymes.

Keywords TFAM, mtDNA damage, mtDNA repair, ROS, mitochondria, oxidative damage.

ÍNDICE DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1. Mapa do DNAm | 16 |
| Figura 2. Representação gráfica da estrutura cristalina de TFAM ligado ao promotor LSP do DNAm | 22 |
| Figura 3. Estrutura molecular dos agentes oxidantes utilizados | 29 |
| Figura 4. Gel de quantificação dos duplexes | 42 |
| Figura 5. Ensaio de ligação de TFAM e TFB ao oligonucleotídeo 91-mer | 43 |
| Figura 6. <i>Western blotting</i> de extratos de proteínas dos clones de HEK293Ttransfectados para <i>knockdown</i> de TFAM | 44 |
| Figura 7. Número relativo de cópias de DNAm das células HEK293T Kd-TFAM em relação ao controle | 45 |
| Figura 8. Curva de crescimento celular das linhagens Kd-TFAM e controle em meio de alta glicose e de meio com galactose | 46 |
| Figura 9. Ensaio de proliferação celular de linhagens HEK293T Kd-TFAM tratadas com azul de metileno | 47 |
| Figura 10. Ensaio de proliferação celular de linhagens HEK293T Kd-TFAM tratadas com menadiona | 48 |
| Figura 11. Ensaio clonogênico de células controle e Kd-TFAM em diferentes doses de azul de metileno | 49 |
| Figura 12. Gel ilustrativo de um experimento de XL-PCR | 50 |
| Figura 13. Gel ilustrativo de um experimento para normalização do XL-PCR | 50 |
| Figura 14. Ensaio de lesões oxidadas no DNAm | 51 |
| Figura 15. Ensaio de cinética de reparo de DNAm | 53 |

ÍNDICE DE TABELAS

| | |
|--|----|
| Tabela 1. Sequência dos primers para DNAm humano utilizados no XL-PCR..... | 39 |
| Tabela 2. Sequências dos primers utilizados no PCR do fragmento curto..... | 39 |
| Tabela 3. Sequências do oligonucleotídeo 91-mer duplex utilizado nos ensaios.... | 43 |
| Tabela 4. Taxas relativas de reparo de DNAm, obtidas a partir dos tempos de 30 min, 1, e 2h, das células controle e Kd-TFAM..... | 54 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BERReparo por Excisão de Base
BGGGlobulinagama bovina
Ct*Cycle threshold*
dCTPs2'-deoxycytidine 5'-triphosphate
DMEM*Dulbecco's Modified Eagle Medium*
DNA Ácido desoxirribonucleico
dNTPsDesoxinucleotídeos trifosfato
DPDesvio padrão
DSBsQuebras de fita dupla
EDTA*Ethylenediaminetetraaceticacid*
EMSA*ElectrophoreticMobilityShifthAssay*
EROsEspécies Reativas de Oxigênio
HPR*Horseradishperoxidase*
Kd-TFAMLinhagem *knockdown* para TFAM
LED*Light-emitting diode*
LX-PCRLong-Extension Polimerase Chain Reaction
DNAmtdNA mitocondrial
ND1NADH desidrogenase1
PAGE*Polyacrylamide gel electrophoresis*
PBSTampão fosfato salino
PCNA*Proliferating cell nuclear antigen*
PCR*Polimerase chain reaction*
PVDF*Polyvinylidenefluorid*
qPCRQuantitative polimerase chain reaction
RIPARadioimmunoprecipitation assay
RNA Ácido ribonucléico
rTthDNA polimerase recombinante de *Thermusthermophilus*
SDSDodecil sulfato de sódio
SFB Soro Fetal Bovino
shRNA*short hairpin RNA*

SP-BER Short-patch Base Excision Repair

SSBs Quebras de fita simples

TBE Tris-Borato-EDTA

TCA Trichloroacetic acid

TdT *Terminal deoxynucleotidyltransferase*

TFAM *Transcription Factor A Mitochondrial*

TFB *Transcription Factor B Mitochondrial*

Tm Temperatura de *melting*

TRR Taxa relativa de reparo

UV Luz ultravioleta

8-oxo-dG 8-oxo-7,8-dihidroxi-guanina

SUMÁRIO

| | |
|---|-----------|
| 1.INTRODUÇÃO | 16 |
| 1.1. ESTRUTURA E ORGANIZAÇÃO DO GENOMA MITOCONDRIAL | 16 |
| 1.2. GERAÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO | 17 |
| 1.3. ESTRESSE OXIDATIVO | 18 |
| 1.4. MODIFICAÇÕES GERADAS OXIDATIVAMENTE NO DNA | 19 |
| 1.5. REPARO DE LESÕES OXIDADAS NO DNA MITOCONDRIAL | 20 |
| 1.6. TFAM: ESTRUTURA E FUNÇÕES | 22 |
| 1.6.1. Estrutura | 22 |
| 1.6.2. Papéis de TFAM | 23 |
| 1.6.3. TFAM na replicação do DNAm..... | 24 |
| 1.6.4. TFAM na transcrição do DNAm..... | 24 |
| 1.6.5. TFAM como uma proteína tipo-histona e o nucleóide mitocondrial | 25 |
| 1.6.6. TFAM e reparo do DNAm..... | 26 |
| 1.7. AGENTES GERADORES DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO | 27 |
| 1.7.1. Azul de metileno | 28 |
| 1.7.2. Menadiona | 28 |
| 2.OBJETIVOS | 30 |
| 2.1. OBJETIVO GERAL | 30 |
| 2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS | 30 |
| 3.MATERIAIS E MÉTODOS | 31 |
| 3.1. MARCAÇÃO, PURIFICAÇÃO, DUPLICAÇÃO DOS OLIGOS | 31 |
| 3.1.1. Marcação dos oligonucleotídeos..... | 31 |
| 3.1.2. Purificação e Extração dos oligonucleotídeos do gel | 31 |
| 3.1.3. Quantificação dos oligonucleotídeos purificados..... | 32 |
| 3.1.4. Duplexação e quantificação dos duplexes | 32 |
| 3.2. ELECTROPHORETIC MOBILITY SHIFT ASSAY (EMSA) | 32 |
| 3.3. TRANSFEÇÃO DE HEK293T COM shRNA GENE-ESPECÍFICO | 33 |
| 3.4. WESTERN BLOTTING | 34 |
| 3.5. CURVA DE CRESCIMENTO FERMENTATIVA E AERÓBICA | 35 |
| 3.6. ENSAIO DE PROLIFERAÇÃO CELULAR | 35 |
| 3.6.1. Azul de metileno | 31 |
| 3.6.2. Menadiona..... | 31 |
| 3.7. ENSAIO CLONOGÊNICO | 37 |
| 3.8. EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DE DNA TOTAL DE HEK293T | 38 |
| 3.9. LX-PCR | 38 |

| | |
|---|-----------|
| 3.10. PCR DO FRAGMENTO CURTO MITOCONDRIAL | 39 |
| 3.11. NÚMERO DE CÓPIAS DE DNAm _t POR REAL TIME qPCR | 39 |
| 3.12. ENSAIO DE LESÃO EM CÉLULAS KD-TFAM | 40 |
| 3.13. ENSAIO DE CINÉTICA DE REPARO EM CÉLULAS KD-TFAM | 41 |
| 4.RESULTADOS..... | 42 |
| 4.1. DUPLICAÇÃO DE OLIGONUCLEOTÍDEOS PARA O EMSA | 42 |
| 4.2. ENSAIO DE LIGAÇÃO DE TFAM AOS OLIGONUCLEOTÍDEOS | 43 |
| 4.3. QUANTIFICAÇÃO DE TFAM EM CÉLULAS HEK293T KD-TFAM | 44 |
| 4.4. NÚMERO DE CÓPIAS DE DNAm _t REAL TIME qPCR | 45 |
| 4.5. CURVA DE CRESCIMENTO CÉLULAS KD-TFAM | 46 |
| 4.6. PROLIFERAÇÃO CELULAR APÓS ESTRESSE OXIDATIVO | 47 |
| 4.7. ENSAIO CLONOGÊNICO | 48 |
| 4.8. LX-PCR | 49 |
| 4.9. ENSAIO DE LESÃO DE DNAm _t NO ESTRESSE OXIDATIVO | 51 |
| 4.10. ENSAIO DE REPARO DE DNAm _t NO ESTRESSE OXIDATIVO | 52 |
| 5.DISSCUSSÃO | 55 |
| 6. CONCLUSÃO | 60 |
| 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 62 |
| ANEXOS | |

1. INTRODUÇÃO

1.1. ESTRUTURA E ORGANIZAÇÃO DO GENOMA MITOCONDRIAL

A mitocôndria, uma organela que provavelmente evoluiu de uma α -proteobactéria incorporada endossimbioticamente, apresenta o seu próprio genoma. O DNA mitocondrial (DNAm_t) humano é um duplex circular de 16.569 pb (Fig. 1), desprovido de íntrons, e que codifica para 13 proteínas essenciais dos complexos I, III, IV, e V, da cadeia respiratória, e para 2 rRNAs (que compõem os ribossomos mitocondriais), e 22 tRNAs (todos RNAs transportadores utilizados na tradução mitocondrial)(KANG *et al.*, 2007).

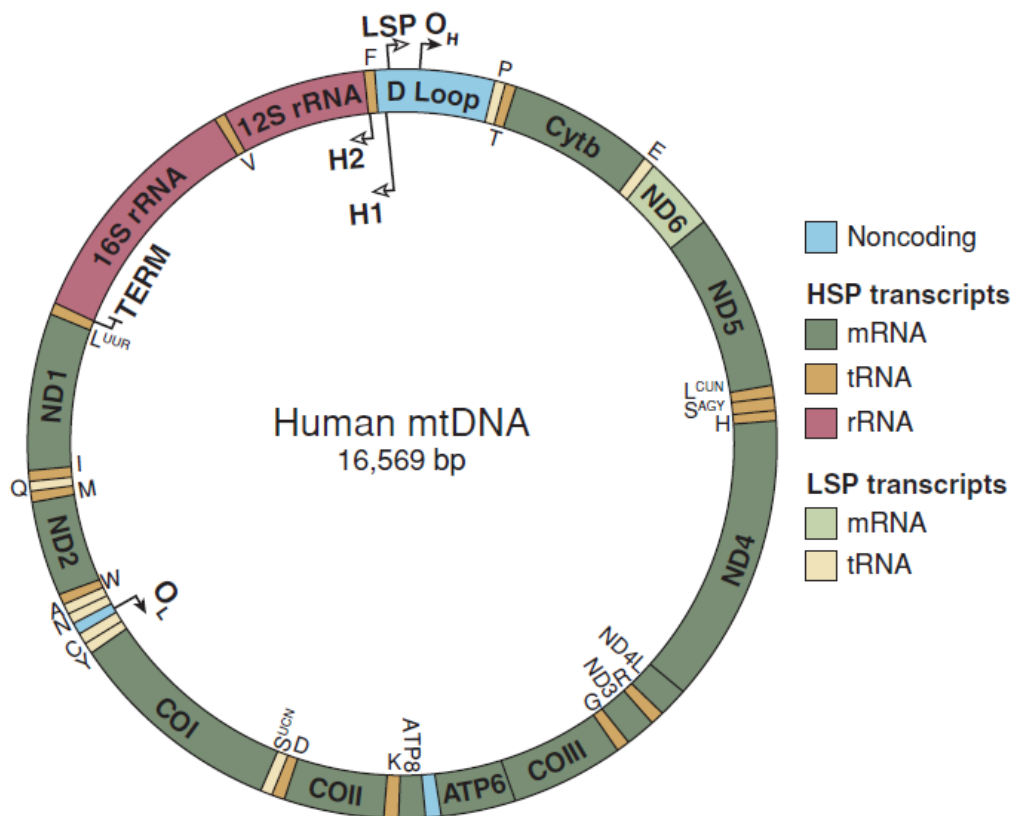


FIGURA 1. Mapa do DNAm_t. Regiões não codificadas em azul. Genes dos tRNAs são indicados com a respectiva sigla dos aminoácidos. Abreviaturas: COI, citocromo c oxidase subunidade I; COII, citocromo c oxidase subunidade II; COIII, citocromo c oxidase subunidade III; Cytb, citocromo b; HSP, promotor do fita H; ND1, NADH desidrogenase subunidade 1; ND2, NADH desidrogenase subunidade 2; ND4, NADH desidrogenase subunidade 4; ND6, NADH desidrogenase subunidade 6; O_H, origem de replicação da fita H. Figura retirada de FALKENBERG *et al.* (2007).

Durante o curso da evolução, genes ancestrais bacterianos foram transferidos do genoma mitocondrial para o genoma nuclear, como é evidenciado pela presença de genes ortólogos no genoma mitocondrial de algumas espécies e no genoma nuclear de outras (ANDERSSON *et al.*, 2003).

As fitas do DNAm_t apresentam características distintas devido a sua composição de bases, sendo nomeadas de fita pesada (*heavy*, fita H) e de fita leve (*light*, fita L) que confere diferenças de densidade (ANDERSON *et al.*, 1981). O DNAm_t é muito compacto, apresentando poucas sequências não-codificadoras. Dentre essas regiões está o *D-loop* (*displacement loop*), o qual contém os três promotores exigidos para a transcrição - o promotor da fita L, LSP (*L-strand promoter*) e os dois promotores da fita H, HSP1 e HSP2 (*heavy-strand promoter 1 e 2*), e sequências regulatórias conservadas da replicação e formação do *D-loop* (SHADEL, 2008). Os processos de replicação e transcrição do DNAm_t são descritos no item 1.5.3..

1.2. GERAÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO

As células eucarióticas produzem continuamente espécies reativas de oxigênio (EROs) como subproduto da transferência de elétrons na cadeia respiratória mitocondrial (KOWALTOWSKI *et al.*, 2009). A produção de EROs pode ocorrer no nível da NADH desidrogenase ou no nível da coenzima Q, no momento da formação do radical semiquinona (UQ[•]), através da doação de um elétron ao O₂ (TURRENS & BOVERIS, 1980; CADENAS, 1977). A principal espécie reativa de oxigênio produzida na mitocôndria é o radical superóxido (O₂^{•-}), resultante da redução monoelétrica do O₂. Esse radical é reduzido à peróxido de hidrogênio (H₂O₂), uma forma mais estável, por enzimas superóxido dismutases (Mn-SOD, na

matriz mitocondrial; e Cu,Zn-SOD no espaço intermembrana) (WEISIGER & FRIDOVICH, 1973; FRIDOVICH, 1995). Quando não metabolizado pelo sistema antioxidante mitocondrial, H_2O_2 pode gerar o radical hidroxila (OH^\bullet), através de reações catalisadas por metal, denominada reação de Fenton (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1990). O radical OH^\bullet é altamente reativo e é responsável pela maioria dos danos ao DNA (DIZDAROGLU, 2005).

1.3. ESTRESSE OXIDATIVO

Sob condição fisiológica normal, os efeitos tóxicos dos EROs podem ser evitados pelo sistema antioxidante celular, que envolvem enzimas (ex.: superóxido dismutase (SOD), glutatiónaperoxidase (GSHPx), catalase) ou antioxidantes não-enzimáticos (ex.: vitamina A, C, e E, glutatióna) (MARITIM *et al.*, 2002). Entretanto, quando a produção de EROs se torna excessiva, e o equilíbrio entre a produção de EROs e a defesa antioxidante sofre distúrbio, assume-se a condição denominada de estresse oxidativo (BETTERIDGE, 2000). Os radicais $O_2^{\bullet-}$ e OH^\bullet causam oxidação de fosfolipídios de membrana, proteínas, e DNA, e são implicados em uma ampla série de condições patológicas, como isquemia, diabetes, distrofias musculares (TERRIL *et al.*, 2013). Por estar próximo dos sítios geradores de EROs, supõe-se que durante o estresse oxidativo, o DNAmt esteja muito suscetível à lesões oxidadas e que na ausência de um reparo eficiente isso leva ao acúmulo de mutações e à disfunção mitocondrial, a qual está relacionada à processos patológicos, como doenças degenerativas e envelhecimento (BOHR *et al.*, 2002).

1.4. MODIFICAÇÕES GERADAS OXIDATIVAMENTE NO DNA

As EROs podem gerar uma variedade de lesões sobre o DNA: bases oxidadas, quebras de fita simples (SSBs), quebras de fita dupla (DSBs) e sítios abásicos (apirimidínicos ou apurínicos) (MAYNARD *et al.*, 2009). Mais de 100 modificações oxidadas de bases nitrogenadas já foram identificadas em DNA exposto a EROs *in vitro* (CADET *et al.*, 2010; CADET *et al.*, 2012); entretanto nem todas foram identificadas em DNA celular, o que pode ser apenas uma limitação de metodológica para sua detecção. Entretanto, uma das lesões mais abundantes em DNA celular exposto a EROS é a 8-oxo-7,8-dihidroxi guanina (8-oxo-dG), que pode resultar em uma mutação de um par G:C por um T:A.

Devido a sua proximidade com os complexos geradores de EROs da cadeia respiratória na membrana mitocondrial interna, acredita-se que o DNAm_t é mais vulnerável ao acúmulo de lesões oxidadas do que o DNA nuclear (SOUZA-PINTO *et al.*, 2010). De fato, Richter *et al.* (1988) relatou uma frequência de 8-oxo-dG no nível de 1 por 130.000 bases no DNA nuclear, e no nível de 1 por 8.000 bases de DNAm_t, em DNA de fígado de rato. Em experimentos com ratos de 6 e 23 meses, foi verificado que o número de bases modificadas oxidativamente no DNAm_t, principalmente 8-oxo-dG, aumenta de forma relacionada à idade, e, comparativamente, o número de lesões oxidadas no DNAm_t é superior ao do DNA nuclear em ratos senescentes (HUDSON *et al.*, 1998).

Se essas lesões não forem removidas eficientemente por mecanismos de reparo de DNA, elas podem causar citotoxicidade, o que levaria a morte celular; ou podem ser fixadas em mutações (MAYNARD *et al.*, 2009). O processo de envelhecimento e diversas doenças, como o câncer, estão relacionados ao acúmulo de danos oxidativos no genoma mitocondrial (BOHR *et al.*, 2002).

1.5. REPARO DE LESÕES OXIDADAS NO DNA MITOCONDRIAL

O principal mecanismo de reparo em DNA mitocondrial é o reparo por excisão de bases (BER) (WILSON III & BOHR, 2007; SOUZA-PINTO *et al.*, 2010). Esse mecanismo de reparo de DNA é altamente conservado desde procariotos até eucariotos superiores, incluindo mamíferos (HEDGE *et al.*, 2008). As proteínas de BER reconhecem, excisam, e substituem, com acurácia, formas específicas de modificações em bases do DNA (MAYNARD *et al.*, 2009). Em BER *short patch* (SP-BER), o primeiro passo envolve, tipicamente, o reconhecimento e a excisão da base modificada (ex.: 8-oxo-dG) por enzimas denominadas de DNA glicosilases (SOUZA-PINTO *et al.*, 2010; WILSON III & BOHR, 2007). As DNA glicosilases clivam a ligação N- β -glicosídica entre a desoxirribose e a base nitrogenada, produzindo um sítio abásico no DNA (SEEBERG *et al.*, 1995). As DNA glicosilases são divididas em monofuncionais (apenas atividade de glicosilases) e bifuncionais (atividade de glicosilases e AP liase) (MAYNARD *et al.*, 2009). Em SP-BER, as DNA glicosilases são monofuncionais, permanecendo ligadas ao sítio abásico do DNA, protegendo-o de clivagem espontânea e/ou funcionando como âncora para os eventos de reparo subsequentes (WILSON III & BOHR, 2007). No passo seguinte, o esqueleto carbono-fosfato é clivado pela proteína AP endonucleaseapurínica 1 (APE1) que hidrolisa a ligação fosfodiéster na extremidade 5' do sítio abásico, formando um terminal 3'-OH e um 5'-fosfato desoxirribose abásico (dRP) (MAYNARD *et al.*, 2009). Em seguida, a DNA polimerase (DNA pol γ na mitocôndria, e DNA pol β no núcleo) adiciona um nucleotídeo na extremidade 3'-OH, deslocando e removendo dRP através da sua atividade 5'-desoxirribofosfatase (5'-dRP liase). Por fim, as extremidades são seladas pela DNA ligase III (LIG3), que em BER mitocondrial,

diferente da nuclear, não forma um complexo com XRCC1 (*X-rayrepair cross-complementing protein 1*) (TOMKINSON *et al.*, 2001).

Algumas DNA glicosilases importantes para o reparo de bases oxidadas são, como a 8-oxoguanina glicosilase1 (OGG1) e a proteína similar à endonuclease VIII(NEIL1), são DNA glicosilases bifuncionais, (DIZDAROGLU, 2005). Essas DNA glicosilases, além de excisarem a base, também apresentam uma atividade AP liase associada, clivando a ligação fosfodiéster na extremidade 3' do sítio abásico, podendo formar um terminal 3'-fosfato e um terminal 5'-OH, que são refratários as atividades da DNA polimerase e da DNA ligase, respectivamente (AKBARI *et al.*, 2008; MAYNARD *et al.*, 2009; FORTINI & DOGLIOTTI, 2007). Assim, esses terminais exigem um processamento adicional, geralmente pela subvia *long patch* (LP-BER), na qual ocorre a adição de 2 a 7 nucleotídeos a partir do sítio de clivagem (SZCZESNY *et al.*, 2008). Nessa subvia, os terminais 3'-fosfato são processados pela atividade fosfatase da enzima polinucleotídeoquinase (PNK), regenerando um terminal 3'-OH para a adição de novos nucleotídeos (IYAMA & WILSON III, 2013). A restrição imposta pelo terminal 5'-não ligável é contornada pela extensão do fragmento incorporado, com deslocamento da fita a frente, formando uma estrutura em braço, conhecida como *flap* (SZCZESNY *et al.*, 2008). Esse *flap* é substrato para uma endonuclease estrutura-especifica, que excisa o *flap* exatamente na junção duplex-triplex, gerando um terminal 5'-fosfato, e as duas pontas são então, ligadas pela DNA ligase (SZCZESNY *et al.*, 2008). Recentemente, três estudos relataram a presença de LP-BER em mitocôndrias, anteriormente só observado em BER nuclear (AKBARI *et al.*, 2008; LIU *et al.*, 2008; SZCZESNY *et al.*, 2008). No entanto, ainda não está claro como essa subvia funciona no reparo do DNA mitocondrial, e qual sua importância para a manutenção da integridade genômica da mitocôndria.

1.6. TFAM: ESTRUTURA E FUNÇÕES

1.6.1. Estrutura

O fator de transcrição mitocondrial A (TFAM, também denominado mtTFA ou mtTF1) é uma proteína de 25 kDa pertencente ao grupo das proteínas de alta mobilidade (HMG, *high mobilitygroup*) (FISHER & CLAYTON, 1988; PARISI & CLAYTON, 1991), as quais se caracterizam por se ligarem ao DNA através de domínios chamados de HMG-box e apresentando importante papel na organização e função da cromatina (NGO *et al.*, 2011; GANGELHOFF *et al.*, 2009; STROS *et al.*, 2007). TFAM apresenta dois domínios HMG-box (HMG-box1, ou HMG1, e HMG-box2, ou HMG2) em formato de “L” compostos por três α -hélices, separados por um *linker* de 27 resíduos de aminoácidos e uma cauda C-terminal carregada, de 25 resíduos (Fig. 2) (PARISI & CLAYTON, 1991; GANGELHOFF *et al.*, 2009). Os domínios HMG-box de TFAM apresentam repetições em tandem e são estabilizados por núcleos hidrofóbicos (NGO *et al.*, 2011). A importância da cauda C-terminal será discutida na seção 1.5.3..

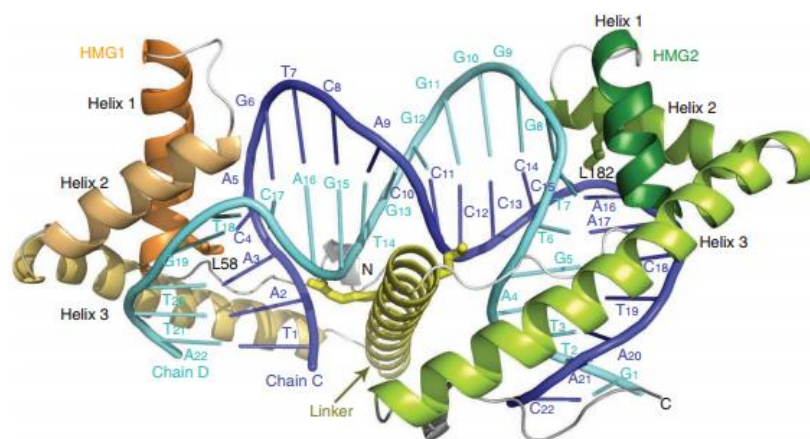


FIGURA 2. Representação gráfica da estrutura cristalina de TFAM ligado ao promotor LSP do DNAm. Domínios HMG1 (em laranja) e HMG2 (em verde) e suas respectivas hélices, com um *linker* central (em amarelo), segmentos flanqueadores (em cinza), e as extremidades N- e C-terminal estão indicadas. Imagem retirada de RUBIO-COSIALS *et al.* (2011).

1.6.2. Papéis de TFAM

O fator de transcrição mitocondrial A (TFAM, também denominado mtTFA ou mtTF1) foi primeiramente relatado por Fisher & Clayton (1985), que indicaram a existência de um fator de transcrição necessário para o reconhecimento pela RNA polimerase mitocondrial dos promotores do DNAm_t. Esse fator de transcrição mostrou fundamental para a seletividade dos promotores do DNAm_t para a montagem do aparato de transcrição (FISHER & CLAYTON, 1987). Visando elucidar esse processo, Fisher & Clayton (1988) purificaram e caracterizaram TFAM obtido de linhagem de células KB (células de carcinoma cervical humano, com alteração na expressão de queratina –*keratin*; é uma linhagem derivada de células HeLa).

Como a grande maioria das proteínas e fatores envolvidos na expressão gênica mitocondrial, TFAM é uma proteína codificada no núcleo que é exportada para a mitocôndria (FALKENBERG *et al.*, 2007; HALLBEG & LARSSON, 2011). Além do seu papel de fator de transcrição, múltiplos papéis de TFAM foram relatados.

Abaixo apontamos esses múltiplos papéis:

- (a) TFAM é um importante fator de transcrição mitocondrial, ligando-se tanto aos promotores HSP quanto ao LSP, de forma específica, e é essencial para a iniciação da transcrição (FISHER & CLAYTON, 1988).
- (b) A replicação da fita H do DNAm_t depende dos transcritos feitos a partir de LSP, que servem como *primers* para a iniciação da replicação. Assim, TFAM é um importante ponto de controle da replicação e transcrição do DNAm_t (SHADEL & CLAYTON, 1997).
- (c) TFAM apresenta capacidade de se ligar a sequências não-específicas do DNAm_t (FISHER *et al.*, 1989), sendo capaz de se ligar por todo o DNAm_t, formando o complexo nucleóide mitocondrial, empacotando o DNAm_t, e

titulando o número de cópias de DNAMt (ALAM *et al.*, 2003; KANKI *et al.*, 2004). Assim, TFAM é importante para a manutenção e estabilização do DNAMt.

(d) TFAM pode estar envolvido na proteção e no reparo do DNAMt (CANUGOVI *et al.*, 2010; KANG & HAMASAKI *et al.*, 2005).

1.6.3. TFAM na replicação do DNAMt

Muitos componentes da replicação do DNAMt vêm sendo caracterizados e há um debate intenso sobre como ela ocorre (FALKENBERG *et al.*, 2007). TFAM é importante para a iniciação da replicação da fita H, fornecendo os *primers* através de transcritos de LSP. Um modelo proposto é que o transcrito primário de LSP é clivado por uma endonuclease, região da origem de replicação da fita H (O_H). No entanto, a ação da RNase MRP vêm sendo questionada, visto que ela está principalmente localizada no nucléolo, onde desempenha o papel de processar o rRNA (FALKENBERG *et al.*, 2007). Além disso, os níveis detectados de RNase MRP na mitocôndria são muito baixos para atribuir essa função a essa enzima. Outro modelo propõe que a formação dos *primers* pode ser dirigida por elementos sequência-específica no DNAMt, de forma independente de RNase MRP (PHAM *et al.*, 2006).

1.6.4. TFAM na transcrição do DNAMt

Como já citado anteriormente, TFAM é responsável pelo reconhecimento do promotor específico para a transcrição. Além de TFAM, existem outros fatores de transcrição mitocondrial: TFB1 (TFB1M ou mtTFB1) e TFB2 (TFB2M ou mtTFB2). Esses dois fatores de transcrição são capazes de interagir com a cauda C-terminal de TFAM, ativando a transcrição, recrutando a POLRMT. No entanto, estudos

indicaram que TFB1 desempenha principalmente uma função de metiltransferase, importante para a biogênese do ribossomo e para a tradução mitocondrial, enquanto TFB2 atua principalmente como um fator de transcrição, embora tenha também atividade de metiltransferase (FALKENBERG *et al.*, 2007). Assim, TFB2 tem sido considerado o principal fator de transcrição juntamente com TFAM, e TFB1 como um auxiliar na transcrição em certas circunstâncias ou em tecidos específicos (FALKENBERG *et al.*, 2007). No entanto, Litonin *et al.* (2010) em experimentos *in vitro* não detectou nenhum estímulo a transcrição por TFB1 na presença de TFAM e POLRMT. Os componentes da transcrição do DNAm são, portanto, três: POLRMT (RNA polimerase mitocondrial, que apresenta uma única subunidade), TFB2, e TFAM. Eles são necessários juntamente para a iniciação da transcrição basal e para o reconhecimento específico do promotor (LITONIN *et al.*, 2010; FISHER & CLAYTON, 1987). TFAM se liga *upstream* dos promotores LSP e HSP1, provavelmente como um dímero (KAUFMAN *et al.*, 2007), e facilita a ligação de TFB2 na sua cauda C-terminal.

1.6.5. TFAM como uma proteína tipo-histona e o nucleóide mitocondrial

Alterações nos níveis de TFAM, tanto na superexpressão quanto *knockdown*, mostram a co-dependência entre TFAM e o número de cópias de DNAm. De fato, o *knockout* do gene que codifica TFAM leva a letalidade embrionária devido a severa depleção do número de cópias do DNAm (LARSSON *et al.*, 1998; EKSTRAND *et al.*, 2004).

Estudos recentes têm sugerido que o DNAm em eucariotos está empacotado em grandes complexos nucleoprotéicos, chamados de nucleóides (ALAM *et al.*, 2003; KANKI *et al.*, 2004; WANG & BOGENHAGEN, 2006). Cada nucleóide é

constituído por múltiplas cópias de DNAm_t que estão associadas a um número desconhecido de proteínas (MAO& HOLT, 2009). Acredita-se que o nucleóide esteja fisicamente associado à membrana mitocondrial interna. TFAM é o principal componente do nucleóide mitocondrial.

1.6.6. TFAM e reparo do DNAm_t

Em mitocôndrias humanas, as enzimas de BER se localizam na membrana mitocondrial interna, coexistindo fisicamente com o nucleóide mitocondrial (STUART *et al.*, 2005). Devido ao fato que TFAM parece recobrir todo o DNAm_t, em uma forma análoga à histonas do DNA nuclear, e que, no núcleo, a organização dos nucleossomos impõe uma restrição física ao acesso de proteínas de reparo à fita de DNA (DINANT *et al.*, 2012), nós propusemos que a ligação de TFAM ao DNAm_t pode exercer um efeito similar ao observado no núcleo. A co-localização entre TFAM e as proteínas de BER no nucleóide também pode implicar em uma interação funcional entre essas proteínas, e um papel de TFAM modulando a atividade do reparo do DNAm_t.

De fato, resultados recentes obtidos em colaboração com o grupo do Dr. Vilhelm Bohr (NIA, NIH, USA) demonstraram que a ligação de TFAM ao substrato modula a atividade enzimática *in vitro* de todas as enzimas de BER, inibindo-as por competitividade de acesso ao DNA (CANUGOVI *et al.*, 2010).

No entanto, é provável que, *in vivo*, a associação de TFAM com o DNAm_t seja ativamente modulada por interações protéicas e modificações pós-traducionais, de novo de maneira análoga a cromatina no núcleo. De fato, Yoshida *al.* (2003) demonstrou em experimentos *in vitro* que a proteína p53 modula a ligação de TFAM ao DNAm_t, aumentando possivelmente a acessibilidade das proteínas de reparo ao

DNA. Canugovi *et al.* (2010) verificou o efeito de p53 sobre a atividade de incisão da DNA glicosilase OGG1 na presença de TFAM, observando que p53 estimula o reparo na presença de TFAM.

Por outro lado, essa mesma associação poderia ter um papel protetor sobre a formação de lesões no DNAMt, uma vez que TFAM protegeria o DNAMt do ataque de EROs, impedindo o acesso desses por meio da compactação do DNA (KANG & HAMASAKI, 2005; CANUGOVI *et al.*, 2010).

Esses estudos recentes sugerem que a ligação de TFAM ao DNA pode desempenhar um papel fundamental na manutenção da estabilidade genética mitocondrial. Canugovi *et al.* (2010) discutem a possibilidade de que esse acesso restrito aos mecanismos de reparo causado pela ligação de TFAM contribuiria para a prevenção de ciclos fúteis no reparo de DNA, uma vez que ciclos incompletos de BER são capazes de produzir alterações prejudiciais no DNA (GLASSNER *et al.*, 1998). Por outro lado, a compactação do DNA por TFAM pode desempenhar um papel importante na proteção da molécula contra oxidações.

Desta forma, o papel de TFAM na manutenção da estabilidade genômica mitocondrial ainda está pouco estabelecido. O melhor entendimento desses processos contribuirá não apenas para o avanço do conhecimento sobre a biologia básica da mitocôndria, mas também permitirá um melhor entendimento dos processos que podem estar alterados em condições degenerativas e patológicas associadas com instabilidade do DNAMt, como envelhecimento, câncer e neurodegeneração.

1.7. AGENTES GERADORES DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO

1.7.1. Azul de metileno

O azul de metileno é um corante fenotiazínico, que em pH fisiológico (pH7,4) apresenta carga positiva e um caráter lipofílico (Fig. 3). Essas características permitem que ele seja direcionado e acumulado na mitocôndria, a qual possui uma matriz eletroquimicamente negativa. Os danos mitocondriais desencadeados pelo azul de metileno decorrem da sua fotoativação (máximo de absorção em $\lambda = 664$ nm) (GABRIELLI *et al.*, 2004). Quando fotoativado o azul de metileno gera grandes quantidades de oxigênio singlete ($^1\Delta_g O_2$). O oxigênio singlete pode reagir com fosfolipídios da membrana mitocondrial, produzindo hidroperóxidos, os quais são decompostos gerando outras espécies reativas (SCHIFF *et al.*, 1987). Também pode reagir com a deoxiguanosina e a guanina do DNA, gerando diferentes produtos de oxidação, onde a principal modificação é a 8-oxo-dG (PIETTE *et al.*, 1991). Além desses, o oxigênio singlete também pode reagir com proteínas, RNA, lipídios e esteróis (DAVIES, 2003).

1.7.2. Menadiona

A menadiona (2-metil-1,4-naftoquinona) é um composto cetônico aromático policíclico (Fig. 3) que quando metabolizado gera espécies reativas de oxigênio em múltiplos sítios celulares por ciclagem redox fútil (LOOR *et al.*, 2010; CRIDDLE *et al.*, 2006). As quinonas são importantes substratos das flavoenzimas e podem sofrer redução por dois elétrons, formando hidroxiquinonas, ou uma redução monoelétrica, formando radicais semiquinona (THOR *et al.*, 1982). Os efeitos citotóxicos de muitas quinonas são mediados pela formação de radicais semiquinona (THOR *et al.*, 1982). A maioria dessas semiquinonas reduz rapidamente o oxigênio molecular em radical ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$), que quando dismutado por enzimas

superóxidos dismutases, gera H_2O_2 e O_2 . No entanto, $\text{O}_2^{\cdot-}$ e H_2O_2 podem entrar em reações catalisadas por metais (reação de Fenton), produzindo EROs tóxicos tais como radical hidroxila ($\text{OH}\cdot$) e oxigênio singlete ($^1\Delta_g \text{O}_2$). Tanto $\text{O}_2^{\cdot-}$ quanto $\text{OH}\cdot$ são potencialmente tóxicos e conhecidos por causar quebras na fita do DNA, inibição enzimática, peroxidação lipídica, e oxidação de grupos tióis em proteínas. No entanto, peroxidação lipídica é improvável em menadiona visto que ela inibe as reações de propagação de peroxidação lipídica (WILLS, 1972). O principal efeito citotóxico da menadiona se deve provavelmente à oxidação de GSH (glutathiona reduzida), um importante antioxidante celular, e de grupos tióis de proteínas importantes (THOR *et al.*, 1982).

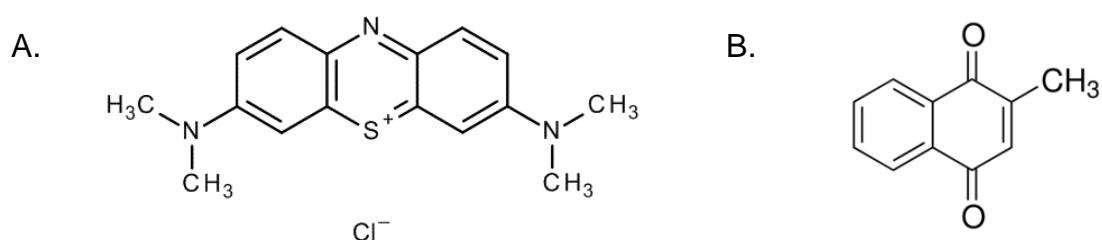


FIGURA 3. Estrutura molecular dos agentes oxidantes utilizados neste estudo. A. Azul de metileno. B. Menadiona.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Neste trabalho, nós procuramos verificar se TFAM protege o DNA mitocondrial de lesões induzidas oxidativamente ou se modula a eficiência de reparo após o estresse oxidativo. Para isso, propusemos abordagens *in vitro*, utilizando proteínas recombinantes, e *in vivo*, com células HEK293T que expressam níveis reduzidos de TFAM (células Kd-TFAM).

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Dentro do contexto apresentado, este projeto objetivou investigar:

1. Investigar o papel de TFAM na proteção do DNAm_t, analisando o nível relativo de lesões no DNAm_t após indução de estresse oxidativo com azul de metileno;
2. Investigar o papel de TFAM no reparo do DNAm_t após indução de estresse oxidativo com azul de metileno, realizando o ensaio de cinética de reparo;
3. Analisar as alterações na proliferação celular após a indução de estresse oxidativo em células Kd-TFAM, verificando mudanças no controle do ciclo celular e mitogênese;
4. Analisar a viabilidade celular após a indução de estresse oxidativo em células Kd-TFAM, verificando o efeito protetor de TFAM contra as lesões oxidadas.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. MARCAÇÃO, PURIFICAÇÃO, DUPLICAÇÃO DOS OLIGONUCLEOTÍDEOS

3.1.1. Marcação dos oligonucleotídeos

Os oligonucleotídeos utilizados foram sintetizados pela Life Technologies, e as suas sequências são apresentadas na Tabela 1. Uma das fitas de cada duplex foi marcada com o fluoróforo AlexaFluor 647 (Life Technologies), através da adição de dCTPs modificados no terminal 3' pela polimerase terminal deoxinucleotidiltransferase (TdT). O ensaio de marcação consistiu de 50 picomoles de oligos, 25 μ M dCTP-AF647, 10 U de TdT, 250 mM CoCl_2 , em tampão Tris-acetato (pH 7,9) e 50 mM acetato de potássio, sendo incubado a 37°C, por 1h. Ao final da incubação, a atividade da TdT foi inibida por aquecimento a 70°C, por 10 min.

3.1.2. Purificação e Extração dos oligonucleotídeos do gel

A purificação dos oligonucleotídeos marcados e das fitas complementares (20 μ g) foi feita por eletroforese, em gel desnaturante, contendo 20% poliacrilamida (19:1), 7M uréia, em tampão TBE 1X (89 mM Tris-borato, 89 mM ácido bórico, e 2mM EDTA). Os oligonucleotídeos foram incubados a 80°C, por 10 min, em 50% formamida, e, em seguida, aplicados no gel. A potência da corrida foi fixada para 15 W, mantendo o gel aquecido. Após a eletroforese, os oligonucleotídeos foram visualizados com uma lâmpada manual de UV longo, e cortados do gel. Os fragmentos contendo os oligos foram macerados, e imersos em 300 μ l de solução de extração, contendo 500 mM acetato de amônio, 10 mM acetato de magnésio, e 0,1% SDS, e incubados a 37°C, *overnight*. Os fragmentos de acrilamida foram removidos da solução por centrifugação.

3.1.3. Quantificação dos oligonucleotídeos purificados

Para quantificação da marcação fluorescente, 1ul do oligonucleotídeo marcado, na presença de formamida, foi aplicado em gel desnaturante de poliacrilamida 20%, e submetido a eletroforese por 3h, a 15 W. Em seguida, o gel foi escaneado no *Typhoon TrioSystem* (Amershan), e quantificação foi feita através do software *ImageQuant*, utilizando-se 50 fmoles de um oligo de 30 nucleotídeos como padrão. Os oligonucleotídeos complementares (não marcados), foram quantificados no espectrofotômetro NanoDrop 1000 (ThermoScientific).

3.1.4. Duplexação e quantificação dos duplexes

Para a formação dos duplexes, adicionou-se um número cinco vezes maior de moles de oligonucleotídeos complementares aos oligonucleotídeos marcados, na presença de 100 mM KCl. A mistura foi aquecida à 95°C, por 5 min, deixando-a resfriar lentamente até 37°C, para que se atingisse a T_m (temperatura de anelamento) dos oligos. A formação dos substratos de fita dupla foi confirmada em gel de poliacrilamida não desnaturante.

3.2. ELECTROPHORETIC MOBILITY SHIFT ASSAY (EMSA)

O ensaio de ligação de TFAM aos duplexes foi feito utilizando-se 100 fmoles de duplex 91-mer (sequência *CSB* (*conserved site of binding* – do DNAMt) ver tabela 2) na presença de quantidades crescentes de proteína (40, 80, 160, e 200 fmoles). O tampão de ligação consistiu de 10 mM Tris-HCl pH7,4, 20 mM, 25 mM KCl, 0,5 mM EDTA, 0,5 mM DTT, 5% glicerol. As amostras, com volume final de 20 ul, foram incubadas a 25°C, por 15 min. O controle negativo foi aquecido, após incubação, a 95°C, por 5 min. Em seguida, amostras foram aplicadas em gel não-desnaturante de

poliacrilamida 5% em TBE 1X, pré-resfriado a 4°C. A eletroforese foi realizada em tampão TBE 1X gelado, a 150 V, por 2h30, a 4°C. Após corrida, o gel foi removido e visualizado no *Typhoon Trio System*.

3.3 CULTIVO E MANUTENÇÃO DE CÉLULAS

As células HEK293T Kd-TFAM foram cultivadas em meio DMEM completo (10% soro fetal bovino – SFB – e antibióticos – estreptomicina/penicilina) e suplementado com 100 ug/ml de piruvato e uridina. Visto que células Kd-TFAM apresentam redução no número de cópias de DNAMt, afetando o metabolismo aeróbico, suplementamos o meio com piruvato. Além disso, suplementação com uridina visa fornecer substrato para a biossíntese de timinas, visto que a biossíntese de ácidos nucleicos também se encontra comprometida. Células foram plaqueadas com materiais estéreis, e incubadas em estufas umidificadas, com atmosfera de 5% CO₂, a 37°C. Células foram plaqueadas e diluições adequadas, e repicadas em confluência de 80%. Estoques de passagens baixas das células Kd-TFAM foram realizados, em meio contendo 20% de SFB em meio DMEM, na presença de 10% de DMSO (dimetilsulfóxido). Estoques de células foram mantidos em nitrogênio líquido.

3.4. TRANSFEÇÃO DE HEK293T COM shRNAGENE-ESPECÍFICO

A expressão gênica de TFAM foi reduzida através da transfecção de células HEK293T com plasmídeos codificando um *shRNA* (*smallhairpinRNA* de 29 nucleotídeos) específico (OriGene) e contendo gene de resistência a puromicina. Foram utilizadas quatro sequências específicas, e um controle negativo, contendo uma sequência que não reconhece nenhum gene humano anotado. Para a transfecção utilizou-se lipofectamina (Invitogen), e 1ug do plasmídeo *shRNA*,

seguinto-se as recomendações do protocolo do fabricante. Após a transfecção, as células foram cultivadas em meio DMEM, sem soro fetal bovino (SFB) e puromicina, por 12h, em estufa com 5% de CO₂. Posteriormente, adicionou-se 10% SFB e 1ug/ml de puromicina. A pressão de seleção com puromicina foi realizada por 2 semanas, trocando o meio durante o período. Em seguida, as células selecionadas foram transferidas para garrafas, plaqueando-se aproximadamente 3x10⁶ células, mantendo-se a pressão seletiva com 1ug/ml de puromicina, e acrescentando 100 ug/ml de piruvato e uridina ao meio de cultura.

3.5.PREPARAÇÃO DE EXTRATOS CELULARES

Para checar qual dos quatro clones transfectados apresentou redução da expressão de TFAM, foi realizado um *western blotting*, seguindo procedimentos padrões. As células foram obtidas de culturas em fase exponencial de crescimento, coletadas por tripsinização. As proteínas 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 foi centrifugado a 15000g, 15 min, a 4°C, e o sobrenadante recolhido. A quantificação de proteína total foi realizada pelo método de Bradford, utilizando-se uma curva de calibração de BGG (0,125, 0,25, 0,5, 0,75, 1 mg/ml).

3.6. WESTERN BLOTTING

Para identificação do clone *knockdown* para TFAM, aplicamos 5ug de proteína total no gel de poliacrilamida 12,5%, e submetemos as amostras a corrida a 150 V, 1h30. Em seguida, as proteínas foram transferidas para uma membrana de PVDF a 100 V, por 1h. Após transferência, a membrana foi bloqueada em solução 5% de leite em pó desnatado em TBS-Tween 0,05%, por 1h. Após isso, incubou-se

a membrana em anticorpos primários policlonal contra TFAM (1:100) humano (Santa Cruz) e monoclonal contra PCNA (1:1000) (Santa Cruz), em 1% de leite em pó desnatado em TBS-Tween 0,05%, *overnight*, 4°C, sob agitação leve. A membrana, então, foi lavada duas vezes, por 15 min, com TBS-Tween 0,05%. Em seguida, a membrana foi incubada em anticorpo secundário anti-*mouse* (1:1000) e anti-*goat* (1:1000) (Santa Cruz), conjugados a HRP, em 1% de leite em pó desnatado em TBS-Tween 0,05%, por 3h, sob agitação leve. A membrana, então, foi lavada 3 vezes com TBS-Tween 0,05%, por 15 min, e as proteínas específicas detectadas através da reação de quimioluminescência, utilizando-se o *ECL Prime Western Blotting Detection Reagent* (Amersham). O sinal quimioluminescente foi registrado em filme fotográfico.

3.7. CURVA DE CRESCIMENTO DAS CÉLULAS KD-TFAM EM CONDIÇÃO FERMENTATIVA E AERÓBICA

Para verificar a capacidade das células Kd-TFAM se proliferarem em condições fermentativa (meio DMEM alta glicose – 25 mM) e aeróbica (meio alta galactose – 5 mM) 20.000 células foram semeadas em cada poço de uma placa de 24 poços. O meio de cultura foi suplementado com 100 ug/ml de piruvato e 100 ug/ml uridina e 1,5 ug/ml de puomicina. Em meio contendo galactose foi adicionado 500 ug/ml. Para cada dia, células foram fixadas, em triplicata, com TCA 10%, e, posteriormente, lisadas com solução 2M NaOH, e a quantidade de DNA total foi avaliada pela absorbância a 260 nm.

3.6. ENSAIO DE PROLIFERAÇÃO CELULAR APÓS ESTRESSE OXIDATIVO

Para avaliar a atividade mitogênica e/ou status do ciclo celular da linhagem de HEK293T Kd-TFAM, após estresse oxidativo induzido com azul de metileno e menadiona, nós realizamos o ensaio de proliferação celular. Para isso, cerca de 150.000 células Kd-TFAM foram semeadas em cada poço de uma placa de 24 poços e cultivadas em meio DMEM alta glicose, suplementado com 100 ug/ml de piruvato, 100 ug/ml uridina, e 1,5 ug/ml de puromicina. A placa foi incubada a 37°C, com 5% CO₂, *overnight*. No dia seguinte as células foram tratadas com os agentes oxidantes (azul de metileno – 0,5; 1; 5; 10; 25; e 50 uM - ou menadiona – 1; 5; 10; 25; 50; e 100 uM) para induzir a condição de estresse oxidativo, como descrito a seguir.

3.6.1. Azul de metileno

No dia seguinte ao plaqueamento, o meio de cultura foi retirado e as células foram lavadas uma vez com PBS. Em seguida, as células foram tratadas, no escuro, com meio DMEM alta glicose, sem SFB e antibióticos, com diferentes concentrações de azul de metileno (0,5, 1, 5, 10, 25, e 50 uM). As culturas foram incubadas por 30 min em estufa a 37°C, 5% CO₂, no escuro, e lavadas duas vezes com PBS, e, então, irradiadas com um LED 700 nm, a 12 cm, por 15 min. Após isso, foi adicionado meio DMEM completo, suplementado com 100 ug/ml de piruvato, 100 ug/ml uridina, e 1,5 ug/ml de puromicina. As células foram incubadas por 24h em estufa, a 37°C, a 5% CO₂. As células foram lavadas uma vez com PBS, e fixadas em TCA 10%. Células foram lisadas com solução 2M NaOH, e a quantidade de DNA total foi avaliada pela absorbância a 260 nm.

3.6.2. Menadiona

No dia seguinte ao plaqueamento, o meio de cultura foi retirado e as células foram lavadas uma vez com PBS. Em seguida, as células foram tratadas com diferentes concentrações de menadiona (1, 5, 10, 25, 50 e 100 μM), diluída em meio DMEM com alta concentração de glicose sem SFB e antibióticos, e incubadas por 1h em estufa, a 37°C, a 5% CO_2 . Após isso, o meio de cultura foi retirado e células foram lavadas duas vezes com PBS, e meio DMEM completo, suplementado com 100 $\mu\text{g/ml}$ de piruvato, 100 $\mu\text{g/ml}$ uridina, e 1,5 $\mu\text{g/ml}$ de puomicina foi adicionado. As células foram incubadas por 24h em estufa, a 37°C, a 5% CO_2 . As células foram lavadas uma vez com PBS, e fixadas em TCA 10%. Células foram lisadas com solução 2M NaOH, e a quantidade de DNA total foi avaliada pela absorbância a 260 nm.

3.7. ENSAIO CLONOGÊNICO

O ensaio clonogênico é um ensaio de sobrevivência celular baseado na capacidade replicativa de uma única célula para formar uma colônia viável.

3.7.1. Azul de metileno

Para este experimento foram plaqueadas 150.000 células em cada poço de uma placa de 24 poços. No dia seguinte, o meio de cultura foi retirado, as células foram lavadas uma vez em PBS, e em seguida, incubadas em estufa a 37°C, a 5% CO_2 , em DMEM sem soro contendo três concentrações de azul de metileno (5, 10, e 25 μM), por 30 minutos. O meio foi retirado e as células foram lavadas duas vezes com PBS e, então, irradiadas com um LED 700 nm, a 12 cm, por 15 min. As células foram então tripsinizadas e ressuspendidas em meio DMEM completo. O número

decélulas foi contado em câmara de Neubauer e aproximadamente 500 células foram semeadas em placas de 25 cm², em meio DMEM completo suplementado com 100 ug/ml de piruvato e uridina. As placas foram incubadas por sete dias, no escuro, em estufa umidificada a 37°C, em 5% CO₂, até o aparecimento de colônias visíveis a olho nu. As colônias foram fixadas e coradas com solução de cristal violeta 0,05% em 50% de metano em água.

3.8. EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DE DNA TOTAL DE HEK293T

Para extração e purificação do DNA total das células HEK293T utilizamos o kit *DNeasyBlood&Tissue* (QIAGEN), seguindo o protocolo do fabricante. O DNA foi quantificado em espectrofotômetro NanoDrop 1000 (ThermoScientific).

3.9. LX-PCR

Essa técnica foi realizada de acordo com Kovalenko & Santos (2009) com pequenas modificações. O DNA foi isolado conforme item 3.8. A reação consistiu em um volume de 50 ul composto de 15 ul de 3,3x XL PCR Buffer, 1,3mM Mg(OAc)₂, 100 ug/ml BSA, 20 pmol de cada primer (Tabela 1), 200 nM dNTPs, 15 ng DNA e q.s.p. 45 ul de água deionizada estéril. A reação foi iniciada pela técnica *hot start* adicionando-se 5 µL de 0,2 U/µL de *rTth* DNA polymerase XL (1 U) na reação a 75 °C 90 s após o aquecimento. Para a amplificação do fragmento longo de DNAmT (16,3 kbp) foram realizados 26 ciclos de desnaturação a 94 °C por 30 s, anelamento a 64 °C por 30 s e amplificação a 68 °C por 12 min.

Tabela 1. Sequência dos primers para DNAm_t humano utilizados no XL-PCR (5'→3')

| Primer | Sequência |
|---------|----------------------------|
| Forward | TGAGGCCAAATATCATTCTGAGGGGC |
| Reverse | TTTCATCATGCGGAGATGTTGGATGG |

3.10. PCR DO FRAGMENTO CURTOMITOCONDRIAL

Para a PCR, utilizou-se o kit Platinum PCR Supermix (Invitrogen), em ensaio constituído por 45 µl do Platinum PCR Supermix, 200 nM dos primers (ND1 *forward*, ND1 *reverse*; HPRT *forward*, HPRT *reverse*) (Tabela 2), e 100 ng de plasmídeo. Foram realizados 25 ciclos (94°C, 30"/56°C, 30"/72°C, 1'), com ativação inicial de *Taq* polimerase através de um hot start (94°C, 2').

Tabela 2. Sequências dos primers utilizados no PCR do fragmento curto (5'→3').

| Primer | Sequência |
|---------------------|----------------------|
| ND1 <i>forward</i> | ACTACGCAAAGGCCCAACG |
| ND1 <i>reverse</i> | GAGCTAAGGTCGGGGCGGTG |
| HPRT <i>forward</i> | TGACATGTGCCGCCTGCGAG |
| HPRT <i>reverse</i> | GTGGTCGCTTTCCGTGCCGA |

3.11. ANÁLISE DO NÚMERO DE CÓPIAS DE DNAm_t POR PCR QUANTITATIVO EM TEMPO REAL (qPCR)

As reações foram realizadas com o kit 2X SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystem®, Foster City, California, USA). Cada reação de 25 µL contém 12,5 µL 2X SYBR® Green PCR Master Mix, 5 pmol de cada primer e 20 ng de DNA.

Todas as reações foram realizadas em triplicata. O *threshold* para detecção da fluorescência foi ajustado manualmente para comparação dos Ct, que é definido como o número de ciclos exigidos para o sinal fluorescente exceder o nível do

background, entre os experimentos independentes. Os valores foram calculados conforme o método $\Delta\Delta Ct$, considerando a eficiência da reação e os valores de Ct, de acordo com a equação abaixo:

$$\Delta\Delta Ct_{alvo/ref} = \frac{E_{alvo}^{\Delta Ct_{alvo}(\text{controle} - \text{inquirido})}}{E_{ref}^{\Delta Ct_{ref}(\text{controle} - \text{inquirido})}}$$

onde, **E** é a eficiência da reação relativa a cada par de primers, **ΔCt** é o número de ciclos no qual a fluorescência foi detectada (de acordo com um limiar de detecção pré-estabelecido), **alvo** é o gene questionado, **ref** é o gene normalizador, **controle** é a linhagem celular controle, e **inquirido** é a linhagem celular Kd-TFAM. Para o número de cópias de DNAm, o gene alvo é *ND1* e o gene referência é *HPRT* ($\Delta\Delta Ct_{ND1/HPRT}$).

O teste estatístico usado para comparar as médias dos valores de $\Delta\Delta Ct$ foi teste *t* de Student para observações não-pareadas. Foi estabelecido o valor de $p < 0,05$ como suficiente para existir uma diferença estatística significativa.

3.12. ENSAIO DE LESÃO EM CÉLULAS KD-TFAM

Neste ensaio utilizamos o azul de metileno para causar lesões oxidadas no DNAm (ver item 1.3.1.). Para o ensaio de lesões do DNAm em células Kd-TFAM, plaqueamos 720.000 células/poço em placas de 6 poços (8,96 cm²/poço), em meio DMEM completo, suplementado com 100ug/ml de piruvato e uridina. No dia seguinte, retirou-se o meio, lavando-se duas vezes as células com PBS, e adicionando-se, no escuro, o meio DMEM sem soro e antibióticos contendo 25 uM de azul de metileno. As células foram incubadas por 30 minutos em estufa umidificada, a 37°C, com 5% CO₂. Em seguida, o meio foi retirado e as células foram lavadas duas vezes com PBS resfriado. Para irradiar, adicionou-se 4 ml de PBS em

cada poço. As células (Kd-TFAM e controle), então, foram irradiadas por 15 min, com LED 700 nm a 12 cm. Imediatamente após o término da irradiação, as células foram coletadas por raspagem, colocadas no gelo, e o DNA total extraído utilizando o kit *DNeasyBlood&Tissue* (QIAGEN). Após a adição de azul de metileno a cultura celular, todos os passos foram realizados no escuro. Em seguida, o DNA total foi quantificado em Nanodrop, e utilizado para a realização do XL-PCR e do PCR do fragmento curto.

3.13. ENSAIO DE CINÉTICA DE REPARO EM CÉLULAS KD-TFAM

Os procedimentos para o ensaio de cinética de reparo em células Kd-TFAM foram realizados conforme o item 3.12.. Para a medida da cinética de reparo, foram utilizados os tempos de recuperação de 0, 30 minutos, 1h, 1h30, 2h, e 12h, após a indução de lesão por irradiação das células com azul de metileno. As células foram incubadas com meio completo DMEM suplementado com 100ug/ml de piruvato e uridina, em estufa umidificada a 37°C, com 5% CO₂, até a coleta por raspagem. Após a coleta as células foram mantidas no gelo, e o DNA foi extraído utilizando o kit *DNeasyBlood&Tissue* (QIAGEN). Todos os passos subsequentes a irradiação foram realizados no escuro. Em seguida, o DNA total foi quantificado em NanoDrop, e utilizado para a realização do XL-PCR e do PCR do fragmento curto.

4. RESULTADOS

4.1. DUPLICAÇÃO DE OLIGONUCLEOTÍDEOS PARA O EMSA

O rendimento e a pureza dos duplexes para o ensaio de EMSA foram satisfatórios. Na figura 4, apresentamos o gel não-desnaturante com os oligonucleotídeos (5000 fmoles/ul) (linhas 4 e 5), e na tabela 1 as sequências de cada um deles. A linha 1 apresenta a migração do oligonucleotídeo fita simples, não duplexado. A quantificação dos oligos foi feita através da comparação da intensidade de fluorescência com um padrão (oligonucleotídeo 30-mer) marcado e não submetido a purificação em gel.

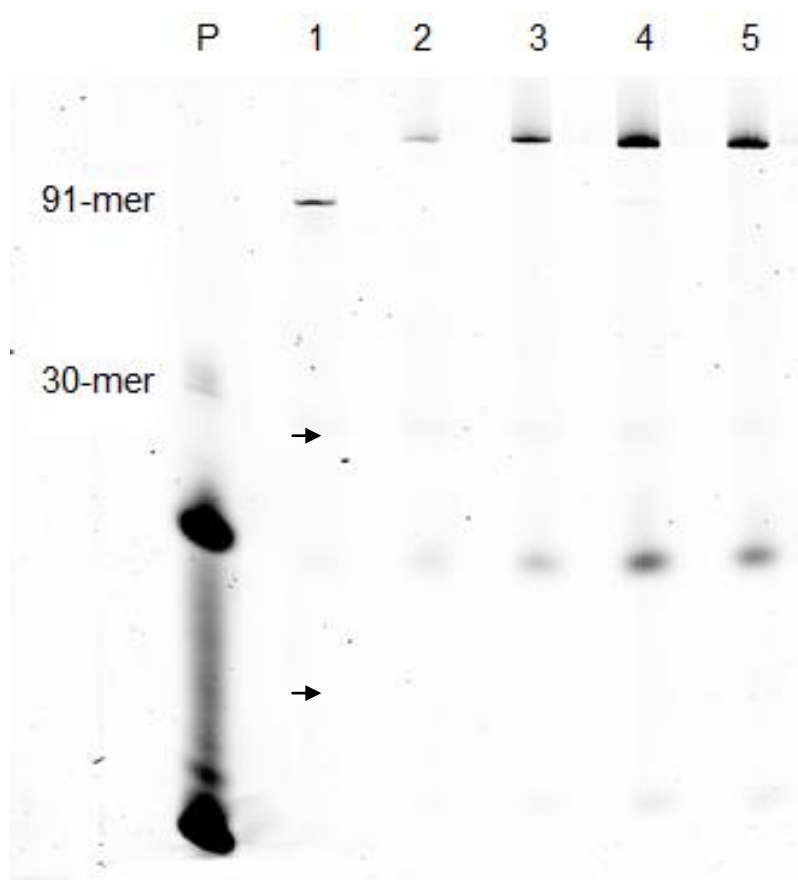


FIGURA 4. Gel de quantificação dos duplexes. (P) oligonucleotídeos 30-mer padrão de moles (50 fmoles); (1) oligonucleotídeo marcado 91-mer; (2), (3), (4) e (5) oligonucleotídeos dupla fita. Bandas inferiores (flechas) correspondem aos nucleotídeos livres.

Tabela 3. Sequências do oligonucleotídeo 91-mer duplex utilizado nos ensaios.

| Nome | Sequência |
|------|--|
| | 5'- GGCCTCACATCTACTAGATAATCAATTCAGACGTAACCACAACCTAATTAATAACGATAAGTAATCCTACGGATATAAT-5' 3'- CCGGAGTGTAGATGATCTATTAGTTAAGTCTGCATTGGTGTGATTAATTATTGCTATTCATTAGGATGCCTATATTA-3' |
| | ACACACCTATTAA -5' TGTGTGGATAATT -3' |

4.2. ENSAIO DE LIGAÇÃO DE TFAM AOS OLIGONUCLEOTÍDEOS

A ligação de TFAM aos oligonucleotídeos, utilizando doses crescentes de TFAM (250-1000 fmoles), foi verificada através de PAGE em gel desnaturante (Fig. 5). Como controle positivo utilizamos outro fator de transcrição mitocondrial, o TFB, e nenhuma interação com o DNA foi observada.

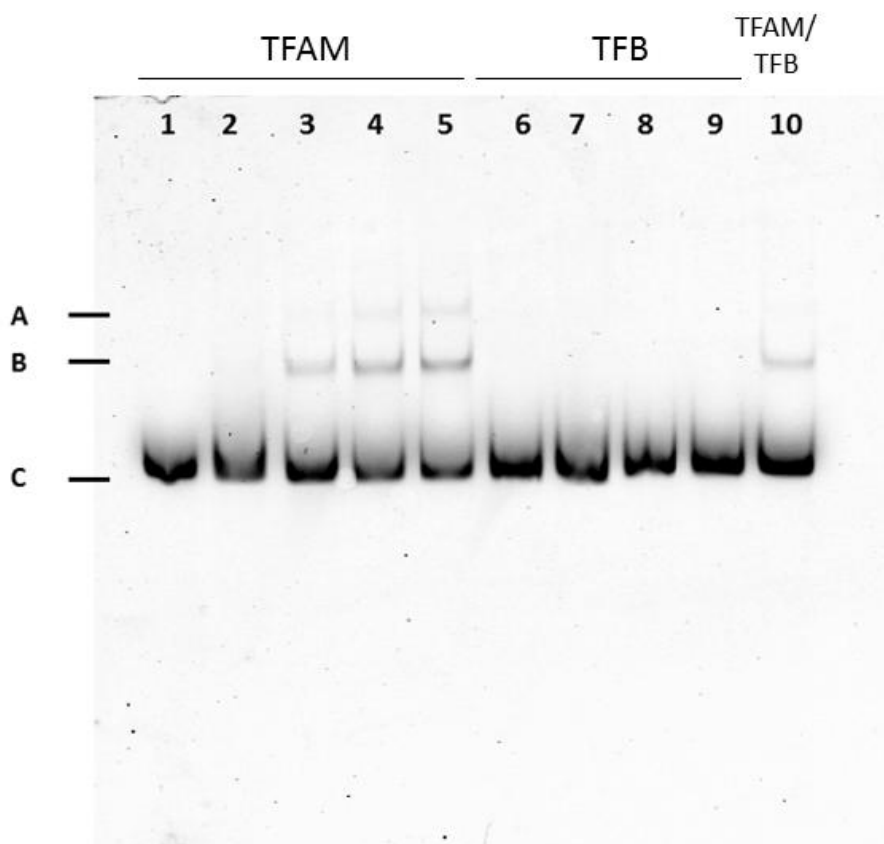


FIGURA5. Ensaio de ligação de TFAM e TFB ao oligonucleotídeo 91-mer. (1) controle negativo (nenhuma proteína). (2) e (6) 250 fmoles de proteína; (3) e (7) 500 fmoles de proteína; (4) e (8) 750 fmoles de proteína; (5) e (8) 1000 pmol de proteína; (9) 500 fmoles de

TFAM e TFB. (A) dímeros de TFAM ligado ao DNA. (B) complexo TFAM-DNA. (C) oligonucleotídeo 91-mer livre.

4.3. QUANTIFICAÇÃO DE TFAM EM CÉLULAS HEK293T TRANSFECTADAS COM SHRNAs PARA KNOCKDOWN DE TFAM

Para gerarmos linhagens celulares com níveis de TFAM diminuídos, transfectou-se células HEK293T com quatro construções contendo shRNAs com sequências distintas para TFAM. Após a seleção de células transfectadas com o antibiótico de seleção para o plasmídeo, a expressão de TFAM em cada linhagem foi verificada por *western blotting* do extrato total de proteínas dos transfectantes. Um *western blotting* típico é apresentado na Figura 6; observamos que os transfectantes D e E apresentaram uma redução significativa da expressão de TFAM, quando comparados com os controles negativos transfectados com um vetor vazio (A) ou com uma sequência inespecífica (B).

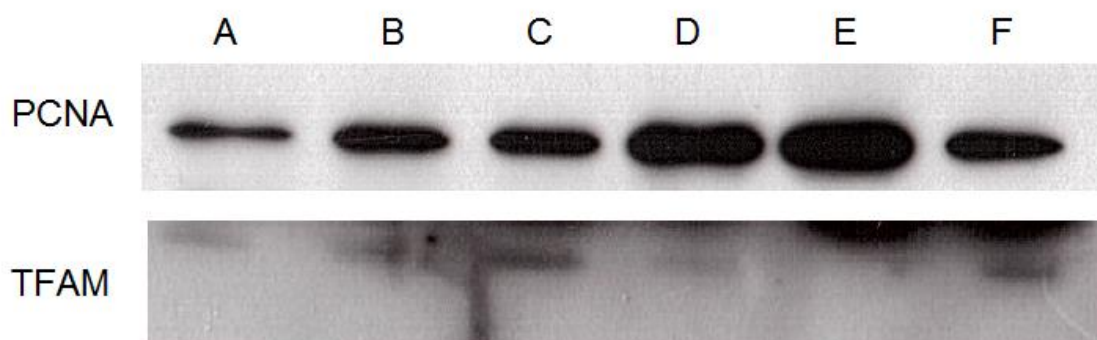


FIGURA6. *Western blotting* de extratos de proteínas dos clones de HEK293T transfectados para *knockdown* de TFAM. (A) controle negativo (transfecção com plasmídeo sem sequência do shRNA); (B) controle negativo transfectado com sequência shRNA scrambled; (C), (D), (E), e (F) clones transfectados com plasmídeos contendo a sequência de shRNA.

4.4 NÚMERO DE CÓPIAS DE DNAmT REAL TIME qPCR

Confirmamos pela técnica de real time qPCR (qRT-PCR) que as células HEK293T Kd-TFAM apresentam uma redução significativa ($p=0,025$), de aproximadamente 40% no número de cópias de DNAmT comparado à linhagem controle (Fig. 7). Essa redução é explicada pelo fato de TFAM estar envolvido na replicação do DNAmT, implicando indiretamente no número de cópias de DNAmT. Dessa forma, comprovamos por outro método que geramos linhagens com expressão reduzida de TFAM.

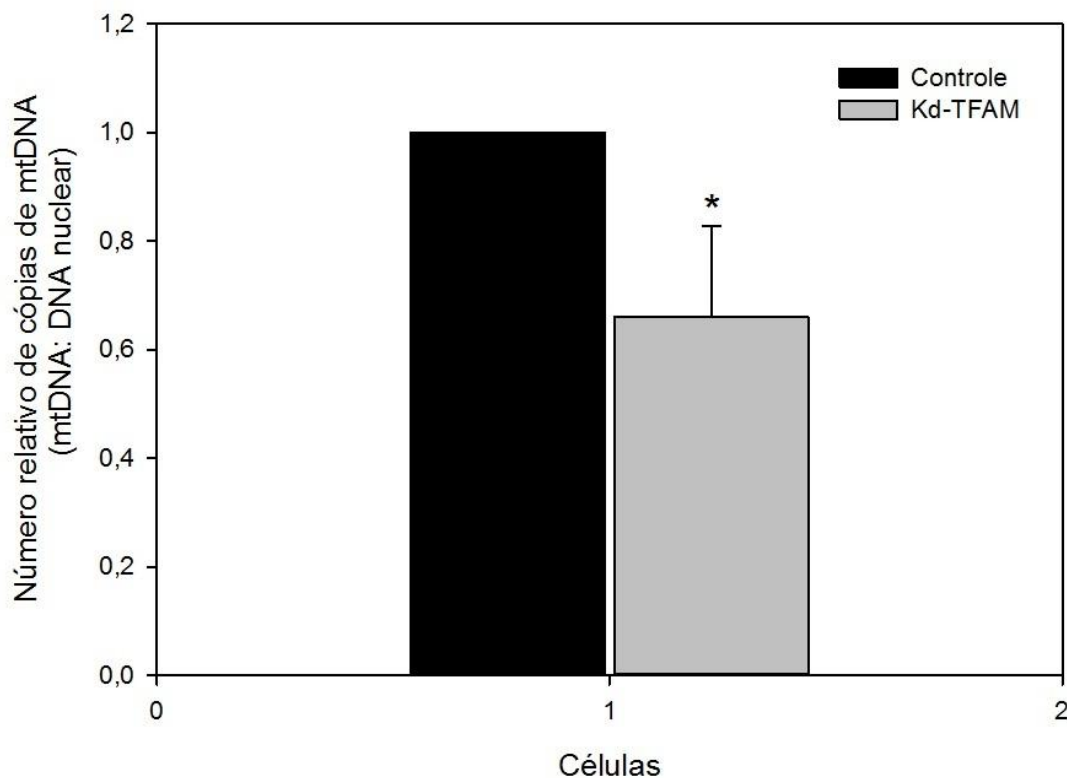


FIGURA 7. Número relativo de cópias de DNAmT das células HEK293T Kd-TFAM em relação ao controle. Médias de $\Delta\Delta Ct$ ND1/HPRT de três experimentos independentes \pm DP.* $p<0,05$

4.5. CURVA DE CRESCIMENTO DAS CÉLULAS KD-TFAM EM MEIO FERMENTATIVO E AERÓBICO

Para determinar se a menor expressão de TFAM interfere no crescimento das células, culturas transfectadas com a sequência *scrambled* e com a sequência E foram crescidas em meio sem glicose e na presença de galactose e em meio com alta glicose (Fig.8). Em ambas as condições, as células com expressão de TFAM diminuída não apresentaram diferenças na velocidade de crescimento quando comparadas a células normais. Conforme esperado, as células cresceram mais em meio de alta glicose. Os resultados apresentados abaixo representam as médias de triplicatas experimentais.

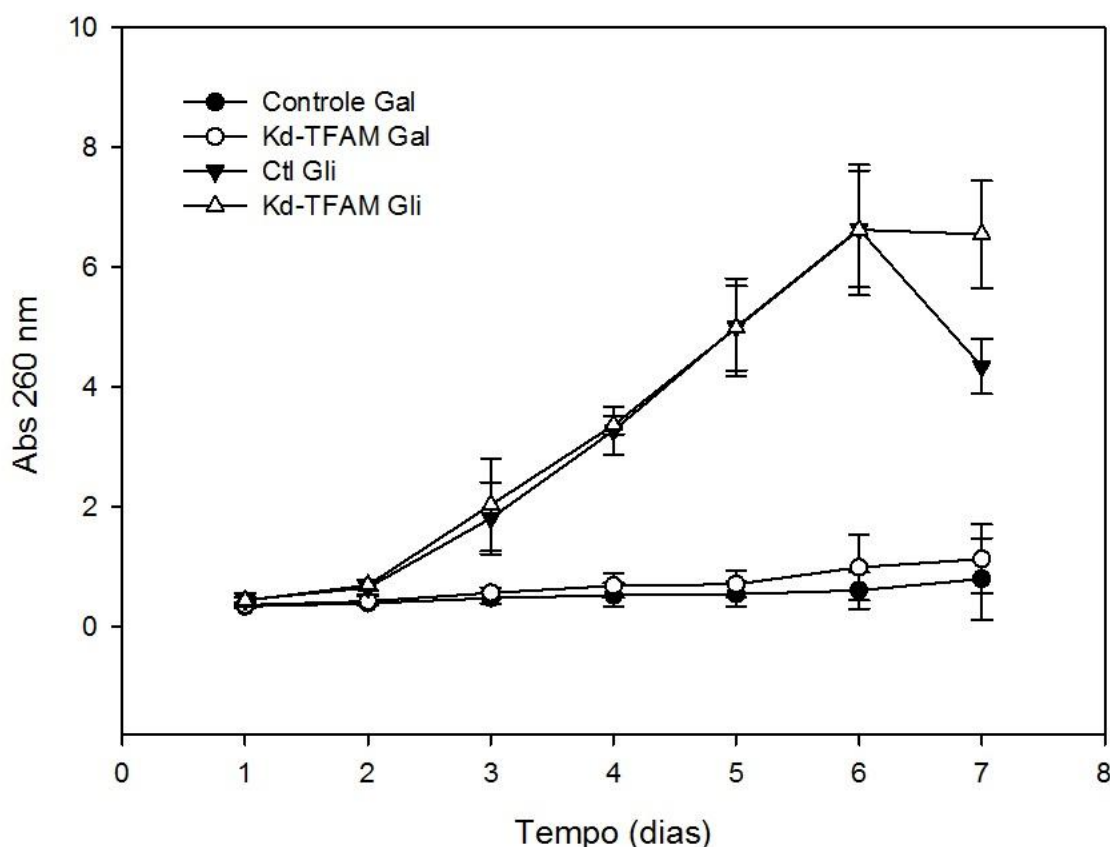


FIGURA 8. Curva de crescimento celular das linhagens Kd-TFAM e controle em meio de fermentativo e meio aeróbico. Médias de três experimentos independentes \pm DP.

4.6. ENSAIO DE PROLIFERAÇÃO CELULAR APÓS ESTRESSE OXIDATIVO

Após a indução de estresse oxidativo com o azul de metileno, nós observamos que nas células Kd-TFAM essa condição causou um menor efeito sobre a atividade mitogênica e/ou sobre o ciclo celular do que nas células controle. Assim, as células Kd-TFAM pareceram ter uma maior sobrevivência após estresse oxidativo (Fig. 9), embora não haja diferença estatística significativa ($p > 0,05$).

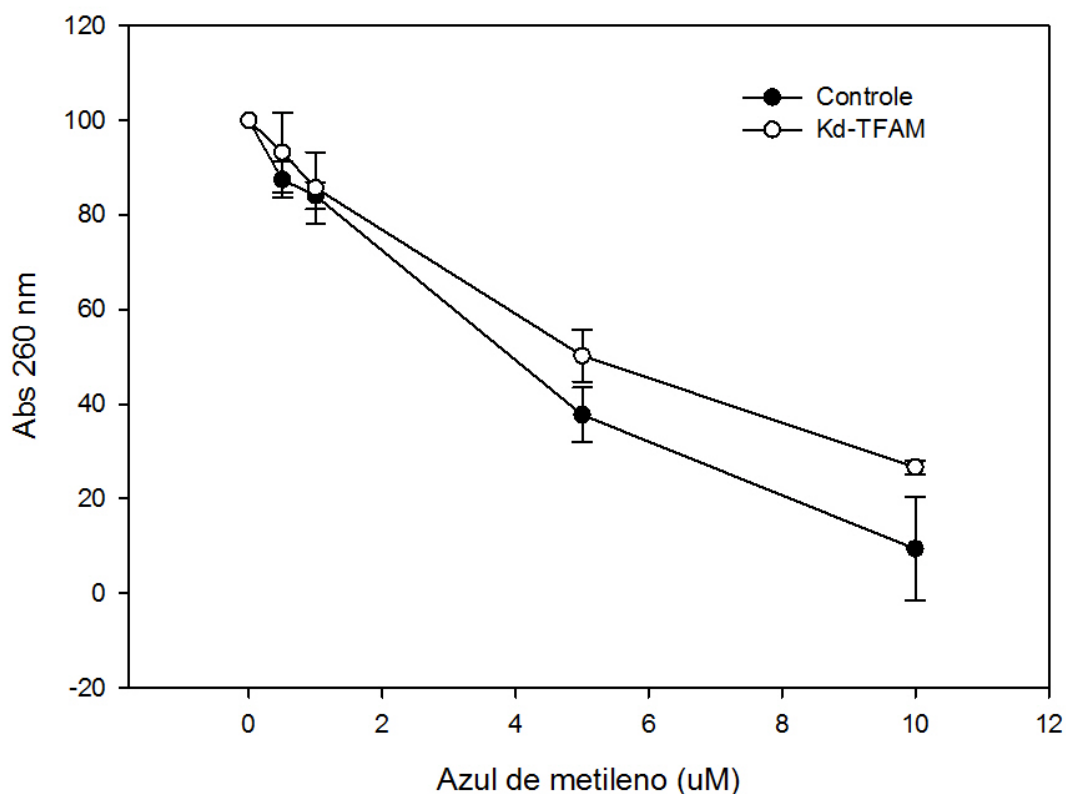


FIGURA 9. Ensaio de proliferação celular de linhagens HEK293T Kd-TFAM tratadas com azul de metileno. Médias de três experimentos independentes \pm DP.

O tratamento com menadiona também resultou em uma maior sobrevivência das células Kd-TFAM em relação ao controle (Fig. 10), apresentando um efeito menor sobre o ciclo celular.

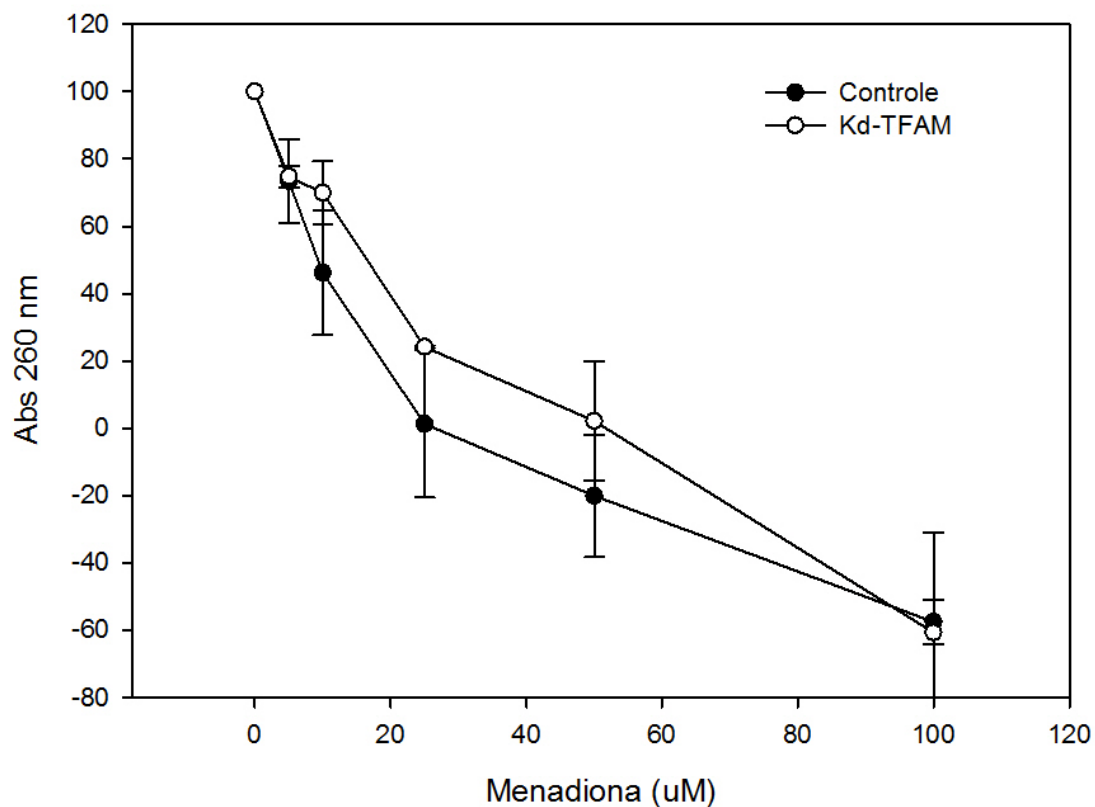


FIGURA 10. Ensaio de proliferação celular de linhagens HEK293T Kd-TFAM tratadas com Menadiona. Médias de três experimentos independentes \pm DP.

4.7. ENSAIO CLONOGÊNICO

As células HEK293T controle e Kd-TFAM apresentaram redução na sobrevivência de forma dose-dependente. Comparativamente, as células Kd-TFAM sobreviveram menos à condição de estresse oxidativo em relação ao controle (Fig. 11).

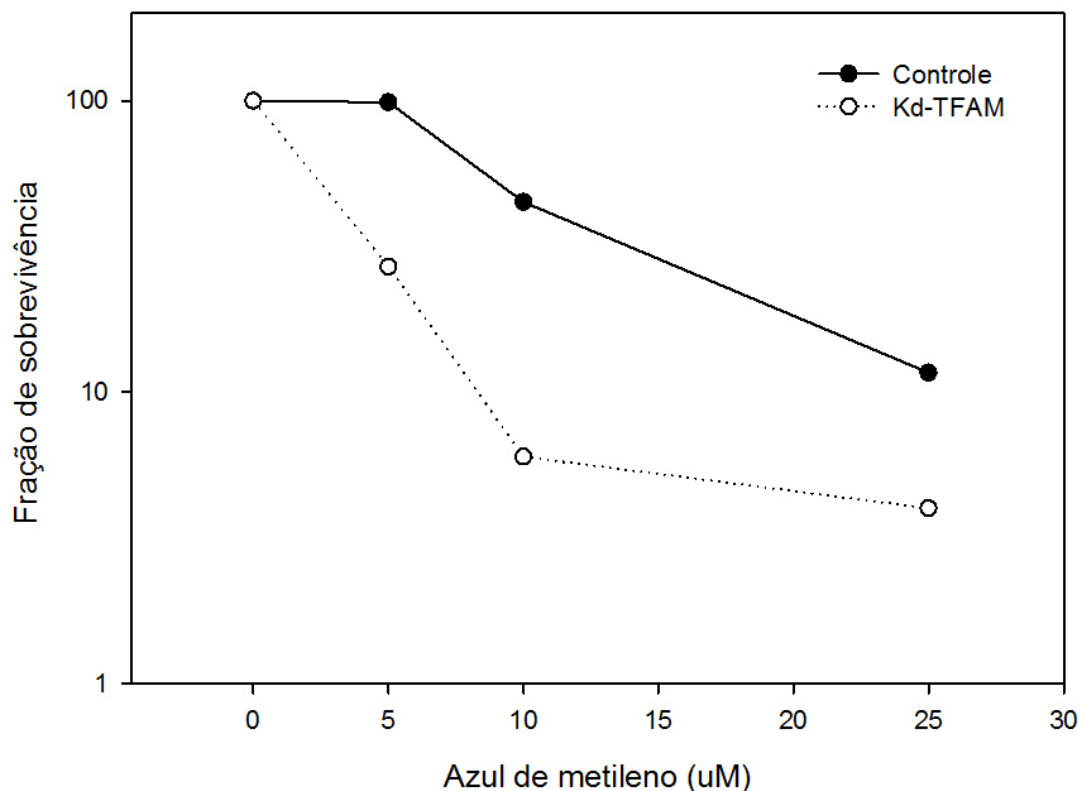


FIGURA 11. Ensaio clonogênico de células controle e Kd-TFAM em diferentes doses de azul de metileno.

4.8. LX-PCR

Para obtermos informações relativas da formação de lesões oxidadas e da cinética de reparo no DNAm, após indução do estresse oxidativo, utilizamos a técnica do LX-PCR (Fig. 12). As bandas amplificadas do DNAm (cerca de 16,3kb) foram quantificadas por densitometria, utilizando o software ImageJ. O experimento foi normalizado através da amplificação do fragmento do gene mitocondrial ND1 (Fig. 13), utilizando as respectivas amostras para calcular a razão de amplicons de DNAm por amplicons do gene ND1. Da mesma forma, quantificamos os amplicons de ND1 por densitometria.

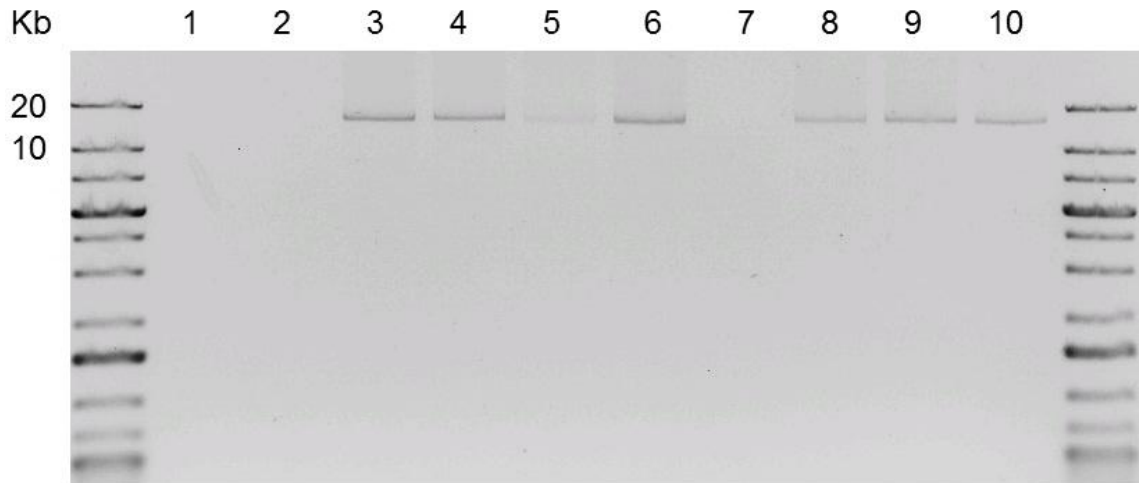


FIGURA 12. Gel ilustrativo de um experimento de XL-PCR. Amplicons de 16,3 kb do ensaio de lesão de DNAm_t realizado em células HEK293T controle e Kd-TFAM, após indução de estresse oxidativo com fotossensibilização com 25 uM de azul de metileno. (1) sem primers. (2) sem DNA. (3,4) controle não irradiado. (5,6) Kd-TFAM não irradiado. (7,8) controle irradiado. (9, 10) Kd-TFAM irradiado.

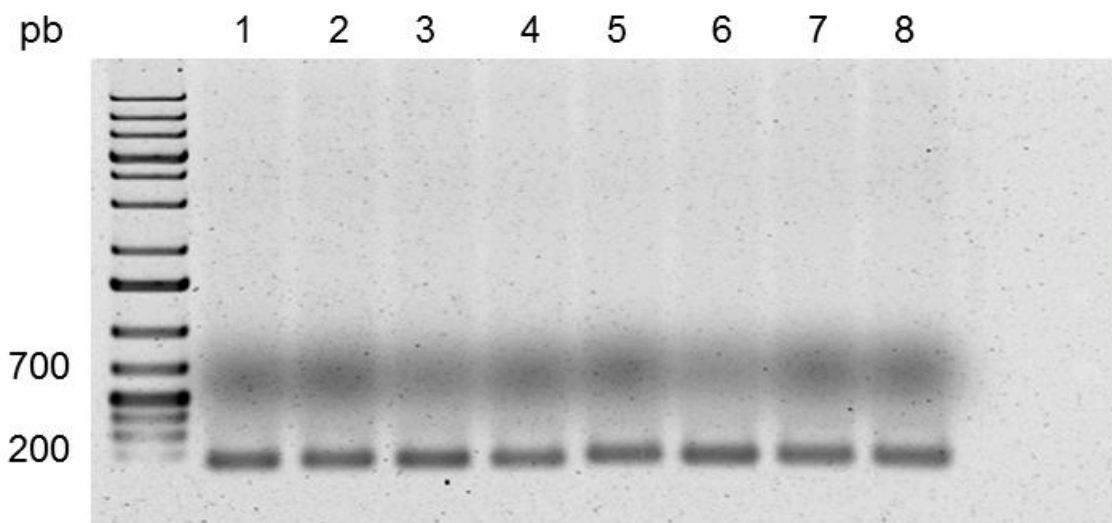


FIGURA 13. Gel ilustrativo de um experimento para normalização do XL-PCR. Amplicons de 170 pb do gene mitocondrial ND1. As amostras são do ensaio de lesão de DNAm_t realizado em células HEK293T controle e Kd-TFAM, após indução de estresse oxidativo com fotossensibilização com 25 uM de azul de metileno. (1,2) controle não irradiado. (3,4) Kd-TFAM não irradiado. (5,6) controle irradiado. (7,8) Kd-TFAM irradiado.

4.9. ENSAIO DE LESÃO DE DNAmT NO ESTRESSE OXIDATIVO

Após a indução de estresse oxidativo foi observado um número significativo ($p = <0,001$) de lesões na linhagem Kd-TFAM comparado ao controle (Fig. 14). A maior taxa de bloqueio da DNA polimerase no experimento de XL-PCR em células Kd-TFAM, indicou que TFAM apresenta um importante papel na proteção do DNAmT contra lesões oxidadas durante o estresse oxidativo.

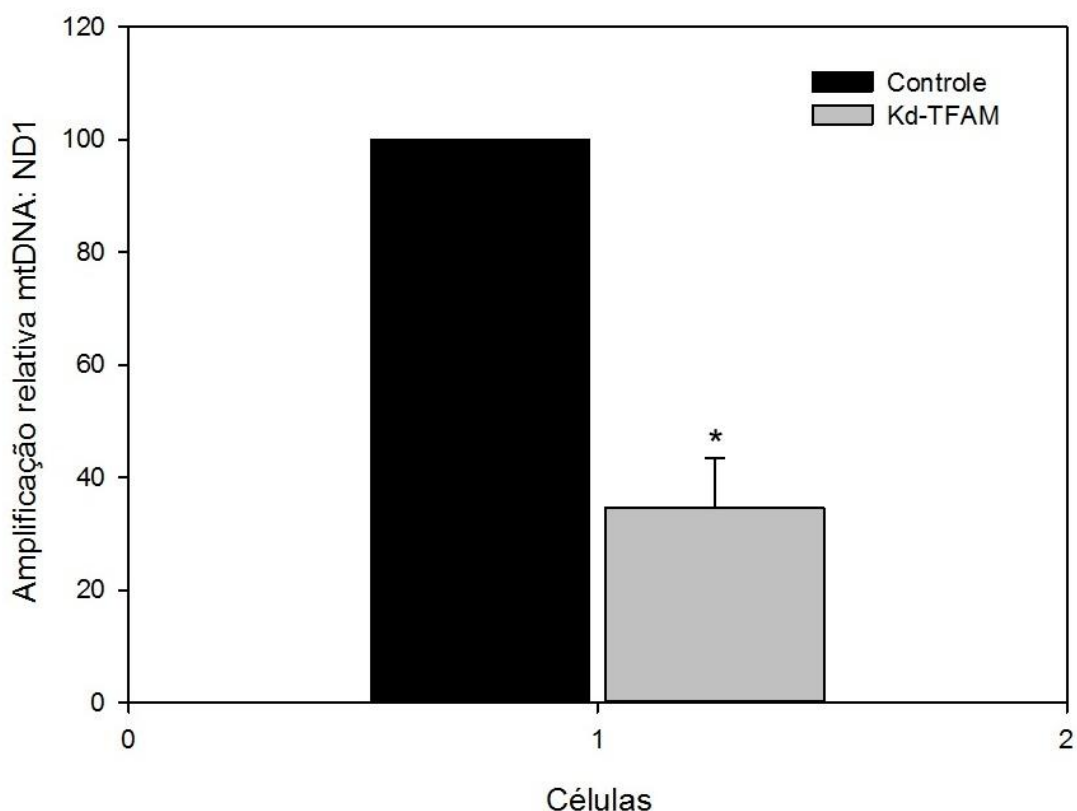


FIGURA 14.Quantificação relativa de lesões oxidadas no DNAmT através da indução de estresse oxidativo por fotossensibilização com 25 uM azul de metileno. Média dos valores relativos de pixels de bandas de XL-PCR:ND1, utilizando a linhagem controle como referência, de três experimentos independentes \pm DP. * $p < 0,05$.

4.10. ENSAIO DE REPARO DE DNAMt NO ESTRESSE OXIDATIVO

Para a compreensão do papel de TFAM no reparo do DNAMt, após a indução do estresse oxidativo, realizamos o ensaio da cinética de reparo. Nesse experimento, nós observamos que as células Kd-TFAM apresentam uma maior velocidade de reparo das lesões oxidadas do que a linhagem controle (Fig 12 e tabela 2). Dessa forma, o reparo de DNAMt em células Kd-TFAM parece ser mais eficiente do que o controle, visto que as células Kd-TFAM sofrem um maior número de lesões oxidadas (Fig. 14). Isso é sugerido no ponto inicial 0h (Fig. 15), onde verificamos uma diferença significativa na eficiência de amplificação do fragmento longo mitocondrial (número relativo de amplicons 60% menor do que a linhagem controle), indicando uma maior taxa de bloqueio da DNA polimerase. Mas após uma hora da indução das lesões, as células Kd-TFAM já apresentam uma maior quantidade relativa de DNAMt reparado em relação ao controle. A linhagem controle, com expressão normal de TFAM, apresentou quase nenhuma atividade de reparo entre os pontos de 30 minutos a 1h30. Isso se altera após 2h da indução das lesões, onde se observou um aumento significativo de reparo de DNAMt na linhagem controle. Após 12h, da indução das lesões, observamos que no controle houve o reparo de quase todo o DNAMt lesionado. Por outro lado, a linhagem Kd-TFAM apresentou uma menor eficiência de amplificação. Esse resultado, porém, não foi reprodutível, pois não houve sinal de amplificação nas repetições e nos outros experimentos da triplicata. De acordo com o que observamos no experimento de proliferação celular, a concentração de azul de metileno utilizada aqui (25 μ M), para induzir o estresse oxidativo, foi suficiente para desencadear morte celular em 24h. Sendo assim, é possível que devido a morte celular da linhagem Kd-TFAM nessa condição,

acarretada por modificações deletérias, não foi possível obter uma amplificação em 12h.

O efeito de diminuição da amplificação relativa de DNAm_t: ND1 em ambas as linhagens é suposto ser devido a geração secundária de EROs na mitocôndria, como através da peroxidação lipídica. O DNAm_t se encontra muito próximo da membrana mitoconrial interna, uqe tem os seus lipídios oxidados. Isso resulta em um cenário de crescente lesão ao DNAm_t, que começa a ser revertido a partir de uma hora após a indução do estresse oxidativo.

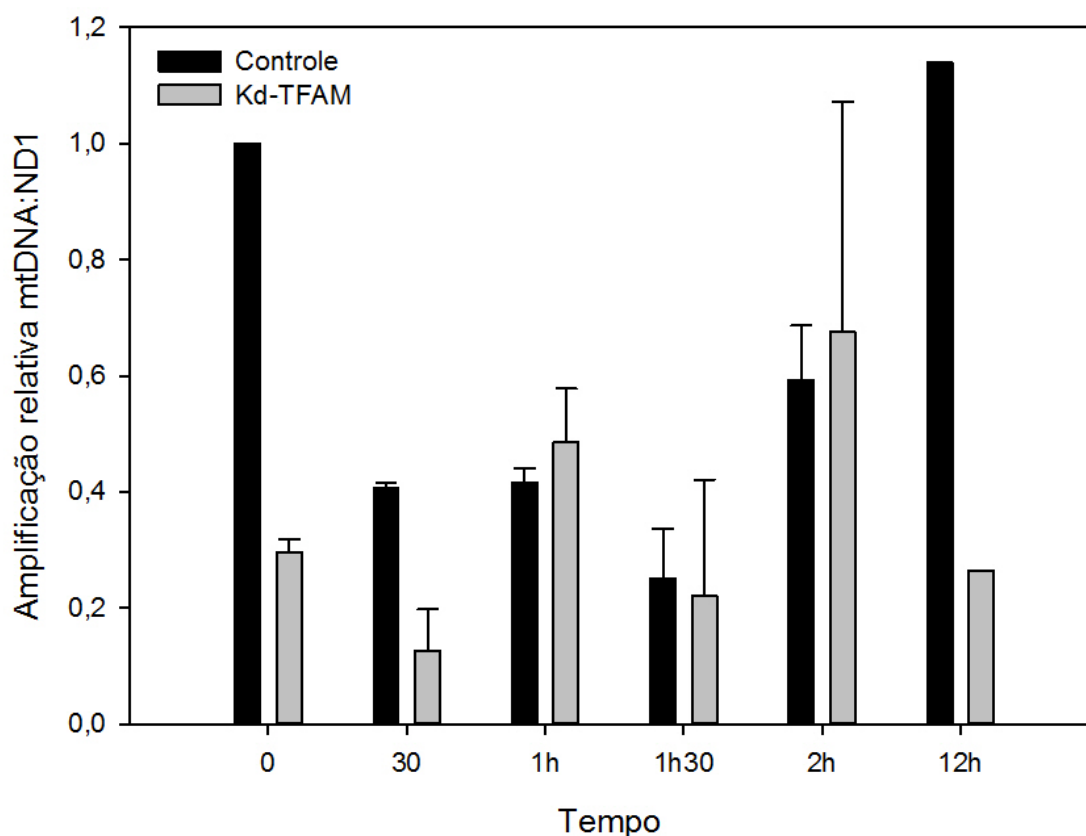


FIGURA 15. Análise relativa da cinética de reparo de DNAm_t após indução de estresse oxidativo em células HEK293T Kd-TFAM por fotossensibilização com 25 uM azul de metileno. Média dos valores relativos de pixels de bandas de XL-PCR:ND1, utilizando a linhagem controle 0h como referência, de três experimentos independentes \pm DP.

Utilizando os dados obtidos na cinética de reparo nos tempos de 30 minutos, 1 hora e 2 horas após a indução do estresse oxidativo, foi realizado análises de regressão linear, obtendo os dados da tabela 4. Apesar de o número inicial de

lesões presentes ser maior nas células Kd-TFAM, o coeficiente angular das curvas de ajuste linear, equivalente à velocidade relativa de reparo de DNAm_t, indica que a célula Kd-TFAM apresentou uma velocidade duas vezes maior no reparo do DNAm_t comparado às células controle.

TABELA 4. Taxas relativas de reparo de DNAm_t, obtidas a partir dos tempos de 30 min, 1, e 2h, das células controle e Kd-TFAM (n=3).

| Células | TRR ^a ± DP ^b | R² ^c ± DP |
|----------------|---|--|
| Controle | 0,1318 ± 0,057898 | 0,8263 ± 0,057417 |
| Kd-TFAM | 0,3400 ± 0,053344 | 0,7208 ± 0,188295 |

^aTaxa relativa de reparo: amplificação relativa DNAm_t:ND1 (pixel/pixel) por hora, a qual é numericamente igual ao coeficiente angular da curva de ajuste linear plotada com os dados da cinética de reparo. ^bDP: desvio padrão. ^cR²: coeficiente de regressão linear.

5. DISCUSSÃO

As mitocôndrias são os principais sítios de produção de EROs nas células e o DNAm_t está situado muito próximo aos complexos geradores dessas espécies. De fato, a vulnerabilidade do DNAm_t à modificações oxidadas nas suas bases pode ser ilustrada pelo fato de 8-oxo-dG acumular mais no DNAm_t do que no DNA nuclear (BECKMAN & AMES, 1996).

O acúmulo de mutações no DNAm_t pode afetar a estrutura e a expressão das proteínas da cadeia respiratória, que não funcionando adequadamente, podem levar ao aumento da produção de EROs (FISHEL *et al.*, 2003; YAKES & HOUTEN, 1997). Nessa condição, se estabelece um círculo vicioso que resulta em mais danos ao DNAm_t e a redução na produção de ATP. De fato, evidências sugerem que danos agudos sobre o DNAm_t, e um desequilíbrio no seu reparo, podem estar relacionados a sua degradação e a apoptose (RUCHKO *et al.*, 2005).

Durante muito tempo se pensou que o DNAm_t estivesse nu, ficando exposto livremente a agentes genotóxicos, diferentemente do DNA nuclear, que está empacotado por histonas (KANG & HAMASAKI, 2002), o que poderia explicar, em parte, o maior acúmulo de lesões no DNAm_t. A identificação de TFAM como a principal proteína componente do nucleóide mitocondrial modificou esse paradigma. Revestindo todo o DNAm_t, TFAM poderia funcionar como uma barreira física para o acesso de espécies reativas ao mTDNA, protegendo-o do ataque por EROs.

Apesar de alguns estudos recentes, pouco se sabe sobre o papel de TFAM na proteção do DNAm_t em condições de estresse oxidativo (HAYASHI *et al.*, 2008; XU *et al.*, 2009; MORIMOTO *et al.*, 2012). Um estudo com camundongos transgênicos que superexpressavam TFAM relatou uma redução da geração de EROs, devido ao aumento no número de cópias de DNAm_t e melhoria na função

respiratória mitocondrial (IKEUCHI *et al.*, 2005). Matsuda *et al.* (2013) estudou a superexpressão de TFAM em *Drosophila*, relatando um aumento da expectativa de vida, após indução de estresse oxidativo com peróxido de hidrogênio, sugerindo um função protetora de TFAM. Já outro estudo utilizando células humanas em cultura também verificou um papel protetor aparente de TFAM ao DNAm durante o estresse oxidativo (POHJOISMAKI *et al.*, 2006). Apesar de esses estudos sugerirem que TFAM protege o DNAm de lesões oxidadas, nenhum deles mediu o nível de lesões no DNAm após o estresse oxidativo, e tampouco a capacidade de reparo do DNAm. Nesse contexto, nosso trabalho obteve algumas respostas dos possíveis papéis de TFAM na proteção do DNAm e como ele pode atuar no reparo do DNAm.

Nossos experimentos de proliferação celular mostraram que as células com expressão reduzida de TFAM, após a indução do estresse oxidativo, apresentaram uma menor nível de inibição de proliferação celular do que as células controle (Figuras 9 e 10). Por outro lado, resultados preliminares de sobrevivência clonogênica sugerem que as mesmas células foram mais susceptíveis à morte celular (Fig. 11). Se, por um lado, esses resultados podem indicar que as células Kd-TFAM foram capazes de reparar as lesões causadas pelo tratamento com azul de metileno e menadiona com mais eficácia e rapidez, e conseqüentemente sofreram menor inibição de proliferação; por outro lado, a maior taxa de morte celular observada no experimento clonogênico pode indicar que lesões persistentes no DNAm induzem uma resposta celular que resulta em morte. Os resultados do ensaio clonogênico podem sugerir um cenário em que a ausência de TFAM leva a um aumento no número de lesões no DNAm e uma desregulação na sinalização de ciclo celular, que resulta na menor parada de proliferação imediatamente após o tratamento oxidativo. Por outro lado, esse maior número de lesões resulta, em longo

prazo, na morte das células. Apesar das lesões no DNAMt serem toleráveis pela mitocôndria devido as múltiplas cópias de DNAMt (KANG & HAMASAKI, 2002), a extensão das lesões é maior durante o estresse oxidativo, e, além disso, o número de cópias de DNAMt nas células Kd-TFAM é menor. Assim, nas células Kd-TFAM a tolerância às lesões no DNAMt possivelmente é menor se comparado a linhagem controle.

Corroborando com os dados de proliferação celular, os resultados do experimento de XL-PCR mostraram que as células Kd-TFAM apresentam um maior número de lesões oxidadas após o tratamento com azul de metileno, resultando em uma diminuição dos produtos de amplificação devido ao bloqueio da DNA polimerase. Isso sugeriu que TFAM, de fato, exerce um papel protetor ao DNAMt, reduzindo a ocorrência das lesões oxidadas. Nós sugerimos que isso é possível devido a formação de uma barreira física ao acesso das EROs às bases e ao esqueleto de açúcar-fosfato do DNAMt.

Porém, mesmo sabendo que TFAM está ligado em quase toda a extensão do DNAMt, sua ligação ao DNAMt não impede completamente a formação de lesões oxidadas após os estresse oxidativo, como observado na Figura 12 (compare linhas 3,4 com a linhas 7,8), em que observamos a formação de lesões bloqueadoras mesmo em células controle, expressando níveis normais de TFAM. Desta forma, é importante investigar o papel de TFAM na eficiência de remoção das lesões bloqueadoras formadas após o tratamento com azul de metileno. De fato, já foi demonstrado que, *in vitro*, TFAM se liga com maior afinidade DNA contendo 8-oxo-dG (YOSHIDA *et al.*, 2002; CANUGOVI *et al.*, 2010); e que, também *in vitro*, a ligação de TFAM ao substrato tem a capacidade de inibir competitivamente o acesso das enzimas de reparo (CANUGOVI *et al.*, 2010). No nosso cenário *in situ*, nós

sugerimos que o comportamento observado na Fig. 15, em que a remoção de lesões nas células controle só foi detectada duas horas após a indução do estresse oxidativo se deve também ao fato de que a estrutura do nucleoide, em grande parte devida à ligação de TFAM, precisa ser remodelada para que as enzimas de reparo tenham acesso às lesões.

A modulação da ligação de TFAM ao DNAMt é sugerida como um possível mecanismo de regulação do acesso das enzimas de reparo às lesões oxidadas (CANUGOVI et al. 2010; YOSHIDA *et al.*, 2003). Experimentos comprovaram a interação física entre a proteína supressora de tumor p53 e TFAM, durante a apoptose, quando p53 é translocada para a mitocôndria (WONG *et al.*, 2009). Essa interação pode mediar a ligação de TFAM ao DNAMt, inclusive às modificações oxidadas, conforme foi observado em experimentos *in vitro* (YOSHIDA *et al.*, 2003). Yoshida et al. (2003) demonstraram que a ligação de p53 a TFAM aumentava em 10 a 20 vezes a atividade de ligação de TFAM ao DNAMt, enquanto inibia a ligação de TFAM ao DNAMt oxidado (8-oxo-dG). No entanto, mais estudos são necessários para investigar de que forma essa interação ocorre *in vivo*, e de que forma ela atua durante o estresse oxidativo e no reparo do DNAMt. Sabe-se que p53 pode modular a atividade de reparo do DNAMt, provavelmente via uma interação funcional com DNA polimerase γ (a única DNA polimerase mitocondrial) (SOUZA-PINTO *et al.*, 2004). Desse modo, p53 poderia funcionar como um modulador da atividade de reparo de DNAMt via sua interação com TFAM, e também via o estímulo da atividade de poly.

Também é possível que outras proteínas podem estar envolvidas na resposta celular às lesões oxidadas durante o estresse oxidativo através de interações com TFAM e da modulação de sua ligação ao DNAMt. Recentemente, foi relatado que a

proteína CSB (*Cockayne syndrome group B*), envolvida em diversos processos como o reparo por excisão de nucleotídeos (NER) e reparo por excisão de base (BER), é capaz de modular a ligação de TFAM ao DNAm (BERQUIST *et al.*, 2012). Dessa forma, CSB, tal como p53, poderia facilitar o reparo do DNAm, deslocando TFAM dos sítios de lesões, permitindo um reconhecimento e a remoção eficiente dessas.

Além das interações entre as proteínas e das modulações da atividade de reparo e ligação de TFAM ao DNAm, a ocorrência de modificações pós-traducionais em TFAM pode ser também uma via de regulação para o reparo do DNAm durante o estresse oxidativo. Algumas modificações covalentes em TFAM já foram relatadas, como a acetilação (DINARDO *et al.*, 2003), a fosforilação (LU *et al.*, 2013), e a ubiquitinação (ANTELMAN *et al.*, 2008). Apesar desses estudos, não existe ainda nenhuma investigação sobre como as possíveis modificações pós-traducionais em TFAM estão relacionadas ao processo de reparo do DNAm.

As modificações pós-traducionais em proteínas ligantes ao DNA são importantes mecanismos regulatórios da replicação, expressão gênica, e reparo de DNA (HASAN *et al.*, 2002; LI *et al.*, 2007). É possível que modificações pós-traducionais em TFAM regulem a sua interação com o DNA, modulando, assim, o acesso das proteínas de reparo ao DNAm. De forma análoga, proteínas que compactam o DNA nuclear, as histonas, sofrem constantes modificações covalentes para a remodelagem da cromatina durante processos metabólicos como a expressão gênica e o reparo de DNA.

Dinardo *et al.* (2003) relatou pela primeira vez a ocorrência de modificação pós-traducional em TFAM, a acetilação de resíduos de lisina (2 e 11) no HMG-1 box, sugerindo a importância disso na regulação da expressão gênica mitocondrial ou na manutenção geral do DNAm. No mesmo âmbito da regulação da expressão gênica,

a fosforilação de resíduos de serina (55 e 56) dentro do HMG-1 box de TFAM foi relatada por LU *et al.* (2012). Esse estudo indicou que o TFAM fosforilado se dissocia ou não se liga ao DNAMt, sendo degradado pela protease Lon. Isso constituiria um possível mecanismo para a descompactação do DNAMt e para a regulação dos níveis de TFAM na mitocôndria. Já a ubiquitinação de TFAM foi sugerida por ANTELMAN *et al.* (2008) como um fator responsável pela degradação de mitocôndrias, visto o importante papel de TFAM para a replicação e transcrição do DNAMt, além da manutenção do nucleóide.

Em suma, a modulação da interação TFAM-DNAMt, tanto aquela envolvendo interações proteicas quanto as modificações pós-traducionais, pode ajudar a entender o controle da cinética do reparo do DNAMt durante a condição de estresse oxidativo. Nossos resultados de cinética de reparo, que indicaram um reparo mais lento em células controle comparado ao Kd-TFAM, reforça a proposição de que essas regulações estão ocorrendo para permitir o acesso das enzimas de reparo. De fato, nossos resultados demonstram que TFAM oferece uma barreira ao reparo, indicando a importância da existência de regulações que modulam sua interação com o DNAMt para que esse seja reparado. Assim, mais estudos são necessários para elucidar de que forma essa modulação ocorre durante o estresse oxidativo.

6. CONCLUSÃO

Nossos resultados permitem sugerir que TFAM apresenta um papel protetor do DNAMt contra lesões oxidadas durante o estresse oxidativo, colaborando para a manutenção da estabilidade genômica mitocondrial. TFAM protege o DNAMt de lesões que podem desencadear alteração do ciclo celular, aumentando a proliferação, e reduzindo a viabilidade celular. Ao mesmo tempo, o reparo mais lento em células com expressão normal de TFAM aponta para a importância de possíveis modulações da atividade ligante de TFAM ao DNAMt, para um reparo rápido e eficaz. Assim, ainda é necessário mais estudos para se entender a regulação da atividade de reparo de DNAMt envolvendo TFAM durante o estresse oxidativo.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alam, T. I.; Kanki, T.; Muta, K.; Ukaji, Y.; Nakayama, H.; TAKIO, K.;HAMASAKI, N.; KANG, D. **Human mitochondrial DNA is packaged with TFAM**. *Nucleic Acids Res.*, v.31, n. 6, p. 1640-45, 2003.

Anderson, S.; Bankier, A.T.; Barrell, B.G.; de Bruijn, M.H.; Coulson, A.R.; Drouin, J.; Eperon, I.C.; Nierlich, D.P.; Roe, B.A.; Sanger, F.; Schreier, P.H.; Smith, A.J.; Staden, R.; Young, I.G.. **Sequence and organization of the human mitochondrial genome**. *Nature*, v. 290, p.457-65, 1981.

Andersson, S.G.; Karlberg, O.; Canback, B.; Kurland, C.G.. **On the origin of mitochondria: a genomics perspective**. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.*, v. 358, p. 165-79, 2003.

Antelman, J.; Manandhar, G.; Yi, Y. J.; Whitworth, K.M.; Sutovsky, M.; Agca, C.; Prather, R.S.; Sutovsky, P. **Expression of mitochondrial transcription factor A (TFAM) during porcine gametogenesis and preimplantation embryo development**. *J Cell Physiol.*, v. 217, n. 2, p. 529-43, 2008.

Beckman, K. & Ames, B. **Detection and quantification of oxidative adducts of mitochondrial DNA**. *Methods in Enzymology*, v.264, p.442-53, 1996.

Berquist, B.; Canugovi, C.; Sykora, P.; Wilson III, D.; Bohr, V.A.. **Human Cockayne syndrome B protein reciprocally communicates with mitochondrial proteins and promotes transcriptional elongation**. *Nucleic Acids Research*, v. 40, n. 17, p.8392-8405, 2012.

Betteridge, D.J.. **What is oxidative stress?** *Metabolism*, v. 49, p. 3-8, 2000.

Bonawitz, N.D.; Clayton, D.A.; Shadel, G.S. **Initiation and beyond: Multiple functions of human mitochondrial transcription machinery**. *Molecular Cell*, v.24, p. 813-25, 2006.

Bohr, V.A.. **DNA-related pathways defective in human premature aging**. *Scientific World Journal*, p. 1216-26, 2002.

Cadenas, E.; Boveris, A.; Ragan, C.I.; Stoppani, A.O.. **Production of superoxide radicals and hydrogen peroxide by NADH-ubiquinone reductase and ubiquinol-cytochrome c reductase from beef-heart mitochondria**. *Arch. Biochem. Biophys.*, v. 180, n. 2, p. 248-57, 1977.

Cadet, J.; Douki, T.; Ravanat, J.L.. **Oxidatively generated base damage to cellular DNA**. *Free Radic. Biol. Med.*, v. 49, p. 9-21, 2010.

Cadet, J.; Douki, T.; Gasparutto, D.; Ravanat, J.L.; Wagner, J.R.. **Oxidatively generated nucleobase modifications in isolated and cellular DNA**. *John Wiley & Sons, Chichester, UK*, p. 1319-44, 2012.

Canugovi, C.; Maynard, S.; Bayne, A.C.; Sykora, P.; Tian, J.; Souza-Pinto, N.C.; Croteau, D.L.; Bohr, V.A. **The mitochondrial transcription factor A functions in mitochondrial base excision repair.** DNA Repair, v.9,n.10, p. 1080-9, 2010.

Cooke, M.S.; Evans, M.D.; Dizdaroglu, M.; Lunec, J. **Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease.** FASEB J., v. 17, n. 10, p.1195-214, 2003.

Criddle, D.N.; Gillies, S.; Baumgartner-Wilson, H.K.; Jaffar, M.; Chinje, E.C.; Passmore, S.; Chvanov, M.; Barrow, S.; Gerasimenko, O.V.; Tepikin, A.V.; Sutton, R.; Petersen, O.H. **Menadione-induced reactive oxygen species generation via redox cycling promotes apoptosis of murine pancreatic acinar cells.** J. Biol. Chem., v. 29, p. 40485-92, 2006.

Davies, M.J. **Singlet oxygen-mediated damage to proteins and its consequences.** Biochem. Biophys. Res. Commun., v. 305, n. 3, p. 761-70, 2003.

Dinardo, M.; Musicco, C.; Fracasso, F.; Milella, F.; Gadaleta, M.; Gadaleta, G.; Cantatore, P. **Acetylation and level of mitochondrial transcription factor A in several organs of young and old rats.** Biochem Biophys Res Commun., v. 301, n. 1, p. 187-191, 2003.

Dinant, C.; Bartek, J.; Bekker-Jensen, S. **Histone displacement during nucleotide excision repair.** Int. J. Mol. Sci., v. 13, p. 13322-337, 2012.

Dizdaroglu, M. **Base-excision repair of oxidative DNA damage by DNAGlycosylases.** Mutat. Res., v. 591, p. 45-59, 2005.

Falkenberg, M.; Larsson, N.G.; Gustafsson, C.M. **DNA replication and transcription in mammalian mitochondria.** Annu. Rev. Biochem., v. 76, p. 679-99, 2007.

Fishel, M.; Seo, Y.; Smith, M.; Kelley, M. **Imbalancing the DNA Base Excision Repair Pathway in the Mitochondria; Targeting and Overexpressing N-Methylpurine DNA glycosylase in Mitochondria Leads to Enhanced Cell Killing.** Cancer Research, v. 63, p. 608-15, 2003.

Fisher, R.P. & Clayton, D.A. **A transcription factor required for promoter recognition by human mitochondrial RNA polymerase. Accurate initiation at the heavy- and light- strand promoters dissected and reconstituted in vitro.** J. Biol. Chem., v. 260, p.11330-11338, 1985.

Fisher, R.P.; Topper, J.N.; Clayton, D.A. **Promoter selection in human mitochondria involves binding of a transcription factor to orientation – independent upstream regulatory elements.** Cell, v. 50, p. 247-58, 1987.

Fisher, R.P. & Clayton, D.A. **Purification and characterization of human mitochondrial transcription factor 1.** Mol. Cell. Biol., v. 8, p. 3496-3509, 1988.

Fisher, R.P.; Parisi, M.A.; Clayton, D.A. **Flexible recognition of rapidly evolving promoter sequences by mitochondrial transcription factor 1.** *Genes Dev.*, v. 3, p. 2202-17, 1989.

Fisher, R.P.; Lisowsky, T.; Parisi, M.A.; Clayton, D.A. **DNA wrapping and bending by a mitochondrial high mobility group-like transcriptional activator protein.** *J. Biol. Chem.*, v. 267, n. 5, p. 3358-67, 1992.

Fortini, P. & Dogliotti, E. **Mechanisms of dealing with DNA damage interminally differentiated cells.** *Mutat. Res.*, v. 685, p. 38-44, 2010.

Fridovich, I. **Superoxide radical and superoxide dismutases.** *Annu. Rev. Biochem.*, v. 64, p. 97-112, 1995.

Gabrielli, D.; Belisle, E.; Severino, D.; Kowaltowski, A.J.; Baptista, M.S. **Binding, aggregation and photochemical properties of methylene blue in mitochondrial suspensions.** *Photochem. Photobiol.*, v. 79, n. 3, p. 227-32, 2004.

Glassner, B.J.; Posnick, L.M.; Samson, L.D. **The influence of DNA glycosilases on spontaneous mutation.** *Mut. Res.*, v. 400, p. 33-44, 1998.

Hallberg, B.M. & Larsson, N.G. **TFAM forces mtDNA to make a U-turn.** *Nat. Struct. Mol. Biol.*, v. 18, p. 1179-81, 2011.

Hasan, S.; Hottiger, M. O. **Histone acetyl transferases: a role in DNA repair and DNA replication.** *J. Mol. Med.*, v. 80, p. 463-74, 2002.

Hayashi, Y.; Yoshida, M.; Yamato, M.; Ide, T.; Wu, Z.; Ochi-Shindou, M.; Kanki, T.; Kang, D.; Sunagawa, K.; Tsutsui, H.; Nakanishi, H. **Reverse of age-dependent memory impairment and mitochondrial DNA damage in microglia by an overexpression of human mitochondrial transcription factor A in mice.** *J. Neurosci.*, 28(34), p. 8624-34, 2008.29

Hedge, M.L.; Hazra, T.K.; Mitra, S. **Early steps in the DNA base excision/single-strand interruption repair pathway in mammalian cells.** *Cell Res.*, v. 18, p. 27-47, 2008.

Hudson, E.K.; Hogue, B.A.; Souza-Pinto, N.C.; Croteau, D.L.; Anson, R.M.; Bohr, V.A.; Hansford, R.G. **Age-associated change in mitochondrial DNA damage.** *Free Rad. Res.*, v. 29, p. 573-79, 1998.

Ikeda, S.; Sumiyoshi, H.; ODA, T. **DNA binding properties of recombinant human mitochondrial transcription factor 1.** *Cell Mol Biol*, v.40, n. 4, p. 489-93, 1994.

Ikeuchi, M.; Matsusaka, H.; Kang, D.; Matsushima, S.; Ide, T.; Kubota, T.; Fujiwara, T.; Hamasaki, N.; Takeshita, A.; Sunagawa, K.; Tsutui, H. **Overexpression of mitochondrial transcription factor A ameliorates mitochondrial deficiencies and cardiac failure after myocardial infarction.** *Circulation*, 112(5), p. 683-90, 2005.

Iyama, T. & Wilson III, D.M. **DNA repair mechanisms in dividing and non-dividing cells.** DNA Repair, v. 12, p. 620-36, 2013.

Kang, D. & Hamasaki, N. **Mitochondrial transcription factor A in the maintenance of mitochondrial DNA: overview of its multiple roles.** Ann N Y Acad Sci., v.1024, p. 101-8, 2005.

Kang, D.; Kim, S. H.; Hamasaki, N. **Mitochondrial transcription factor A (TFAM): Roles in maintenance of mtDNA and cellular functions.** Mitochondrion, 7(1-2), p. 39-44, 2007.

Kanki, T.; Ohgaki, K.; Gaspari, M.; Gustafsson, C.M.; Fukuoh, A.; Sasaki, N.; Hamasaki, N.; Kang, D. **Architectural role of mitochondrial factor A in maintenance of human mitochondrial DNA.** Mol. Cell. Biol., v. 24, p. 9823-34, 2004.

Kaufman, B.; Durisic, N.; Mativetsky, J.; Constantino, S.; Hancock, M.; Grutter, P.; Shoubridge, E. **The mitochondrial transcription factor TFAM coordinates the assembly of multiple DNA molecules into nucleoid-like structures.** Mol. Biol. Cell., v.18, p. 3225-36, 2007.

Kovalenko, O.A. and Santos, J.H. **Analysis of oxidative damage by gene-specific quantitative PCR.** Curr Protoc Hum Genet, 19, 19.1., 2009.

Kowaltowski, A.J.; Souza-Pinto, N.C.; Castilho, R.F.; Vercesi, A.E. **Mitochondria and reactive oxygen species.** Free Radical Biology & Medicine, v. 47, p. 333-43, 2009.

Larsson, N.; Oldfors, A.; Holme, E.; Clayton, D.A. **Low levels of mitochondrial transcription factor A in mitochondrial DNA depletion.** Biochem. Biophys. Res. Commun., v. 200, n. 3, p. 1374-81, 1994.

Larsson, N.; Wang, J.; Wilhelmsson, H.; Oldfors, A.; Rustin, P.; Lewandoski, M.; Barsh, G.; Clayton, D.A. **Mitochondrial transcription factor A is necessary for mtDNA maintenance and embryogenesis in mice.** Nature Genetics, v.18, p. 231-36, 1998.

Li, B.; Carey, M.; Workman, J. **The Role of Chromatin during Transcription.** Cell, 128, p. 707-19, 2007.

Litonin, D.; Sologub, M.; Shi, Y.; Savkina, M.; Anikin, M.; Falkenberg, M.; Gustafsson, C.M.; Temiakov, D. **Human mitochondrial transcription revisited: only TFAM and TFB2M are required for transcription of the mitochondrial genes *in vitro*.** J. Biol. Chem., v. 285, n. 24, p. 18129-133, 2010.

Liu, P.; Qian, L.; Sung, J.S.; Souza-Pinto, N.C.; Zheng, L.; Bogenhagen, D.F.; Bohr, V.A.; Wilson III, D.M.; Shen, B.; Dipple, B. **Removal of oxidative DNA damage via FEN-1-dependent long-patch base excision repair in human cell mitochondria.** Mol. Cell. Biol., v. 28, p. 4975-87, 2008.

Loor, G.; Kondapalli, J.; Schriewer, J.M.; Chandel, N.S.; VandenHoek, T.L.; Schumacker, P.T. **Menadione triggers cell death through ROS-dependent**

mechanisms involving PARP activation without requiring apoptosis. Free Radic. Biol. Med., v. 49, n. 12, p. 1925-36, 2010.

Lu, B.; Lee, J.; Nie, X.; Li, M.; Morozov, Y.; Venkatesh, S.; Bogenhagen, D.F.; Temiakov, D.; Suzuki, C. **Phosphorylation of human TFAM in mitochondria impairs DNA binding and promotes degradation by the AAA⁺ Lon Protease.** Molecular Cell, v.49, p. 1-12, 2013.

Mao, C.C. & Holt, I.J. **Clinical and Molecular Aspects of Diseases of Mitochondrial DNA Instability.** Chang Gung Med. J., v.32, n.4, p. 354-69, 2009.

Maynard, S.; Schurman, S.H.; Harboe, C.; Souza-Pinto, N.C.; Bohr, V.A. **Base excision repair of oxidative DNA damage and association with cancer and aging.** Carcinogenesis, v. 30, n.1, p. 2-10, 2009.

Maynard, S.; Souza-Pinto, N.C.; Scheibye-Knudsen, M.; Bohr, V.A. **Mitochondrial base excision repair assays.** Methods, v. 51, p. 416-25, 2010.

Matsuda, T.; Kanki, T.; Tanimura, T.; Kang, D.; Matsuura, E. **Effect of overexpression of mitochondrial transcription factor A on lifespan and oxidative stress response in *Drosophila melanogaster*.** Bioch. Bioph. Res. Comm., v. 430, p. 717-21, 2013.

Matsumoto, Y.; Kim, K.; Bogenhagen, D. **Proliferating cell nuclear antigen-dependent abasic site repair in *Xenopus laevis* oocytes: an alternative pathway of base excision DNA repair.** Mol. Cell. Biol., v. 14, n. 9, p. 6187-97, 1994.

Morimoto, N.; Miyazaki, K.; Kurata, T.; Ikeda, Y.; Matsuura, T.; Kang, D.; Ide, T.; Abe, K. **Effect of mitochondrial transcription factor A overexpression on motor neurons in amyotrophic lateral sclerosis model mice.** J. Neurosci. Res., v. 90, p. 1200-08, 2012.

Parisi, M. & Clayton, D. **Similarity of human mitochondrial transcription factor 1 to high mobility group proteins.** Science, v. 252, p. 965-69, 1991.

Pham, X.H.; Farge, G.; Shi, Y.; Gaspari, M.; Gustafsson, C.M.; Falkenberg, M. **Conserved sequence box II directs transcription termination and primer formation in mitochondria.** J. Biol. Chem., v. 281, n. 34, p. 24647-52, 2006.

Piette, J. **New trends in photobiology: biological consequences associated with DNA oxidation mediated by singlet oxygen.** J. Photochem. Photobiol., v. 11, p. 241-60, 1991.

Pohjoismaki, J.; Wanrooij, S.; Hyvarinen, A.; Goffart, S.; Holt, I.; Spelbrink, J.; Jacobs, H. **Alterations to the expression level of mitochondrial transcription factor A, TFAM, modify the mode of mitochondrial DNA replication in cultured human cells.** Nucleic Acids Res., v. 34, n. 20, p. 5815-28, 2006.

Reeves, R. & Adair, J.E. **Role of high mobility group (HMG) chromatin proteins in DNA repair.** DNA Repair, v.4, p. 926-38, 2005.

Richter, C.; Park, J.W.; Ames, B. **Normal oxidative damage to mitochondrial and nuclear DNA is extensive.** Proc. Natl. Acad. Sci., v. 85, p. 6465-67, 1988.

Rubio-Cosials, A.; Sidow, J.F.; Jiménez-Menéndez, N.; Fernández-Millán, P.; Montoya, J.; Jacobs, H.T., Coll, M.; Bernandó, P.; Solá, M. **Human mitochondrial transcription factor A induces a U-turn structure in the light strand promoter.** Nat. Struct. Mol. Biol., v. 18, p. 1281-9, 2011.

Ruchko, M.; Gorodna, O.; LeDOux, S.P.; Alexeev, M.F.; Al-Mehdi, A.B.; Gillespie, M.N. **Mitochondrial DNA damage triggers mitochondrial dysfunction and apoptosis in oxidant-challenged lung endothelial cells.** Am. J. Physiol. Lung Cell Mol Physiol., v. 288, n. 3, p. L530-5, 2005.

Santos, J.H.; Mandavilli, B.S.; Van, H.B. **Measuring oxidative mtDNA damage and repair using quantitative PCR.** Methods Mol. Biol., v. 197, p.159-76, 2002.

Schiff, L.J.; Eisenberg, W.C.; Dziuba, J.; Taylor, K.; Moore, S. **Cytotoxic effects of singlet oxygen.** Envir. Health Persp., v. 76, p. 199-203, 1987.

Seeberg, E.; Eide, L.; Bjoras, M. **The base excision repair pathway.** Trends Biochem.Sci., v. 20, p. 391-97, 1995.

Shadel, G.S.& Clayton, D.A. **Mitochondrial DNA maintenance in vertebrates.** Annu. Rev. Biochem., v.66, p. 409-35, 1997.

Shadel, G.S. **Expression and maintenance of mitochondrial DNA: new insights into human disease pathology.** Am. J. Pathol., v. 172, p. 1445–1456, 2008.

Souza-Pinto, N.C.; Harris, C.; Bohr, V. **p53 functions in the incorporation step in DNA Base Excision Repair in Mouse Liver Mitochondria.** Oncogene, v. 23, p.

Souza-Pinto N.C.; Mason, P.A.; Hashiguchik, K.; Weissman, L.; Tian, J.; Guay, D.; Lebel, M.; Stevnsner, T.V.; Rasmussen, L.J.; Bohr, V. **Novel DNA mismatch-repair activity involving YB-1 in human mitochondria.** DNA Repair, v. 8, p. 704-19, 2009.

Souza-Pinto, N.C.; Aamann, M.D.; Kulikowicz, T.; Stevnsner, T.V.; Bohr, V. **Mitochondrial helicases and mitochondrial genome maintenance.** Mechanisms of Ageing and Development, v. 131, p. 503-10, 2010.

Stuart, J.A.; Maynard, S.; Hashiguchi, K.; Souza-Pinto, N.C.; Bohr, V. **Localization of mitochondrial DNA base excision repair to an inner membrane-associated particulate fraction.** Nucleic Acids Res., v. 33, p. 3722-32, 2005.

Stros, M.; Polanská, E.; Struncová, S.; Pospíšilová, S. **HMGB1 and HMGB2 proteins up-regulate cellular expression of human topoisomerase II alpha.** Nucleic Acids Res., v.37, n. 7, p. 2070-86, 2009.

Szczesny, B; Tann, A.W.; Longley, M.; Copeland, W.A.; Mitra, S. **Long patch base excision repair in mammalian mitochondrial genomes.** J.Biol. Chem., v. 283, p. 26349-356, 2008.

Terril, J.R.; Radley-Crabb, H.G.; Iwasaki, T.; Lemckert, F.A.; Arthur, P.G.; Grounds, M.D. **Oxidative stress and pathology in muscular dystrophies: focus on protein thiol oxidation and dysferlinopathies.** FEBS J., v. 280, n. 17, p. 4149-64, 2013.

Thor, H.; Smith, M.T.; Hartzell, P.; Bellomo, G.; Jewel, S.; Orrenius, S. **The metabolism of menadione (2-methyl-1,4-naphthoquinone) by isolated hepatocytes. A study of the implications of oxidative stress in intact cells.** J. Biol. Chem., v. 20, p.12419-25, 1982.

Tomkinson, A.E.; Chen, L.; Dong, Z.; Leppard, J.B.; Levin, D.S.; Mackey, Z.B.; Motycka, T.A. **Completion of base excision repair by mammalian DNA ligases.** Prog. Nucleic Acid. Res. Mol. Biol., v. 68, p. 151-64, 2001.

Turrens, J.F. & Boveris, A. **Generation of superoxide anion by the NADH dehydrogenase of bovine heart mitochondria.** Biochem. J., v. 191, p. 421-7, 1980.

Xu, S.; Zhong, M.; Zhang, L.; Wang, Y.; Zhou, Z.; Hao, Y.; Zhang, W.; Yang, X.; Wei, A.; Pei, L.; Yu, Z. **Overexpression of TFAM protects mitochondria against β -amyloid-induced oxidative damage in SH-SY5Y cells.** FEBS Journal, v.276, p.3800-09, 2009.

Wang, Y. & Bogenhagen, D.F. **Human mitochondrial DNA nucleoids are linked to protein folding machinery and metabolic enzymes at the mitochondrial inner membrane.** J. Biol. Chem., v. 281, p. 25791-802, 2006.

Weissman, L.; Souza-Pinto, N.C.; Stevnsner, T.; Bohr, V.A. **DNA repair, mitochondria, and neurodegeneration.** Neuroscience, n. 145, p.1318-29, 2007.

Weisiger, R.A. & Fridovich, I. **Superoxide dismutase: organelle specificity.** J. Biol. Chem., v. 248, p. 3582-3592, 1973.

Wilson III, D. & Bohr, V. **The mechanics of base excision repair, and its relationship to aging and disease.** DNA Repair, v. 6, p. 544-559, 2007.

Wiesner R.; Zsurka, G.; Kunz, W. **Mitochondrial DNA damage and the aging process – facts and imaginations.** Free Radical Research, v. 40, n. 12, p. 1284-94, 2006.

Yakes, F. M. & Houten, B. V. **Mitochondrial DNA damage is more extensive and persists longer than nuclear DNA damage in human cells following oxidative stress.** Proc. Natl. Acad. Sci. USA, v. 94, p. 514-519, 1997.

Yoshida, Y.; Izumi, H.; Ise, T.; Uramoto, H.; Torigoe, T.; Ishiguchi, H.; Murakami, T.; Tanabe, M.; Nakayama, Y.; Itoh, H.; Kasai, H. Kohno, K. **Human mitochondrial transcription factor A binds preferentially to oxidatively damaged DNA.** Biochem. Biophys. Res. Commun., v. 295, p. 945-51, 2002.

SÚMULA CURRICULAR

DADOS PESSOAIS

Nome: Paulo Newton Tonolli

Local e data de nascimento: São José do Rio Preto – SP, 15 de Março de 1989.

EDUCAÇÃO

Ensino Médio: Colégio Interativo Atibaia, Atibaia, São Paulo. Ano: 2005-2006.

Graduado em Licenciatura em Ciências Biológicas, Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), São Paulo. Período: 2007-2010.

FORMAÇÃO COMPLEMENTAR

Extensão universitária em Curso de Verão em Biofísica Molecular. Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho. (76h)

OCUPAÇÃO

Bolsista de Mestrado: CNPq Institucional (Agosto 2011 – Fevereiro 2012); FAPESP (Março 2012 – Julho 2013).

Bolsista Iniciação científica FAPESP (2009-2010), UFSCar, Lab. Biotecnologia de Sistemas Bioluminescentes, sob orientação Prof. Dr. Vadim Viviani.

PUBLICAÇÕES (Artigos Completos e Resumos em Congressos)

Artigo

TONOLLI, P. N. ; OKAWACHI, F. M. ; ABDALLA, F. C. ; VIVIANI, V. R. .
Bioluminescent Fat Body of Larval *Aspisomalineatum* (Coleoptera: Lampyridae)
Firefly: Ontogenic Precursor of Lantern's Photogenic Tissue. *Annals of
theEntomologicalSociety of America*, v. 104, p. 761-767, 2011.