UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO INSTITUTO DE QUÍMICA Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Bioquímica)

# THIAGO DE SOUZA FREIRE

# EIXO XPC-P53-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> E DISFUNÇÃO MITOCONDRIAL: QUAL É O FATOR CENTRAL?

Versão corrigida

São Paulo Data do depósito 02/07/2018

# THIAGO DE SOUZA FREIRE

# EIXO XPC-P53-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> E DISFUNÇÃO MITOCONDRIAL: QUAL É O FATOR CENTRAL?

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

Orientadora: Profª Nadja Cristhina de Souza Pinto

São Paulo 2018

Dedico esta tese mais uma vez aos meus professores. Zenilda minha professora do primeiro ano do ensino fundamental com a qual aprendi a ler e escrever,

Ana Paula minha professora do terceiro ano do ensino fundamental, que tratava todos seus alunos com tanto amor e dedicação, nos fazia sentir abrigados, protegidos e amados, dando alívio aos nossos inúmEROs sofrimentos, incluindo o meu, de voltar para casa todos dias e encontrar um lar compartilhado com o álcool, as drogas e a violência.

Adriana e Marcelo meus atenciosos professores de inglês que além de compartilhar conhecimento também compartilharam seus carinhos e atenções, me fizeram sentir especial, me fizeram sentir parte de uma família algo que eu nunca havia sentido antes.

E por fim ao professor e

*mestre Massa* ele foi a pessoa que me desafiou a ir além, a pessoa que me disse que eu não era bom o bastante.Com seu jeito sempre humilde e calmo ele estava pronto a ajudar a todos. Dava aulas de graça aos sábados e domingos. Quando eu perguntei por que ele fazia isso, sua resposta foi... "Eu gostaria que todos tivessem oportunidade". Sem dúvidas ele foi a pessoa mais extraordinária que conheci.

> Vocês são o motivo de eu estar aqui hoje. muito obrigado!

# Agradecimentos

À Natureza pelo espaço, tempo, vida e oportunidade de existir.

À Prof<sup>a</sup> Nadja Cristhina de Souza Pinto pela orientação e pela confiança dada a mim de fazer parte de seu grupo de pesquisa.

Aos colegas de Laboratório, pelo companheirismo e amizade.

E a todos que direta ou indiretamente contribuíram para realização deste trabalho.

MUITO OBRIGADO!

"Que eu sempre saiba expressar minha gratidão às pessoas que fazem minha vida ser mais leve e bonita. Que estão ao meu lado no riso e na dor. Não quero mandar flores ou escrever textos quando elas não puderem mais receber. Quero amá-las e quero que saibam que são amadas. É bobeira morrer de orgulho. Bom é viver de amor."

Drica Serra; A menina e o violão.

## RESUMO

Freire, T. S. Eixo XPC-p53-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e disfunção mitocondrial: qual é o fator central? 2018. Tese – Programa de Pós-Graduação em Bioquímica. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

A ausência de XPC, uma proteína canonicamente envolvida em reparo de DNA por excisão de nucleotídeos, está associada a vários fenótipos característicos de disfunção mitocondrial como o deseguilíbrio entre os complexos da cadeia transportadora de elétrons (CTE), redução no consumo de oxigênio, maior produção de peróxido de hidrogênio, e maior sensibilidade a agentes que causam estresse mitocondrial. Contudo, uma descrição mecanística da relação entre deficiência de XPC e disfunção mitocondrial ainda não está bem estabelecida. Aqui mostramos que a deficiência de XPC está associada ao aumento na expressão do supressor de tumor p53. Essa alteração é acompanhada pelo aumento da expressão de diversas proteínas que participam em importantes funções mitocondriais. A inibição de p53 reverte a superexpressão de algumas dessas proteínas. O tratamento com o inibidor do Complexo III da CTE antimicina A induz aumento da expressão de p53 de forma mais acentuada na linhagem Xpc<sup>-/-</sup>, enquanto o tratamento com o antioxidante N-acetilcisteína diminue a produção basal de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, expressão de p53 e sensibilidade aumentada ao tratamento com antimicina A. Em conjunto, nossos resultados suportam a hipótese de que o aumento da produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em células Xpc<sup>-/-</sup> tem um papel causal na regulação da expressão de p53 e na disfunção mitocondrial.

Palavras chave: XPC, p53, peróxido de hidrogênio, disfunção mitocondrial, sinalização redox

## ABSTRACT

Freire, T. S. XPC-p53-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> axis and mitochondrial disfunction: Which is the key player? 2018. Thesis - Graduate Program in Biochemistry. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Although XPC has been initially implicated in the nucleotide excision DNA repair pathway, its deficiency is associated with mitochondrial dysfunction, including unbalanced electron transport chain (ETC) activity, lower oxygen consumption, increased hydrogen peroxide production, and greater sensitivity to mitochondrial stress. However, a mechanistic understanding of the role of XPC in regulating mitochondrial function is still not well established. Here we show that XPC deficiency is associated with increased expression of the tumor suppressor p53, which is accompanied by increased expression of several proteins that participate in important mitochondrial functions. Inhibition of p53 reverses the overexpression of some of these proteins. In addition, treatment with the ETC inhibitor antimycin A induces p53 expression more robustly in the  $Xpc^{-/-}$  cells, while treatment with the antioxidant N-acetylcysteine decreases basal H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production, p53 expression and sensitivity to antimycin A treatment. Together, our results support a model in which increased H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production in  $Xpc^{-/-}$  causes upregulation of p53 expression and mitochondrial dysfunction.

**Keywords**: XPC, p53, hydrogen peroxide, mitochondrial disfunction, redox signaling.

# LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

## Α

AA	antimicina A
ADP	adenosina difosfato
AMP	adenosina monofosfato
AMPK	AMP-activated protein kinase
AP	Sítio apurínico/apirimídinico
APE1	AP endonuclease 1
APS	persulfato de amônio
ATM	ataxia-telangiectasia mutated
ATP	adenosina trifosfato

## В

BER	reparo por excisão de bases
BHD	domínio <i>β-hairpin</i>
BSA	soro albumina bovina

# С

CAK	cyclin-activated kinase
CAT	carboxiatractilosídeo
CASRN	Chemical Abstract Service Registration Number
CCCP	carbonil cianeto de 3-clorofenilahidrazona
cDNA	DNA complementar ao mRNA
CDK	cyclin-dependent kinase
COX	citocromo c oxidase
CPD	dímero de pirimidina ciclobutano

CSA	Cockayne syndrome complementation group A
CSB	Cockayne syndrome complementation group B
CTE	cadeia de transporte de elétrons

D

Δψ	potencial elétrico de membrana mitocondrial
DDB1	damage-specific DNA binding protein 1
DDB2	damage-specific DNA binding protein 2
DDR	sinalização de resposta á dano no DNA
DMEM	Dulbecco's modified eagle medium
DNA	ácido desoxirribonucleico
DNA-PK	DNA-activated protein kinase
DSB	quebra de fita dupla
DSBR	reparo de quebra de fita dupla
DTNB	ácido 5,5'-ditiobis(2-nitrobenzóico)
DTT	ditiotreitol

Ε

EDTA	ácido etilenodiaminotetraacético
ERCC1	excision repair cross complementation 1
ERCC2	excision repair cross complementation 2
ERCC3	excision repair cross complementation 3
ERCC4	excision repair cross complementation 4
ERCC5	excision repair cross complementation 5
ERCC6	excision repair cross complementation 6
ERCC8	excision repair cross complementation 8
EROs	espécies reativas de oxigênio

FAD	flavina adenina dinucleotídeo, forma oxidada
FADH2	flavina adenina dinucleotídeo, forma reduzida
Fe-S	ferro-enxofre
FMN	flavina mononucleotídeo

G

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

## Н

$H_2O_2$	peróxido de hidrogênio
HEPES	ácido 4-(2-hidroxietil)piperazina-1-etanosulfônico
HR	recombinação homóloga
HRP	peroxidase de rabanete

# I

%ISC índice de sobrevivência celular

# L

LIG1	DNA ligase 1
LIG3	DNA ligase 3

## Μ

MMR	reparo de pareamento errôneo
mRNA	RNA mensageiro

# mtDNA DNA mitocondrial

# Ν

NAC	N-acetilcisteína
NADH	nicotinamida adenina dinucleotídeo, forma reduzida
NADP+	nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato, forma oxidada
NADPH	nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato, forma reduzida
NER	reparo por excisão de nucleotídeos
NHEJ	junção de extremidades não-homólogas
NOX	NADPH oxidase
NRF1	nuclear respiratory factor 1

## 0

O <sub>2</sub>	oxigênio molecular
O <sup>2</sup> -•	radical ânion superóxido
OCR	taxa de consumo de O2
•OH	radical hidroxila
ОН	hidroxila
Oligo	oligomicina A
OXPHOS	fosforilação oxidativa

## Ρ

PAR	poli(ADP-ribose)
PARP1	poly (ADP-ribose) polymerase
PBS	solução salina tamponada com fosfato
PCNA	proliferation activated nuclear antigen
PCR	reação em cadeia da polimerase
Pol	DNA polimerase
POLH	DNA polimerase η

PPAR-α	peroxisome proliferator-activated receptor alpha
PGC1- α alpha	peroxisome proliferator-activated receptor gamma, coativator 1
PFT-α	prifitrina- α

R

RNA	ácido ribonucléico
RNA Pol	RNA polimerase
RPA	replication protein A
rRNA	RNA ribossômico
RT-qPCR	PCR quantitativa após reação de transcriptase reversa

# S

SBF	soro bovino fetal
SDH	succinato desidrogenase
SDHB	succinate dehydrogenase complex, subunit B, flavoprotein (Fp)
SDS	dodecil sulfato de sódio
SIRT1	sirtuin 1
SOD	superóxido dismutase
SSB	quebra de fita simples

# т

TBS	solução tampão Tris-salina
TBST	solução tampão Tris-salina-Tween
TC-NER	reparo acoplado à transcrição por excisão de nucleotídeos
TFAM	transcription factor A, mitochondrial
TFIIH	transcription factor IIH
TLS	síntese de DNA translesão
TMPD	N,N,N',N'-tetrametil-1,4-fenilenodiamino

# tRNA RNA transportador

# U

UbQ	ubiquinona
UbQ•	semiubiquinona
UbQH2	ubiquinol
UV	radiação ultravioleta

# Χ

XP	xeroderma pigmentoso
XPA	xeroderma pigmentosum complementation group A
XPB	xeroderma pigmentosum complementation group B
XPC	xeroderma pigmentosum complementation group C
XPD	xeroderma pigmentosum complementation group D
XPE	xeroderma pigmentosum complementation group E
XPF	xeroderma pigmentosum complementation group F
XPG	xeroderma pigmentosum complementation group G
XPV	xeroderma pigmentosum complementation group V

# SUMÁRIO

1.	INT	RODUÇÃO17
	1.1.	Mitocôndria e bioenergética17
	1.2.	Lesões e vias de reparo de DNA18
	1.3.	P53 e respostas a estresses celulares
	1.4.	ROS-p53 e metabolismo mitocondrial21
	1.5.	Função de XPC24
	1.6.	Estrutura de XPC25
	1.7.	Regulação de XPC27
	1.8.	Deficiência de XPC
	1.9.	XPC e estresse oxidativo
	1.10.	XPC e disfunção mitocondrial
2.	OB	JETIVO
	2.1 OI	ojetivos específicos
3.	MA	TERIAIS E MÉTODOS
	3.1.	Lista de reagentes
	3.2.	Cultura e linhagens celulares
	3.3.	Preparação dos extratos proteicos
	3.4.	Western blot
	3.5.	Citometria de fluxo
	3.6.	Quantificação de glutationa
	3.7.	Quantificação de peróxido de hidrogênio
	3.8.	Ensaio clonogênico
	3.9.	Analise estatística40
4.	RES	SULTADOS
	4.1. A DNA F	deficiência de XPC está associada ao aumento na expressão de p53 e PK <sub>cs</sub> 41
	4.2. D de mo	eficiência de XPC causa alteração na expressão de proteínas mitocondriais odo dependente de p5344
	4.3. T divisã	ratamento com antimicina A aumenta a expressão de p53 e induz parada de o celular e morte em células deficientes de XPC

4.4. Tratamento com o antioxidante N-acetilcisteína reverte fenótipos associados
à deficiência de XPC55
5. DISCUSSÃO
6. PERSPECTIVAS
7. CONCLUSÃO
9. BIBLIOGRAFIA
10. APÊNDICE
XPC-p53-H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> axis and mitochondrial dysfunction: Who is the key player?90
Abstract
Introduction
Materials and methods91
Results
XPC deficiency is associated with increased expression of p53 and DNA $PK_{cs}$
XPC deficiency causes alterations in mitochondrial proteins expression and p53 inhibition reverses some of these changes
Treatment with antimycin A increases p53 expression and induces cell division arrest and death in XPC deficient cells
Treatment with the antioxidant N-acetylcysteine decreased basal $H_2O_2$ production, p53 expression and sensitivity to antimycin A treatment in XPC-deficient cells
Discussion
Conclusion
References
Figure 1
Figure 2
Figure 3
Figure 4
Figure 5
Figure 6

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. Mitocôndria e bioenergética

A mitocôndria é uma organela encontrada nas células eucariontes e tem o diferencial em relação às demais organelas de conter seu próprio material genético, o DNA mitocondrial (mtDNA), que codifica 13 proteínas mitocondriais, 2 RNAs ribossomais (rRNAs) e 22 RNAs transportadores (tRNAs) (ANDERSON et al., 1981). A mitocôndria desempenha diversas funções celulares importantes tais como geração de ATP, termogênese adaptativa (AZZU; BRAND, 2010), homeostase de íons (CARDOSO; QUELICONI; KOWALTOWSKI, 2010), resposta imunológica (WEST; SHADEL; GHOSH, 2011), produção de espécies reativas de oxigênio (EROS) (MURPHY et al., 2011), e morte celular programada (apoptose) (SPENCER; SORGER, 2011). Dentre essas funções, a geração de ATP pela mitocôndria é a mais bem entendida. Sendo responsável pela maior parte da produção de energia nas células eucarióticas, a síntese de ATP na mitocôndria ocorre através de um aparato sofisticado de complexos proteicos que residem na membrana interna da mitocôndria. Nesses complexos, designados como complexo I (NADH-Q oxidoredutase), complexo Ш (Succinato-coenzima coenzima Q oxidoredutase), complexo III (Coenzima Q-citocromo c oxidoredutase), complexo IV (Citocromo c oxidase) e complexo V (ATP sintase), através de um processo coordenado elétrons provenientes do NADH e FADH<sub>2</sub> gerados no ciclo do ácido cítrico (ou ciclo de Krebs) provenientes da oxidação de acetilcoenzima A (intermediário chave do metabolismo energético) são transferidos sequencialmente de um complexo mitocondrial para outro. NADH fornece

elétrons ao complexo I e FADH<sub>2</sub> fornece elétrons ao complexo II, ambos complexos utilizam esses elétrons para redução da coenzima Q (ou ubiquinona que ao receber os elétrons passa para forma reduzida de ubiquinol). Da coenzima Q reduzida os elétrons são transferidos para complexo III que transfere os elétrons para o citocromo c, este transfere os elétrons ao complexo IV que termina o transporte reduzindo O<sub>2</sub> e gerando H<sub>2</sub>O como produto. Durante o transporte de elétrons pelos complexos I, III e IV, íons H<sup>+</sup> são transportados da matriz mitocondrial para a região intermembranas (região que fica entre a membrana interna e a membrana externa da mitocôndria) gerando um gradiente de prótons, de pH e um gradiente elétrico. A força próton motriz resultante desses gradientes é utilizada pelo complexo V que catalisa a síntese de ATP a partir de ADP e Pi (fosfato inorgânico) (SARASTE, 1999), o que permite o acoplamento do transporte de elétrons à síntese de ATP.

Anomalias nessas funções são denominadas de disfunções mitocôndrias e estão associadas à uma série de síndromes humanas específicas, identificadas coletivamente como doenças mitocondriais, e a várias doenças complexas como doença de Alzheimer (COSKUN et al., 2012), Parkinson (MCCOY; COOKSON, 2012), câncer (CAIRNS; HARRIS; MAK, 2011), doenças cardíacas (HOPPEL et al., 2009), diabetes (SLEIGH, 2011) e obesidade (TSENG; CYPESS; KAHN, 2010). Além disso, também se observa um declínio nas funções mitocondriais durante o processo natural de envelhecimento (SOUZA-PINTO; BOHR, 2002) (BISHOP; LU; YANKNER, 2010).

### 1.2. Lesões e vias de reparo de DNA

O DNA é constantemente lesado por agentes exógenos, provenientes do meio ambiente, e por agentes endógenos, provenientes de processos metabólicos celulares. Ocorrem milhares de lesões de natureza endógena ao DNA por dia por célula em um indivíduo (GEORGE VLATAKIS, LARS I. ANDERSSON, RALF MULLER, 1993). Essas lesões são, majoritariamente, do tipo hidrolíticas (depurinação, depirimidição e desaminação), oxidativas (8-oxoG, timina glicol, hidratos de citosina entre outras), além de reações não enzimáticas de metilação de bases (CADET et al., 2003). As fontes genotóxicas exógenas mais comuns são radiação UV, raios X, e agentes químicos como alquilantes e compostos heterocíclicos, entre outros (MULLAART et al., 1990).

Caso não adequadamente reparados, danos ao DNA podem ser processados durante a replicação causando mutações que podem levar a instabilidade genômica e ao desenvolvimento de doenças como câncer, ou morte celular, o que associado a doenças degenerativas.

Todos os organismos celulares desenvolveram sistemas de reparo para os diversos tipos de lesões, que evitam o acumulo e eventual encontro pela forquilha de replicação de lesões no DNA causados por diversas fontes todos os dias. Cada via de reparo de DNA apresenta um determinado grau de especificidade para as lesões que reconhecem e corrigem no DNA.

Erros no pareamento de bases, formando pares não-canônicos como guanina:timina ou guanina:guanina, ocorrem durante a replicação de DNA e são corrigidos pela via de reparo de bases mau pareadas (MMR do inglês *mismatch repair*) (KUNKEL; ERIE, 2005). Lesões oxidativas, quebras de fita simples e adutos de alquilação não volumosos são reparadas pela via de reparo por excisão de bases (BER) (MEMISOGLU; SAMSON, 2000). Quebras de dupla fita no DNA podem ser reparadas de forma livre de erros pela via de reparo por recombinação homóloga (HR) (SAN FILIPPO; SUNG; KLEIN, 2008),

ou de forma suscetível a erros pela via de junção de extremidades não homólogas (NHEJ) (LIEBER, 2011).

Lesões que causam distorções na estrutura tridimensional da dupla hélice de DNA, como as geradas pela radiação UV ou agentes que formam adutos volumosos de DNA, são reparadas pela via de reparo por excisão de nucleotídeos (NER) (FRIEDBERG, 2001). A proteína XPC, mutada em pacientes com xeroderma pigmentosum do grupo de complementação C, é um dos fatores de reconhecimento de lesões que participa dessa via, como apresentado adiante.

#### **1.3. P53 e respostas a estresses celulares**

Os seres vivos estão submetidos a um ambiente em constante mudança e sujeitos a diversos tipos de estresses. Os organismos evoluíram sistemas capazes de receber informações do ambiente ou de estresses celulares adquiridos e responder a essas informações de forma adaptativa, o que permite restaurar ou preservar a homeostase (o conjunto de processos químicos vitais) frente ao estresse. Para isso, as células empregam receptores (proteínas capazes de receber um sinal específico), propagadores (enzimas, como quinases por exemplo, que fazem o tráfico e amplificação da informação do seu locar de origem até o efetor) e os efetores (fatores de transcrições que incitam a resposta celular adequada) (COWAN, 2003).

A proteína p53 é um fator de transcrição, uma proteína que age no núcleo das células se ligando em regiões específicas do DNA, ativando ou reprimindo a expressão de genes específicos (WEI et al., 2006).

Em resposta a determinados estresses, p53 é capaz de modular diversas respostas celulares, tais como parada do ciclo celular e reparo de DNA,

controle de processos metabólicos e redox, senescência (parada definitiva da divisão celular) e apoptose (morte celular programada) (VOGELSTEIN; LANE; LEVINE, 2000). O tipo e a intensidade de estresse acometido pela célula são os determinantes da resposta mediada por p53, sendo que estresses brandos incitam respostas de natureza adaptativa (que resultam na recuperação das funções celulares) e estresses sevEROs respostas de natureza terminal (que resultam na eliminação da célula danificada).

O mecanismo pelo qual p53 consegue modular respostas diferentes sob estresses de natureza e intensidades diferentes é uma área de intensa pesquisa e com muitas perguntas ainda em investigação. Contudo, acredita-se que a modulação das respostas mediadas por p53 se dê através da integração de sinais pós-traducionais (fosforilações, acetilações e ubiquitinações de resíduos específicos que favorecem determinadas respostas e/ou determinam o grau de estabilidade da proteína). Dessa forma, estresses de natureza diferentes seriam traduzidos como modificações pós-traducionais diferentes em p53, que por sua vez modulariam o tipo de resposta dada nessa situação (GIACCIA; KASTAN, 1998).

## 1.4. EROs-p53 e metabolismo mitocondrial

O papel mais estudado de p53 é sua participação na via de resposta a danos no DNA. Quando uma célula é acometida por danos no DNA, p53 promove inicialmente uma parada do ciclo celular e a transcrição de proteínas de reparo de DNA. Essas repostas iniciais tem o objetivo de dar tempo para célula promover o reparo e depois seguir no ciclo celular, diminuindo a chance da forquilha de replicação encontrar o dano no DNA, o que diminui a probabilidade da lesão se tornar uma mutação. Caso a célula não seja capaz de reparar e nem tolerar o dano no DNA, p53 ativa a resposta de senescência, que consiste na parada definitiva da divisão celular, ou ativa a apoptose, a morte celular programada (VOGELSTEIN; LANE; LEVINE, 2000). Assim, o primeiro conjunto de respostas (parada do ciclo celular e transcrição de proteínas de reparo) tem por objetivo reestabelecer a homeostase da célula. Caso isso não seja alcançado, o segundo conjunto de respostas (senescência e apoptose) tem por objetivo preservar a homeostase do tecido no qual esta célula reside, livrando-o de uma célula que possivelmente se tornaria disfuncional.

Contudo, p53 também é capaz de responder a outros estímulos, além de dano no DNA. Um exemplo importante é o papel de p53 na regulação do metabolismo energético em células musculares.

É conhecido que durante o exercício células musculares passam a produzir mais EROs mitocondrial, devido ao aumento da demanda energética (BEJMA; JI, 1999). Por muitos anos se acreditou que o aumento da produção de EROs mitocondrial durante o exercício tivesse papel deletério e fosse o limitante da performance e função muscular (REID, 2008). Seguindo essa hipótese muitos estudos investigaram o emprego de antioxidantes, tais como tocoferol (vitamina E), ácido ascórbico (vitamina C), N-acetilcisteína (NAC), entre outros, com o objetivo de reduzir a produção de EROs mitocondrial e aumentar a performance. Esses estudos mostraram um cenário bem mais complexo, dado que o emprego de antioxidantes teve alguns resultados que mostraram benefícios, outros que não apresentaram efeito algum e ainda resultados que apresentaram efeito deletério à performance (BRAAKHUIS; HOPKINS, 2015). Além disso, estudos investigando as repostas fisiológicas adaptativas induzidas

22

pelo exercício, tais como aumento de sensibilidade à insulina, biogênese mitocondrial e aumento da expressão de enzimas envolvidas na homeostase redox, mostraram que essas respostas eram atenuadas pelo emprego de antioxidantes (PETERNELJ; COOMBES, 2011).

Esses resultados sugerem que EROs mitocondrial é um estímulo importante para as adaptações fisiológicas induzidas pelo exercício.

Durante o exercício o aumento da produção de EROs é capaz de ativar p53, que passa a agir tanto no núcleo quanto na matriz mitocondrial. No núcleo, p53 ativa a transcrição de proteínas necessárias para a atividade da cadeia transportadora de elétrons (CTE), nos processos de fusão e fissão mitocondrial e nos processos de autofagia e mitofagia. Na matriz mitocondrial p53 associase à DNA polimerase γ e ao fator de transcrição mitocondrial, Tfam, promovendo a proteção e manutenção do DNA mitocondrial (BARTLETT et al., 2014). Dessa forma, o conjunto de respostas de p53 garante aumento da produção de ATP mitocondrial necessário a sustentação do exercício e manutenção do conteúdo e função mitocondrial.

A capacidade adaptativa da via EROs-p53 e metabolismo mitocondrial é evidenciada no camundongo PolgA<sup>D257A/D257A</sup>, cuja mutação causa deficiência na atividade de revisão da DNA polimerase γ. A deficiência na atividade de revisão leva ao acúmulo de mutações no mtDNA e esse acúmulo acredita-se ser a causa primária do fenótipo progeróide apresentado por esse camundongo (TRIFUNOVIC; WREDENBERG; FALKENBERG, 2004). O mais surpreendente desse modelo é que, quando submetido a exercício de endurance, o camundongo PolgA<sup>D257A/D257A</sup> tem seu fenótipo completamente recuperado (SAFDAR et al., 2011).

23

O exercício de endurance é capaz de modular os níveis de produção de EROs mitocondrial que resulta na ativação de p53 que, no caso do camundongo PolgA<sup>D257A/D257A</sup>, tem seu efeito principal na mitocôndria em que é capaz de promover o reparo do mtDNA. O papel de p53 é crucial nessa reposta dado que o exercício é incapaz de promover o reparo do mtDNA, nem recuperar o fenótipo progeróide em camundongos PolgA<sup>D257A/D257A</sup> com *knockout* específico de p53 no músculo (SAFDAR et al., 2016).

#### 1.5. Função de XPC

XPC é uma proteína que foi incialmente identificada pela sua participação na via de reparo por excisão de nucleotídeos do genoma global (GG-NER, do inglês global genome nucleotide excision repair). A função canônica de XPC em GG-NER é o reconhecimento da distorção na dupla-hélice (SUGASAWA et al., 2002) e o recrutamento dos demais componentes da via NER que, através de várias etapas coordenadas, resulta na remoção e ressíntese de um segmento de DNA de cerca de 25-30 nucleotídeos ao redor da lesão original. O esquema exibido na Figura 1 apresenta as principais etapas da via NER. XPC, em conjunto com suas proteínas associadas CETN2 e RAD23B, participa da etapa de reconhecimento da lesão, ligando-se na região adjacente à lesão na fita oposta. Segue-se a etapa de desenovelamento do DNA que é conduzida pelas helicases XPB e XPD, que são componentes do fator de transcrição TFIIH. Na etapa de excisão, XPA liga e marca o local para o recrutamento das endonucleases XPG e XPF-ERCC1, que catalisam a clivagem 3' e 5' do sítio da lesão, resultando na excisão de um fragmento de 25-30 nucleotídeos. Na etapa final de síntese e ligação do DNA, a DNA polimerase resíntetiza o

fragmento de DNA excisado e a DNA ligase liga as pontas da fita de DNA corrigida. (YOKOI et al., 2000)(MARTEIJN et al., 2014).



Figura 1. Apresentação esquemática da via reparo do genoma global por excisão de nucleotídeos, identificando os principais componentes proteicos da via (adaptado de [Yokoi et al. 2000)(Marteijn et al. 2014])

## 1.6. Estrutura de XPC

O gene *Xpc* está localizado no cromossomo 3p25, contém 16 éxons e 15 íntrons (LEGERSKI et al., 1994) e é expresso como uma proteína monomérica de 125kDa (REARDON; MU; SANCAR, 1996). A estrutura de Rad4, ortólogo de XPC em levedura, é apresentada abaixo, no qual se identificam os domínios de ligação ao DNA; TGD (domínio homólogo a transglutaminase), BHD1, BHD2 e BHD3 (domínios *beta hairpin*) (**Figura 2**).



**Figura 2.** Representação esquemática da sequência primária de Rad4 identificando os domínios de ligação a DNA (adaptado de [Min and Pavletich 2007])

Rad4/XPC se liga à fita de DNA oposta a fita contendo a lesão, de 1 a 11 nucleotídeos de distância do sitio de lesão, através dos domínios TGD e BHD1, enquanto os domínios BHD2 e BHD3 ligam-se ao sitio adjacente à lesão. A **Figura 3** apresenta a estrutura do complexo Rad4/DNA ligado à uma sequência de DNA dupla hélice contendo um CPD, identificando os pontos de contato da proteína com o DNA.



**Figura 3.** Estrutura de Rad4 ligada a dupla fita de DNA (cinza) contendo dímero de timina (CPD) [adaptado de [Min and Pavletich 2007]. Os domínios de ligação ao DNA são identificados por cores diferentes.

Rad4/XPC insere uma estrutura  $\beta$  harpin na dupla fita que causa a quebra das interações de Watson-Crick na região onde se situa a lesão e leva ao giro dos dímEROs de timina (CPD) para o lado externo da dupla fita de DNA. Dessa forma, em oposição a um mecanismo de reconhecimento estrutura-específico, Rad4/XPC parece reconhecer lesões que causam desestabilização termodinâmica nas interações de Watson-Crick (MIN; PAVLETICH, 2007).

#### 1.7. Regulação de XPC

Vários fatores foram implicados na regulação transcricional de XPC, tanto de forma direta quanto indireta. Dentre eles estão as proteínas p53, que aumenta a expressão de XPC em resposta a danos no DNA; Nrf1, cuja deficiência causa diminuição na eficiência de reparo de CPDs, o que foi associado à menor expressão de XPC na linhagem deficiente; e HIF-α e AMPK, que promovem aumento na expressão de XPC após o tratamento com UVB. Por outro lado, o complexo E2F4-p130 liga-se a região promotora de XPC e impede sua transcrição. XPC também sofre regulação em nível pós-traducional, através de ubiquitinação que afeta tanto a estabilidade proteica quanto sua atividade de ligação ao DNA. A extensa literatura disponível sobre regulação transcricional e pós-traducional de XPC é revisada em (SHAH; HE, 2015).

#### 1.8. Deficiência de XPC

A deficiência de XPC impede o reconhecimento da lesão e o prosseguimento das etapas subsequentes da via de GG-NER, de forma que lesões que deveriam ser reparadas por essa via permanecem nas fitas de DNA até a fase S (síntese de DNA) do ciclo celular. Um exemplo importante de lesão relevante nesse contexto são os dímEROs de timina causados pela radiação UV presente na radiação solar. Durante a replicação do DNA, as DNA polimerases replicativas não são capazes de replicar a fita de DNA contendo o dímero de timina devido a impedimentos estéricos quanto à fita molde causados pela presença da lesão no sítio de ligação da DNA polimerase. Nessa situação, a maquinaria celular pode empregar um tipo especial de DNA polimerase de síntese translesão, capaz de prosseguir com a síntese usando DNA lesionado como molde. Contudo, esse tipo de DNA polimerase tem baixa fidelidade, levando a maior frequência de eventos mutacionais que podem acarretar na ativação e/ou repressão de genes importantes para o controle de crescimento e divisão celulares, etapa essa que se acredita ser a iniciadora da transformação maligna (MCCULLOCH et al., 2004).

Mutações em genes que codificam proteínas envolvidas em NER, incluindo XPC, causam uma doença chamada xeroderma pigmentoso, que se caracteriza pela intensa sensibilidade cutânea a radiação UV e frequência de desenvolvimento de cânceres de pele de mais de 1000 vezes a frequência observada na população geral (KRAEMER, 1998), o que está de acordo com sua função canônica no reparo de lesões causadas por UV.

### 1.9. XPC e estresse oxidativo

Os fenótipos clínicos mais evidentes da deficiência de XPC, sensibilidade à radiação ultravioleta e alto risco de desenvolvimento de câncer de pele, estão diretamente relacionados ao papel de XPC no reparo das lesões em DNA causadas pela radiação UV. Contudo, existem evidências experimentais de que a deficiência de XPC também confere sensibilidade a agentes que causam estresse oxidativo.

Estudos *in vitro* demonstraram a maior sensibilidade de células deficientes em XPC a oxidantes. Queratinócitos e fibroblastos primários provenientes de pacientes XP-C apresentaram hipersensibilidade a agentes oxidantes, com acúmulo de bases oxidadas após o tratamento com esses agentes, quando comparadas com células proficientes em XPC. A expressão da proteína XPC selvagem reverteu esses efeitos, estabelecendo uma relação mecanística entre eles (D'ERRICO et al., 2006).

Camundongos Xpc<sup>-/-</sup> apresentaram maior frequência de mutações em células dos pulmões em relação a camundongos Xpa<sup>-/-</sup>, deficientes em outra proteína essencial da via NER, e camundongos selvagens. Isso se traduziu em um aumento significativo nos casos de tumores de pulmão espontâneos em camundongos deficientes de XPC (Melis et al. 2008). Como o pulmão é um órgão que está em contato com uma pressão parcial de oxigênio de 20%, enquanto os demais tecidos internos estão sob uma pressão parcial de oxigênio de aproximadamente 3%, a hipótese é que as células deficientes em XPC sejam mais sensíveis a concentração atmosférica de O2. Em suporte a essa hipótese, fibroblastos embrionários de camundongos Xpc<sup>-/-</sup> apresentaram maior frequência de mutações do que fibroblastos Xpa<sup>-/-</sup> e selvagens quando cultivados em pressão parcial de O2 de 20%, mas não em pressão parcial de O<sub>2</sub> de 3%. Além disso, camundongos Xpc<sup>-/-</sup> tratados com os pró-oxidantes paraquat ou bis-(2-etilhexil)-fitalato (DEHP) apresentaram maior acúmulo de mutações ao longo do tempo quando comparados aos camundongos Xpa-/- e selvagem (Melis et al. 2013). O acúmulo lento de mutações no camundongo Xpc<sup>-/-</sup> está em acordo com o aparecimento tardio dos tumores de pulmão.

## 1.10. XPC e disfunção mitocondrial

A relação entre a deficiência de XPC e o fenótipo de disfunção mitocondrial ainda é pouco estudada e a literatura apresenta resultados contraditórios.

Disfunção mitocondrial é característica comum em processos neurodegenerativos; no entanto, esses fenótipos estão praticamente ausentes em pacientes XP-C. De fato, estudos utilizando ferramentas de bioinformática, comparando sintomas e características de doenças mitocondriais e doenças de

reparo de DNA, sugeriram haver um forte envolvimento mitocondrial no caso da deficiência de XPA, cujos pacientes apresentam severa neurodegeneração, mas não na deficiência de XPC. Ainda nesse estudo, o mesmo grupo mostrou que células com a expressão de XPC reduzida via siRNA-*knockdown* não apresentaram diferenças no potencial de membrana mitocondrial (MMP), número de mitocôndrias e produção de EROs mitocondrial (FANG et al., 2014). Por outro lado, estudo com amostras de pele e queratinócitos de camundongo *Xpc*<sup>-/-</sup> comparando animais jovens e idosos, demonstrou que a deficiência de XPC leva a um aumento na produção de EROs citoplasmáticas e mitocondriais, diminuição na expressão de subunidade dos complexos mitocôndrias I, II e III, além da diminuição na atividade do complexo IV, consumo de oxigênio e produção de ATP (HOSSEINI et al., 2015).

Estudos realizados pelo nosso grupo com fibroblastos humanos deficientes em XPC demonstraram que estas células apresentam maior produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> mitocondrial, menor atividade da enzima antioxidante glutationa peroxidase (GPx), menor atividade do complexo I e maior atividade do complexo II da cadeia transportadora de elétrons da mitocôndria; além de apresentar sensibilidade aumentada a compostos que causam estresse mitocondrial (MORI et al., 2017). Estes resultados suportam a hipótese de que a deficiência de XPC cause desequilíbrio mitocondrial. Por outro lado, nossos resultados demonstraram que XPC não se localiza em mitocôndrias, e não parece participar diretamente em reparo de DNA mitocondrial. Contudo, ainda falta um entendimento mecanístico de como a deficiência em XPC pode afetar a homeostase das funções mitocondriais.

30

## 2. OBJETIVO

Este estudo tem por objetivo investigar o papel de p53 e da sinalização mediada por  $H_2O_2$  nas alterações mitocondriais decorrentes da deficiência de XPC e na sensibilidade das células  $Xpc^{-/-}$  ao tratamento com agentes que causam estresse mitocondrial.

## 2.1 Objetivos específicos

-Determinar se expressão de p53 está alterada em células deficientes de XPC.
-Determinar se existe um papel de p53 no perfil de expressão de proteínas mitocondriais nas células deficientes de XPC.

-Determinar se H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> exerce algum papel na regulação dos níveis de p53.

-Determinar se H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> é fator determinante da sensibilidade das células deficientes de XPC ao tratamento com antimicina A.

## 3. MATERIAIS E MÉTODOS

### 3.1. Lista de reagentes

Ácido clorídrico 37% PA (CAS 7647-01-0), KCI [cloreto de potássio – CASRN 7447-40-7], NaCI [cloreto de sódio – CASRN 7647-14-5], etanol [CASRN 64-17-5], fosfato monobásico de potássio [KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> – CASRN 7778-77-0], fosfato monobásico de sódio [NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> – CASRN 10049-21-5], fosfato dibásico de sódio [Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> – CASRN 7558-79-4], KOH [hidróxido de potássio – CASRN 1310-58-3], NaOH [hidróxido de sódio – CASRN 1310-73-2], todos da Merck KGaA©. Etanol [CASRN 64-17-5] e metanol [CASRN 67-56-1] da Synth®.

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> [solução de peróxido de hidrogênio 30% (v/v) – CASRN 7722-84-1] da Calbiochem®.

Albumina [CASRN 9048-46-8], antimicina A [CASRN 1397-94-0], azul de bromofenol [3',3",5',5"-tetrabromofenolsulfoneftaleína – CASRN 115-39-9], NaHCO<sub>3</sub> [bicarbonato de sódio – CASRN 144-55-8], bis/acrilamida (1:37,5) [solução 40% (m/v) – CASRN 110-26-9 / CASRN 79-06-1], CaCl<sub>2</sub> em solução 1,0 M [cloreto de cálcio – CASRN 10043-52-4], MgCl<sub>2</sub> em solução 1,0 M [cloreto de magnésio – CASRN 7786-30-3], cristal violeta [CASRN 548-62-9], SDS [dodecil sulfato de sódio – CASRN 151- 59 21-3], DMSO [dimetilsulfóxido – CASRN 67-68-5], DTT [ditiotreitol ou *treo*-1,4-dimercapto-2,3-butanodiol – CASRN 3483-12-3], EDTA [ácido etilenodiaminotetraacético – CASRN 60-00-4], HPR [peroxidase de rabanete tipo VI-A – CASRN 9003-99-0], MgSO<sub>4</sub> em solução 1,0 M [sulfato de magnésio – CASRN 7487-88-9], Tween® 20 [CASRN 9005-64-5], Triton<sup>™</sup> X-100 [4-(1,1,3,3-tetrametilbutil)fenil-polietileno glicol – CASRN 9002-93-1], N-acetilcisteina (CASRN 38520-57-9) todos Sigma-Aldrich®.

Reagente de Bradford, solução de  $\gamma$ -globulina bovina (BGG) 2 mg/mL e TEMED [*N*,*N*,*N'*,*N'*-tetrametiletilenodiamina – CASRN 110-18-9] da Bio-Rad Laboratories©. Amplex® Red e RNase A da Life Technologies<sup>TM</sup>.

Garrafas de 25 e 75 cm², placas de cultura de 6, 24 e 96 poços e placas 22,1 e 60,1 cm² da TPP®. Placas de 150 cm² da Sarstedt AG & Co. Placas de 20,8 cm² para ensaio clonogênico da Nunc<sup>™</sup>.

Anticorpos primários para p(ser20)-p53 (sc-21872-R), MDM-2 (sc-965), DNA PK<sub>cs</sub> (sc-965), Ku70 (sc-365766), Tfam (sc-30963), PINK (sc33796), Mfn1(sc-50330), Mfn2 (sc-50331), VDAC1(sc-390996), todos da Santa Cruz Biotechnology. XPC(ab6264), Bax (ab32503), NDUFS3 (ab110246), UQCRC2 (ab14745), COX II (ab110258), Parkin (ab15954), todos da Abcam. SDHB e F1 $\alpha$  (*Complex II Western Blot Antibody Cocktail* #MS202) da MitoSciences. P53 (DAKO #M7001) e  $\beta$ -actin(#A2103), LC3(#L7543) da Sigma-Aldrich®.

Anticorpos secundários anti-*mouse* (LI-COR #92632210), anti-*rabbit* (LI-COR #926-68073) da LI-COR®.

## 3.2. Cultura e linhagens celulares

As linhagens celulares utilizadas foram fibroblastos humanos imortalizados (transformados com SV40) XP4-PA ( $Xpc^{-/-}$ ) (SARASIN; MUTAGENBE, 1987) e XP4-PA corrigida ( $Xpc^{+/+}$ ) (DUPUY et al., 2013). Ambas linhagens foram gentilmente cedidas pelo Prof. Dr. Carlos F. M. Meck, do Depto. de Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da USP. Todas as células foram mantidas em meio de cultura DMEM (Gibco®) alta concentração de glicose (4500 mg/L) suplementado com 10% de soro fetal bovino (FBS,

Gibco®), penicilina 100 IU/mL e estreptomicina 100 µg/mL (Gibco®), incubadas a 37 °C em atmosfera umidificada com pressão parcial de CO<sub>2</sub> de 5% (condições padrões). Quando as culturas celulares atingiam 80% de confluência eram repicadas, utilizando tripsina (0,25% em tampão salinafosfato (PBS), Gibco®) para dissociar as células das garrafas de cultura, resuspendidas em meio de cultura padrão e semeadas em uma nova garrafa de cultura, diluídas de acordo com a necessidade.

Nos experimentos envolvendo inibição de p53, pifitrina- $\alpha$  (PFT- $\alpha$ , Sigma-Aldrich) na concentração final de 30  $\mu$ M foi adicionada ao meio de cultura duas vezes por semana, por um total de 2 semanas de tratamento.

Nos experimentos envolvendo o tratamento com N-acetilcisteina (NAC, Sigma-Aldrich), as células foram cultivadas em meio de cultura suplementado com 10 mM de NAC por no mínimo 2 semanas e subcultivadas sempre que atingiam 80% de confluência.

#### 3.3. Preparação dos extratos proteicos

As células foram retiradas da garrafa, transferidas para tubos cônicos e centrifugadas a 1.000g por 10 minutos. Retirou-se o sobrenadante e adicionou PBS (NaCl 137 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 10 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,8 mM, KCl 2.7 mM, pH 7.4.). Foram centrifugadas novamente e o sobrenadante removido, restando apenas o precipitado celular, ao qual foi adicionado o tampão de lise (Tris-HCl 10 mM, pH 7.8, KCl 400 mM, EDTA 1 mM, DTT 1 mM, glicerol 20% (v/v), NP-40 0,1% (v/v), PMSF 0,25 mM, 1X coquetel inibidor de protease, Roche®), e incubado por 1 h e 30 min a 4 °C. O lisado foi sonicado cinco vezes em amplitude de 20% por 5 s em gelo, com intervalos de 30 s em processador ultrassônico VC505 Vibra-CellTM (Sonics®), e submetido à centrifugação a 16.000 g a 4 °C

por 10 min, para precipitar membranas e DNA contaminantes. O sobrenadante obtido foi considerado o extrato celular total. A concentração de proteínas foi analisada com o reagente de Bradford utilizando BGG (ambos BioRad®) para construção da curva-padrão.

## 3.4. Western blot

Os géis empregados, 12% poliacrilamida de 1,5 mm de espessura [12% bis/acrilamida (37,5/1), Tris-Cl 375 mM, pH 8,8, SDS 0,1%, APS (persulfato de amônio) 0,05% (m/v), TEMED (Tetrametiletilenodiamina) 0,05% (v/v)], foram preparados no sistema Mini-protean da BioRad®. Sobre o gel de corrida foi adicionada a porção de empilhamento [5% bis/acrilamida (37,5/1), Tris-HCl 125 mM, pH 6,8, SDS 0,1%, APS 0,075%, TEMED 0,075%]. As amostras foram dissolvidas em tampão 5X Laemmli (Tris-Cl 300 mM, pH 6,8, SDS 10%, glicerol 50%, β-mercaptoetanol 25%, azul de bromofenol 0,1 % (m/v)), incubadas a 95°C por 10 min e aplicadas ao gel. A eletroforese foi feita com tampão de corrida Novex® Tris-Glicina SDS (25 mM Tris, 192 mM glicina, 0.1% SDS, pH 8.3, Invitrogen®), em cuba Mini-Protean (BioRad®) a 125 V (~40 mA) por 1 h 15 min a temperatura ambiente (TA). As proteínas foram transferidas para uma membrana de PVDF (fluoreto de polivinilideno) ativada com metanol e equilibrada em tampão de transferência Novex® Tris-Glicina (25mM Tris, 190mM glicina, Invitrogen®) contendo 20% de metanol no módulo de transferência do Mini-Protean (BioRad®) a 120 V com corrente de ~250 mA durante 3-4 h a 4°C.

As membranas foram incubadas com solução 5% (m/v) de leite desnatado em pó em tampão Tris-Salina-Tween (TBST: Tris-Cl 20 mM, NaCl 150 mM, Tween® 20 0,05%, pH 7,4 – TBST) *overnight* a 4 °C ou por 1 h a temperatura

ambiente (TA). Em seguida as membranas foram lavadas duas vezes com TBST por 5 min a TA e incubadas de 1,5-2 h com o anticorpo primário diluído de 100-5.000 vezes (dependendo do anticorpo) em 1% Leite/TBST a TA (o tempo de incubação e a diluição do anticorpo variaram de acordo com o anticorpo utilizado). As membranas foram lavadas com TBST três vezes por 5 TA e então incubadas com o anticorpo secundário min a (para quimioluminescência ou fluorescência) correspondente diluído 5.000 vezes em 1% Leite/TBST de 1,5-2 h a TA. Enfim, foram realizadas lavagens seguenciais de 5, 10 e 15 min com TBST a TA. As membranas foram reveladas de acordo com o anticorpo secundário empregado. Para quimioluminescência foram utilizados 400 µL por membrana da mistura reacional de ECL Plus Western Blotting Detection System (Amersham<sup>™</sup>) por 5 min, no escuro, a TA, e expostas a filme fotográfico por tempos diferentes. Para fluorescência as membranas foram reveladas no aparelho Odyssey (LICOR®) no comprimento de onda que excita o fluoróforo associado ao anticorpo secundário utilizado no experimento (700 ou 800nm).

#### 3.5. Citometria de fluxo

Para esse experimento foram semeadas 1x10<sup>5</sup> células em placas de 6 poços (TPP), e tratadas ou não com diferentes concentrações de antimicina A (AA) por 4 horas em meio de cultura sem soro. Após esse tempo o meio de cultura foi retirado e as células lavadas com PBS. Ao final da lavagem o PBS foi removido e foi adicionado meio de cultura normal completo. Após 24 ou 48 horas de incubação (de acordo com o experimento) as células foram marcadas com lodeto de propídeo (PI, Sigma-Aldrish®) usando protocolo padrão e submetidas a análise no citômetro de fluxo Guava) PCA-96 System (Millipore).
Os resultados foram analisados com o software *Flowing Software 2.5.1* (Perttu Terho).

#### 3.6. Quantificação de glutationa

Dez milhões de células foram centrifugação a 200g por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado celular foi lavado com 300 µl de PBS e centrifuguado a 200g durante 10 minutos a 4°C. O sobrenadante descartado. Foi adicionado 80 µl de HCl 10 mM e as células foram lisadas congelando e descongelando duas vezes. Foi adicionado 20 µl de SSA (ácido 5-sulfosalicílico) a 5% e centrifugadas a 8.000g durante 10 minutos. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo e foi adicionado ddH2O (água duplamente deionizada) para reduzir a concentração de SSA para 0,5%. Essa foi a solução da amostra a ser quantificada utilizando o kit Glutathione Assay *Kit (Cayman Chemical),* utilizando os seguintes reagentes; tampão MES (0,2M) ácido 2-(N-morfolino)etanossulfônico, 0,5M fostato, 1mM EDTA, pH 6), solução padrão de glutationa oxidada (GSSG, 25µM), mistura de cofatores (pó liofilizado contendo NADP+ e glicose 6 fostato, dissolvido em 0,5 mL de água), mistura de enzimas (0,2 mL de solução contendo as enzimas glutationa redutase e glicose-6-fostato desidrogenase, dissolvido em 2 mL de tampão MES).

A curva padrão foi feita em placa de ELISA pipetando os padrões de acordo com a tabela abaixo:

Tube	GSSG Standard (μl)	MES Buffer (µl)	Final Concentration (µM GSSG)	Equivalent Total GSH (µM)*
А	0	500	0	0
В	5	495	0.25	0.5
С	10	490	0.5	1.0
D	20	480	1.0	2.0
E	40	460	2.0	4.0
F	80	420	4.0	8.0
G	120	380	6.0	12.0
н	160	340	8.0	16.0

Para leitura espectrofotométrica foi preparado o *cocktail* de ensaio (11,25 mL de tampão MES, 0,45 mL de mistura de cofatores, 2,1 de mistura de enzimas, 2,3 mL de água, 0,45 mL de DNTB). Foram adicionados a placa de ELISA 50 µL de amostra e 150 µL de *cocktail* de ensaio (em todos os poços, com amostra ou padrão). A placa foi incubada a 37 ° C por 25 minutos. A leitura de absorbância em 410 nm foi feita usando um leitor de microplacas. E a determinação da concentração de glutationa total (GSH + GSSG) na amostra foi determinada usando as curvas padrões de GSH e GSSG.

#### 3.7. Quantificação de peróxido de hidrogênio

A produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pelas células, medida pela conversão de Amplex® Red em resofurina catalisada por peroxidase de rabanete (HRP), foi monitorada espectrofluorimetricamente em leitor de microplaca SpectraMax 190 (Molecular Devices©). Primeiramente foi construído uma curva padrão utilizando concentrações conhecidas de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Para isso foi utilizado uma solução estoque de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (20 mM) com qual se preparou diluições de 0, 2, 4, 6, 8 e 10 μM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Para 50 μL de cada diluição foram adicionados 50 μL de solução PBS/Hank's (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 10 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,8 mM, pH 7,2, NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, CaCl<sub>2</sub> 1,3 mM, MgSO<sub>4</sub> 1,0 mM, NaHCO<sub>3</sub> 4,2 mM, D-glicose 1,0 g/L), contendo Amplex® Red (10 mM) e o HRP (10 U/ml) e a fluorescência foi monitorada em 530 nm para excitação e 590 nm para emissão após 30 minutos de reação. Os experimentos com células foram conduzidos a 37°C em PBS/Hank's.

Cinquenta µL de PBS/Hank's contendo de 1×10<sup>5</sup> células/ml foi adicionado nos poços de uma placa de fluorescência com fundo preto (SPL Life Sciences®). Após adição das células foi adicionado a cada poço 50 µL de solução PBS/Hank's contendo o Amplex® Red (10 mM) e o HRP (10 U/ml) com auxílio de uma micropipeta multicanal (Eppendorf®) e a fluorescência foi monitorada em 530 nm para excitação e 590 nm para emissão (no software SoftMax® Pro – Molecular Devices©). As medidas foram feitas nos tempos de 0, 30, 60 e 90 minutos, após a adição do Amplex® Red.

#### 3.8. Ensaio clonogênico

Para tratamento com antimicina A (AA), 500 células foram semeadas em placa de 6 poços (TPP) em triplicata, e incubadas durante 24 h em condições padrão. As células foram lavadas duas vezes com PBS e incubadas com AA a 0,25, 0,50, 1,0 e 2,0 uM em DMEM sem FBS durante 4 h. Depois disso, o meio contendo AA foi removido, as células foram lavadas com PBS e após a lavagem incubadas em meio completo em condições padrão durante 6 a 7 dias, até o aparecimento de colônias visíveis a olho nu. As colônias foram lavadas em PBS gelado, fixadas com etanol e coradas com solução violeta de cristal a 1% (m/v). A taxa de sobrevivência foi calculada como a proporção de número de colônias em condições tratadas sobre as não tratadas.

### 3.9. Analise estatística

Para as análises estatísticas foi usado o software GraphPad Prism 5 (GraphPad Software Inc). Os resultados são apresentados como média  $\pm$  desvio padrão (SD) de no mínimo 3 experiências independentes, realizados em duplicata ou triplicata. A ANOVA com regressão de Tukey foi utilizada na comparação de *Xpc*<sup>-/-</sup> e *Xpc*<sup>+/+</sup> tratadas ou não tratadas quando houve necessidade de se comparar mais de dois grupos de amostras, enquanto o teste t de *Student* foi utilizado para avaliar as diferenças entre dois grupos amostrais, considerando p <0,05 significativo.

#### 4. **RESULTADOS**

## 4.1. A deficiência de XPC está associada ao aumento na expressão de p53 e DNA PK<sub>cs</sub>

Os modelos utilizados para esse estudo foram fibroblastos humanos imortalizados XP4-PA ( $Xpc^{-/-}$ ) e XP4-PA corrigida ( $Xpc^{+/+}$ ), que teve o gene Xpc selvagem reintroduzido no mesmo lócus gênico (DUPUY et al., 2013). A mutação presente na linhagem XP4-PA,  $\Delta$ TG1744-5, resulta em instabilidade do mRNA e ausência de tradução. A correção em lócus com o gene selvagem restaura a expressão da proteína XPC na linhagem isogênica, como demonstrado na **Figura 4**.



**Figura 4.** Análise da expressão de XPC, através de western blotting, em extrato proteico total em quantidades crescentes de protéina de células XP4-PA ( $Xpc^{-/-}$ ) e XP4-PA corrigida ( $Xpc^{+/+}$ ). Anticorpo anti- $\beta$ -actina foi usado como controle de carregamento. A imagem apresentada é um resultado típico de dois experimentos independentes.

A deficiência em XPC na linhagem XP4PA é acompanhada por um aumento de aproximadamente 2.5 vezes na expressão de p53, quando comparada com a expressão na linhagem corrigida para a expressão de XPC (**Figura 5**).



**Figura 5.** Análise da expressão de p53 em linhagens isogênicas expressando ou não XPC. (A) Western blot de p53 do extrato proteico total de células XP4-PA (*Xpc*<sup>-/-</sup>) e XP4-PA corrigida (*Xpc*<sup>+/+</sup>).  $\beta$ -actina foi usado como controle de carregamento. (B) Expressão relativa de XPC, normalizada pela expressão de  $\beta$ -actina. Os dados apresentados representam média ± desvio padrão de N = 3 amostras independentes. Os valores de *p* (Student's *t* test) para cada comparação são apresentados na Figura.

O aumento de expressão de p53 é acompanhado por um aumento nos níveis de fosforilação da serina 20 de p53. Este tipo de fosforilação é conhecida por promover o aumento de estabilidade de p53 (CHEHAB et al., 1999) (**Figura 6 linha 1**). Por outro lado, não houve alteração nos níveis de MDM-2 principal fator da via de degradação de p53.

A linhagem  $Xpc^{-/-}$  também apresentou aumento na expressão de Bax, uma proteína mitocondrial que conhecidamente está sob o controle transcricional de p53 (TOSHIYUKI; REED, 1995) (**Figura 6 linha 2, painel B**), indicando que atividade transcricional de p53 também pode estar aumentada na linhagem  $Xpc^{-/-}$ .



**Figura 6**.(A) Western blot de p-(ser20)p53, Bax e MDM-2 do extrato proteico total de células XP4-PA (*Xpc<sup>-/-</sup>*) e XP4-PA corrigida (*Xpc<sup>+/+</sup>*). (B) Expressão relativa de Bax, normalizada pela expressão de  $\beta$ -actina. Os dados apresentados representam média ± desvio padrão de N = 3 amostras independentes. Os valores de *p* (Student's *t* test) para cada comparação são apresentados na Figura.

Dentre as proteínas que podem fosforilar p53 em resposta a estresses estão ATM (CANMAN, 1998), ATR (TIBBETTS et al., 1999) e DNA-PK (LEES-MILLER et al., 1992). Considerando que a inibição da expressão de XPC via shRNA levou ao aumento da expressão de DNA-PK (REZVANI et al., 2011), testamos a expressão desta na linhagem *Xpc<sup>-/-</sup>*. Em acordo com os resultados no modelo de *knockdown*, a expressão de sua subunidade catalítica DNA-PK<sub>cs</sub> está aumentada em mais de 2 vezes em células *Xpc<sup>-/-</sup>* comparada com a linhagem corrigida (**Figura 7**).



**Figura 7**. (A) Análise da expressão de DNA PK<sub>cs</sub> via western blot em extrato proteico total de células XP4-PA (*Xpc<sup>-/-</sup>*) e XP4-PA corrigida (*Xpc*<sup>+/+</sup>). (B) Expressão relativa de DNA PK<sub>cs</sub>, normalizada pela expressão de  $\beta$ -actina. Os valores apresentados representam média ± desvio padrão de N =3 amostras independentes. Os valores de *p* (Student's *t* test) para cada comparação são apresentados na Figura.

# 4.2. Deficiência de XPC causa alteração na expressão de proteínas mitocondriais de modo dependente de p53

Estudos anteriores do nosso grupo identificaram alterações na função mitocondrial em células deficientes em XPC, independente de uma função direta da proteína na mitocôndria. Com o objetivo de investigar a relação mecanística entre XPC e a função mitocondrial, quantificamos a expressão de algumas proteínas de importantes vias relacionadas a manutenção e função mitocondrial, tais como cadeia transportadora de elétrons (CTE), fusão mitocondrial e autofagia/mitofagia (**Figura 8**).



**Figura 8**. Análise da expressão de proteínas relacionadas a funções mitocondriais via western blot em extrato proteico total de células XP4-PA ( $Xpc^{-/-}$ ) e XP4-PA corrigida ( $Xpc^{+/+}$ ).  $\beta$ -actina foi usado como controle de carregamento.

Em relação à cadeia transportadora de elétrons, tiveram a expressão aumentada na linhagem *Xpc<sup>-,-</sup>* as subunidades SDHB (complexo II) e COXII (complexo IV) (**Figuras 9B e 9D** respectivamente). As proteínas NDUFS3 e UQCRC2, componentes dos complexos I e III respectivamente, não

apresentaram alterações na expressão dependente do status de XPC. Dentre as proteínas envolvidas nas vias de autofagia/mitofagia e fusão mitocondrial medidas (Parkin, Pink 1, LC3-I, LC3-II Mfn1 e Mfn2), apenas Parkin (NARENDRA et al., 2008) e Mfn2 (YOULE; VAN DER BLIEK, 2012) tiveram expressões alteradas na linhagem Xpc<sup>-/-</sup> (Figuras 9C e 9E suas respectivamente). A linhagem Xpc<sup>-/-</sup> também apresentou maior expressão de Tfam (Figura 9A). O fator de transcrição mitocondrial A (Tfam) é um componente estrutural essencial do nucleóide mitocondrial e que também controla a expressão de algumas subunidades da cadeia transportadora de elétrons, o número de cópias e a manutenção do mtDNA (GASPARI; LARSSON; GUSTAFSSON, 2004). A expressão de VDAC1, componente do canal iônico dependente de voltagem (voltage dependent anion channel) que participa no transporte de ATP, Ca<sup>2+</sup> e outros metabólitos entre o espaço intermembranas mitocondrial e o citosol, também está aumentada na ausência de XPC (Figura 9F). Evidências experimentais de vários grupos sugerem que VDAC seja um componente proteico do poro de transição de permeabilidade mitocondrial, que participa da liberação de fatores pró-apoptóticos e ativa morte celular programada em situações de estresse (SHOSHAN-BARMATZ et al., 2006)(TRINDADE et al., 2016).



**Figura 9**. Quantificação da expressão relativa das proteínas apresentadas na Figura 8, normalizada pela quantidade de  $\beta$ -actina. Os valores apresentados representam média  $\pm$  desvio padrão de N =3 amostras independentes. Os valores de *p* (Student's *t* test) para cada comparação são apresentados na Figura.

Uma vez que a expressão e fosforilação de p53 estão aumentadas em células deficientes em XPC, utilizamos o inibidor transcricional de p53 pifitrina-α (PFTα) (KOMAROV, 1999), para verificar sua participação na modulação da

47

expressão de proteínas mitocondriais. O tratamento da linhagem *Xpc*<sup>-/-</sup> com PFT-α reduziu a expressão das proteínas DNA PK<sub>cs</sub>, Tfam, SDHB e COX II (**Figuras 10 e 11**), indicando uma possível participação de p53 na regulação da expressão dessas proteínas.



**Figura 10**. Análise da expressão proteica, via Western blot, em extrato proteico total de células XP4-PA (*Xpc<sup>-/-</sup>*) tratadas ou não com pifitrina- $\alpha$  (PFT- $\alpha$ ), e XP4-PA corrigida (*Xpc*<sup>+/+</sup>). B-actina foi usado como controle de carregamento.



**Figura 11.** Quantificação da expressão relativa das proteínas apresentadas na Figura 10, normalizada pela quantidade de  $\beta$ -actina. Os valores apresentados representam média ± desvio padrão de N =3 amostras independentes (\*p<0.05; \*\*p<0.01; \*\*\*p<0.001).

# 4.3. Tratamento com antimicina A aumenta a expressão de p53 e induz parada de divisão celular e morte em células deficientes de XPC

Como relatado anteriormente, células  $Xpc^{-/-}$  são mais sensíveis ao tratamento com antimicina A, um inibidor do complexo III (REIF, 1952) que se liga ao sitio Qi da citocromo c redutase e inibe a oxidação da ubiquinona. Com isso, há produção de radicais ânion superóxido, provavelmente via oxidação da ubisemiquinona (Dröse & Brandt, 2008). Assim, a citotoxicidade de antimicina A é atribuída ao estresse oxidativo mitocondrial decorrente da produção de superóxido e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Aqui mostramos que o tratamento com antimicina A provoca aumento na expressão de p53 em ambas linhagens  $Xpc^{-/-}$  e  $Xpc^{+/+}$ . No entanto, o nível proteico total de p53 atinge valor maior na linhagem  $Xpc^{-/-}$  após o tratamento com antimicina A (**Figuras 12**).



**Figura 12.** (A) Western blot de p53 do extrato proteico total de células XP4-PA ( $Xpc^{-/}$ ) e XP4-PA corrigida ( $Xpc^{+/+}$ ) tratadas com 1µM de antimicina A (AA 1µM) e analisadas 48 horas após o tratamento. B-actina foi usado como controle de carregamento. (B) A quantificação dos resultados obtidos em (A) é dada pela média ± desvio padrão de N =3 amostras independentes (\*p<0.05; \*\*p<0.01).

A indução de p53 em reposta a estresses é fundamental nas respostas celulares decorrentes, incluindo a parada do ciclo e morte celular programada (KRUISWIJK; LABUSCHAGNE; VOUSDEN, 2015). Assim, investigamos se algumas dessas respostas dependentes de p53 poderiam estar presentes mediando a hipersensibilidade das células  $Xpc^{-/-}$  ao tratamento com antimicina A. A análise do ciclo celular após o tratamento com antimicina A mostrou que tanto células  $Xpc^{+/+}$  quanto  $Xpc^{-/-}$  expostas a 1µM de antimicina A apresentam parada do ciclo celular em G1 24 horas após o tratamento, mas retomam o perfil normal do ciclo celular 48 horas após o tratamento, indicando que a

sinalização de resposta ao estresse cessou. Contudo, células *Xpc<sup>-/-</sup>* expostas a 2µM AA ainda apresentam bloqueio da progressão do ciclo celular em S/G2 após 48 horas enquanto as células complementadas estão retornando a distribuição normal nesse intervalo (**Figura 13**).



Conteúdo de DNA

В



**Figura 13.** (A) Perfil do ciclo celular, em escala linear, correspondente a > 20.000 eventos, de células XP4PA e XP4PA corrigidas, tratadas com 1 ou  $2\mu$ M AA e analisadas nos tempos indicados após o tratamento. (B) Quantificação dos resultados apresentados em A. Para cada amostra, os resultados representam média de N = 3 amostras independentes.

A análise da população sub-G1, que é um indicativo de morte celular apoptótica, nas células expostas a 2µM AA 48 horas após o tratamento mostrou que a linhagem  $Xpc^{-/-}$  apresentou cerca de 3 vezes mais morte celular do que a linhagem corrigida (**Figuras 14**). Conjuntamente, esses resultados indicam que a linhagem  $Xpc^{-/-}$  sofre bloqueio do ciclo celular em S/G2 após o tratamento com antimicina A, e que essas células são mais susceptíveis a indução de morte celular nessas condições. Assim, é possível que essas respostas medeiem a maior sensibilidade a AA apresentada por essa linhagem.



**Figura 141.** (A) Perfil do ciclo celular, em escala logarítmica correspondente a > 20.000 eventos, de células XP4PA e XP4PA corrigidas, tratadas com 2µM AA e analisadas no tempo indicado após o tratamento. (B) Quantificação dos resultados apresentados em A. Para cada amostra, os resultados representam média ± desvio padrão de N =3 amostras independentes (AA: antimicina A; \*\*\*p<0.001).

.

# 4.4. Tratamento com o antioxidante N-acetilcisteína reverte fenótipos associados à deficiência de XPC

Já é conhecido que o tratamento com antimicina A aumenta a produção mitocondrial de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (BOVERIS; CHANCE, 1973). E que o tratamento com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> aumenta a expressão e atividade de p53 (CHEN et al., 1998). Assim, levantamos a hipótese de que a sensibilidade aumentada a AA das células  $Xpc^{-/-}$  poderia estar ocorrendo via sinalização redox mediada por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Afim de investigar o possível papel de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, a linhagem  $Xpc^{-/-}$  foi cultivada em meio suplementado com o antioxidante N-acetilcisteína (NAC) (ARUOMA et al., 1989), e analisadas após um mínimo de duas semanas de tratamento. Esse período de tratamento foi suficiente para elevar os níveis de glutationa nas células tratadas com NAC (**Figura 15**).



**Figura 15**. Quantificação de glutationa. Os valores apresentados representam média ± desvio padrão de N =3 amostras independentes. Os valores de p (Student's t test) para comparação está apresentado na Figura.

Células *Xpc<sup>-/-</sup>* crescidas na presença de NAC apresentaram menor produção basal de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> quando comparadas com células mantidas na ausência deste. A

diminuição na taxa de produção basal de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> foi de aproximadamente 36%, de uma taxa de 7,098 nM/minuto das células *Xpc<sup>-/-</sup>* crescidas na ausência de NAC para uma taxa de 4,514 em células mantidas na presença desse (**Figura 16**).



**Figura 16.** Medida da taxa de produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em células  $Xpc^{-/-}$  crescidas na ausência ou presença de 10 mM NAC.: coeficiente angular 7,098 ± 0,1147 nM/min (r<sup>2</sup>=0,9985),  $Xpc^{-/-}$  NAC: coeficiente angular 4,514 ± 0,1319 nM/min (r<sup>2</sup>=0,9953). (\*p<0.05)

A diminuição na produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> foi acompanhada pela diminuição na expressão de p53, nas mesmas condições experimentais (**Figuras 17)**.



**Figura 17.** (A) Análise da expressão de p53 via western blot do extrato proteico total de células XP4-PA ( $Xpc^{-/-}$ ) crescidas ou não na presença de 10 mM NAC. (B) Quantificação da expressão relativa das proteínas apresentadas em A, normalizada pela quantidade de  $\beta$ -actina, usada como controle de carregamento. Os valores apresentados representam média ± desvio padrão de N =3 amostras independentes. O valor de *p* (Student's *t* test) para comparação é apresentado na Figura.

Uma vez que a citoxicidade de AA é atribuída à geração de espécies oxidantes, investigamos o efeito da suplementação com NAC na sensibilidade de células  $Xpc^{-/-}$  ao tratamento com AA. Analise por citometria de fluxo para avaliar a indução de morte celular mostrou uma diminuição significativa na população sub-G1 em células  $Xpc^{-/-}$  mantidas em presença de NAC em relação as células não suplementadas (**Figuras 18**).



**Figura 18.** (A) Analise da população sub-G1 em células XPC<sup>-/-</sup>, suplementadas ou não com 10 mM NAC, 48 h após o tratamento com AA. Perfil do ciclo celular em escala logarítmica correspondente a > 20.000 eventos determinado por citometria de fluxo. (B) Quantificação da população sub-G1 das analises apresentadas em A. Os dados apresentados representam média ± desvio padrão de N = 3 amostras independentes. (\*\*\*p<0.001)

A deficiência em XPC causa significativo aumento de morte celular, medida pela perda da capacidade clonogênica das células, após o tratamento com AA; efeito que foi completamente revertido na linhagem corrigida para a expressão de XPC (Mori et al., 2017). Assim, considerando que a produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e a expressão de p53, que são alterados na linhagem  $Xpc^{-/-}$  de modo XPC-dependente, são revertidos nas células suplementadas com NAC, avaliamos a capacidade clonogênica das células  $Xpc^{-/-}$  suplementadas ou não após o tratamento com AA. A suplementação com NAC reverteu a sensibilidade aumentada observada na linhagem  $Xpc^{-/-}$ , retornando os níveis de sobrevivência aos níveis observados em células corrigidas (**Figura 19**). Juntos, esses resultados suportam a hipótese de que uma via de sinalização redox mediada por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> atua na linhagem  $Xpc^{-/-}$  mediando a expressão de p53 e a sensibilidade a antimicina A.



**Figura 19.** Curva de sobrevivência. Os dados apresentados representam média  $\pm$  desvio padrão de N = 3 amostras independentes. (\*p<0.05).

### 5. DISCUSSÃO

A função canônica de XPC, o reconhecimento de lesões que causam distorções na estrutura física do DNA, na via de reparo por excisão de nucleotídeos do genoma global (GG-NER), já foi amplamente estudada e suas implicações na gênese do câncer de pele estão bem estabelecidas. Contudo, alguns fenótipos encontrados em camundongos, pacientes e células XP-C não estão diretamente relacionados ao papel de XPC na via GG-NER, implicando a possível participação de XPC em outras funções celulares (NEMZOW et al., 2015).

Nosso grupo e outros já relataram alterações mitocondriais em diferentes modelos celulares deficientes em XPC. Como não há evidências de que XPC exerça seu papel diretamente na mitocôndria, uma vez que a proteína não é detectada na organela (Mori et al., 2017), a hipótese mais plausível seria a de que esta atue, direta ou indiretamente, sobre algum fator, por exemplo, um fator de transcrição, que exerça papel importante na regulação das atividades mitocondriais.

Neste trabalho, investigamos a possível participação do fator de transcrição e supressor de tumor p53 nas alterações mitocondriais induzidas pela deficiência de XPC. A proteína p53 é um candidato natural devido ao seu amplo papel na manutenção da homeostase celular em resposta ao estresse. Quando estabilizado em resposta a lesões em DNA, p53 é capaz de ativar as vias de respostas ao dano no DNA que podem levar a parada do ciclo celular, reparo de DNA, senescência e morte celular programada; p53 também tem papel

central na homeostase das funções metabólicas e em condições de estresse moderado atua regulando a biogênese e funções mitocondriais e processos redox (KRUISWIJK; LABUSCHAGNE; VOUSDEN, 2015).

Já é conhecido a algum tempo que, em resposta a danos no DNA, p53 é capaz de promover a expressão de XPC (ADIMOOLAM; FORD, 2002). Entretanto, apenas recentemente XPC foi implicado na regulação negativa de p53, participando na sua degradação mediada por MDM2 (KRZESZINSKI et al., 2014). Esses resultados sugerem existir uma alça de retroalimentação negativa na qual, em condições de estresse, p53 ativa a expressão de XPC e após o reparo da lesão, XPC promove a degradação de p53.

Com base no que foi mencionado acima, levantamos a hipótese de que o fenótipo mitocondrial apresentando pelas células *Xpc*<sup>-/-</sup> poderia, em parte, ser controlado pelos níveis de p53, que estão comprometidos pela ausência de XPC.

Em suporte a essa hipótese, neste trabalho reportamos resultados que sugerem a participação de p53 na alteração no perfil de expressão proteica de importantes fatores mitocondriais observado em células *Xpc*<sup>-/-</sup>.

Primeiro mostramos que as células *Xpc*<sup>-/-</sup> apresentam níveis proteicos maiores de p53 (**Figura 5**) e Bax (**Figura 6A**, **linha 2**) quando comparadas com uma linhagem isogênica corrigida para a expressão de XPC selvagem, indicando que a expressão de p53 nessas condições se correlaciona com a expressão de proteínas que estão sob seu controle transcricional. Esse aumento nos níveis proteicos de p53 não decorre de uma diminuição na expressão de MDM2 (**Figura 6A, linha 3**), a E-3 ubiquitina ligase responsável por ubiquitinar e promover a degradação de p53 via proteossomo, sugerindo que o aumento de

expressão de p53 pode ser atribuído a outro mecanismo de estabilização da proteína. De acordo com essa hipótese, a linhagem *Xpc<sup>-/-</sup>* apresentou maior conteúdo de fosforilação na serina 20 de p53 (**Figura 6A, linha 1**), modificação pós-traducional associada ao aumento de estabilidade proteica independente da via de MDM2 (CHEHAB et al., 1999).

A estabilização e ativação de p53 via fosforilação podem ser mediadas pelas proteínas sensoras de danos no DNA ATM, ATR e DNA-PK, ou fatores a jusante ativados por essas quinases (VOGELSTEIN; LANE; LEVINE, 2000). Dentre essas quinases, encontramos níveis proteicos muitas vezes aumentados de DNA PK<sub>cs</sub> (**Figura 7**), a subunidade catalítica da DNA-PK, na linhagem *Xpc<sup>-/-</sup>*. Já é conhecido que DNA-PK pode participar na estabilização de p53 em condições de estresse (MAYO; TURCHI; BERBERICH, 1997). Portanto, é possível especular que haja um papel de DNA-PK na estabilização/ativação de p53. Contudo, essa relação talvez não seja unilateral, dado que a inibição de p53, via utilização do inibidor pifitrina-α, na linhagem *Xpc<sup>-/-</sup>* foi capaz de reverter o aumento na expressão de DNA PK<sub>cs</sub> (**Figura 10, linha 1 e Figura 11A**). Assim, é possível sugerir uma alça de retroalimentação positiva na qual p53 promove a expressão de DNA PK<sub>cs</sub> e esta promove a estabilização de p53.

A proteína p53 também participa na regulação da biogênese e funções mitocondriais (KRUISWIJK; LABUSCHAGNE; VOUSDEN, 2015). Assim passamos a investigar possíveis fatores que pudessem ser regulados por p53 e que pudessem explicar o fenótipo mitocondrial da célula *Xpc*<sup>-/-</sup>.

A linhagem *Xpc<sup>-/-</sup>* apresentou expressão diferencial de diversas proteínas que apresentam importantes funções mitocondriais. Dentre elas estão Tfam, SDHB,

COX II, Parkin, Mfn2 e VDAC1(Figura 8 e Figura 9), sendo que já existem evidências experimentais que essas proteínas podem ter sua expressão regulada por p53. Por exemplo, foi demonstrado que p53 pode ser fator determinante para expressão de Tfam e para o conteúdo de mtDNA (PARK et al., 2009). Além disso, p53 está envolvido na regulação da fosforilação oxidativa (OXPHOS) via modulação na atividade dos complexos I e IV da cadeia transportadora de elétrons (MADDOCKS; VOUSDEN, 2011) e a ausência de p53 funcional está associada a uma diminuição na atividade do complexo IV (Satoaki *et al.* 2006). Esta diminuição é atribuída à regulação transcricional e pós-transcricional exercida por p53 sobre as subunidades I e II do complexo IV (ZHOU; KACHHAP; SINGH, 2003). P53 também já foi implicado na promoção da expressão de Mfn2 (WANG et al., 2010) e na promoção da expressão de Parkin, sendo que nessa situação Parkin contra interage o efeito Warburg inibindo a via glicolítica (ZHANG et al., 2011).

Demonstramos aqui que a inibição transcricional de p53 na linhagem *Xpc*-, através do tratamento com pifitrina-α, foi capaz de diminuir a expressão de Tfam, SDHB e COX II (**Figura 10 e Figura 11**). Assim, tanto os dados da literatura quanto os apresentados aqui suportam a hipótese de que p53 tenha um papel na regulação da expressão de fatores mitocondriais na linhagem *Xpc*-, Em tese, essa regulação parece ser adaptativa uma vez que p53 promove a regulação de proteínas dedicadas a homeostase das funções mitocondriais. Nesse contexto, é importante ressaltar que Tfam, além de ser um importante fator para transcrição e replicação do mtDNA, também parece exercer função semelhante a histonas, empacotando o mtDNA e potencialmente o protegendo do ataque de espécies reativas (KANG; KIM; HAMASAKI, 2007).

Nós demonstramos anteriormente que a linhagem  $Xpc^{-/-}$  apresenta uma diminuição na atividade do complexo I que, no entanto, é acompanhada por um aumento na atividade do complexo II, mediado em parte pela expressão aumentada de SDHB (subunidade do complexo II) (Mori et al., 2017). Essa compensação metabólica é suficiente para que a respiração basal não esteja alterada na linhagem  $Xpc^{-/-}$ , o que deve manter a produção de ATP. Assim, o aumento de expressão de SDHB, mediado por p53, tem um caráter adaptativo, que colabora para manter a homeostase energética da célula na ausência de  $Xpc^{-/-}$ .

Contudo, a ativação crônica de p53 decorrente da sinalização iniciada pela ausência de XPC funcional poderia também sensibilizar as células *Xpc<sup>-/-</sup>*, uma vez que os altos níveis proteicos de p53 nessa linhagem poderiam facilitar as respostas de senescência e apoptose em resposta a estresses adicionais.

A maior sensibilidade das células  $Xpc^{-/-}$  a agentes que causam estresse mitocondrial tornam esses compostos importantes ferramentas para o estudo mecanístico do fenótipo de disfunção mitocondrial dessas células. Em estudo anterior, mostramos que as células  $Xpc^{-/-}$  tem sobrevivência reduzida em relação a células  $Xpc^{+/+}$  quando tratadas com antimicina A. Aqui mostramos que o tratamento com antimicina A aumenta a expressão de p53 em ambas linhagens (**Figura 12**), sendo que o aumento de expressão na linhagem  $Xpc^{-/-}$ chega a 4.5 vezes a expressão basal da linhagem  $Xpc^{+/+}$  (**Figura 12B**). Além disso, o tratamento com 2µM de antimicina A induziu bloqueio do ciclo celular (**Figura 13**) e aumento da população sub-G1 (indicativo de morte celular apoptótica) mais pronunciadamente na linhagem  $Xpc^{-/-}$  (**Figura 14**). Resultados semelhantes foram encontrados em um estudo realizado por Kulawiec e colaboradores, no qual foram investigados os efeitos de inibidores da cadeia transportadora de elétrons (incluindo AA) em células  $p53^{+/+}$  e  $p53^{-/-}$  (KULAWIEC; AYYASAMY; SINGH, 2009). Nesse estudo foi mostrado que, após tratamentos com altas doses de antimicina A (2.5, 5.0 e 10.0 µM), as células  $p53^{+/+}$  apresentaram parada do ciclo celular nas fases S e/ou G2 em tempos de 1, 2, 4 e 6 horas após o tratamento, enquanto não houve alterações significativas no perfil do ciclo celular das células  $p53^{+/-}$  nesse período. Os autores levantaram a hipótese de que os efeitos dos inibidores eram mediados via produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> mitocondrial dependente de p53. Além disso, já é conhecido que o tratamento com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> aumenta a produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pela mitocôndria. Dessa forma, é possível especular que o aumento de expressão de p53 que observamos após o tratamento com antimicina A poderia ser mediada via produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> mitocondrial induzida pela antimicina A.

Diante desses resultados e do fato das células *Xpc*<sup>-/-</sup> serem mais sensíveis a agentes oxidantes (D'Errico et al., 2006; MELIS et al., 2011; Mori et al., 2017), levantamos a hipótese de que alterações na sinalização redox, mediada pela produção aumentada de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, poderiam estar envolvidas nos fenótipos observados na linhagem *Xpc*<sup>-/-</sup>. Nesse modelo haveria duas fases. Na primeira fase (iniciação), a ausência de XPC poderia comprometer a homeostase dos níveis proteicos de p53, como foi demonstrado anteriormente sobre o papel de XPC na degradação de p53 (KRZESZINSKI et al., 2014), dessa forma aumentando a atividade transcricional de p53, o que modularia as funções mitocondriais. Esse rearranjo transcricional inicial poderia, então, levar a um

leve aumento na produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, resultando em alteração crônica na sinalização redox. Na segunda fase (manutenção), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> atingiria um nível crítico capaz agir estabilizando e ativando p53 que nessa fase poderia atuar tanto no núcleo quanto na mitocôndria no sentido de proteger a célula do estresse causado pelo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Além disso, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> poderia ativar outros fatores, diretamente ou via danos ao DNA, e regular sua própria produção de forma a manter uma alça de retroalimentação positiva (**Figura 20**). Esse modelo utiliza o fato de p53 ser capaz de agir tanto como pró-oxidante, promovendo a expressão de genes que incitam a geração de EROs, quanto antioxidante, promovendo a expressão de genes que ainda não estão muito claros, mas que se acredita ser influenciado pela magnitude do estresse acometido pela célula (CHEN et al., 2018). Vale lembrar também que ATM, uma das principais quinases efetoras da via de resposta a danos no DNA (GUO; DESHPANDE; PAULL, 2010).



Figura 20. Modelo proposto para a interação funcional entre H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e p53 nas respostas celulares à ausência de XPC

Dessa forma, a geração mitocondrial de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> poderia ter papel causal no aumento da expressão de p53 e na manutenção de sua ativação crônica e, possivelmente, nos demais fenótipos apresentados nessa linhagem.

A suplementação de células  $Xpc^{-/-}$  com o antioxidante NAC foi capaz de aumentar a concentração de glutationa (**Figura 15**), reduzir a produção basal de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (**Figura 16**), bem como a expressão de p53 (**Figura 17**). Paralelamente, observamos nessas condições uma diminuição na população sub-G1 (**Figura 18**) e recuperação no perfil de sobrevivência das células  $Xpc^{-/-}$  quando tratadas com AA (**Figura 19**). Juntos, esses resultados dão suporte experimental à hipótese de que alterações na produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> têm papel causal na estabilização de p53 e na sensibilidade das células  $Xpc^{-/-}$  ao tratamento com antimicina A.

Vale destacar que, nesse contexto, em que o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> parece controlar a expressão de p53 e a expressão aumentada de p53 causa alterações na função mitocondrial que podem resultar em aumento da produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (etapa inicial apresentada em nosso modelo, **Figura 20**), é difícil determinar qual evento é fundamental e inicial, dado que ambos aparecem juntos em diversas condições.

Sahin e colaboradores mostraram que disfunção telomérica causa aumento na atividade transcricional de p53, que inibe a expressão de PGC-1 $\alpha$  e PGC-1 $\beta$  causando alterações mitocondriais (SAHIN et al., 2011). O mais interessante a respeito desses resultados é que algumas das alterações observadas estão presentes em nosso modelo, tais como aumento da produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> mitocondrial, diminuição na expressão de PGC-1 $\alpha$  e PPAR $\alpha$ , diminuição na atividade da glutationa peroxidase e do complexo I (Mori et al. 2017). Ainda relacionado a homeostase dos telômeros, já foi mostrado que células de camundongos *Xpc<sup>-/-</sup> Terc*<sup>+/+</sup> apresentam um aumento dramático no número de telômeros com múltiplos sinais teloméricos (MTS), que curiosamente é

exacerbado em células  $Xpc^{-/-}F1-F2$  Terc<sup>-/-</sup>, sugerindo aumento na instabilidade cromossômica dessas células (STOUT; BLASCO, 2013). MTS estão relacionados a problemas de replicação de DNA na região dos telômeros (MARTÍNEZ et al., 2009)·(SFEIR et al., 2009). Assim, esses resultados sugerem que as células  $Xpc^{-/-}$  experimentam dificuldade na replicação de DNA telomérico, mesmo na ausência de danos no DNA induzidos por agentes exógenos. Por outro lado, células  $Xpc^{-/-}$  mantidas em pressão parcial de 3% de O<sub>2</sub> mostraram uma redução significativa no número médio de MTS por cromossomo, até níveis equivalentes a células  $Xpc^{+/+}$ , sugerindo que os MTS em células  $Xpc^{-/-}$  são, pelo menos em parte, causados por uma maior sensibilidade dessas células ao O<sub>2</sub>. Dado que já foi mostrado que a concentração de O<sub>2</sub> é fator importante para geração de EROs (KITAGAWA et al., 2004) é possível especular, mais uma vez, que H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> tenha papel importante nesse fenótipo atribuído a deficiência de XPC.

### 6. PERSPECTIVAS

Em face dos resultados do nosso modelo que identificam H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> como fator central no desencadeamento do fenótipo da célula deficiente de XPC, o próximo passo importante é determinar a origem de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Nesse sentido suspeitamos que a origem do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> seja no complexo III e ocorra devido ao aumento de atividade do complexo II. Fenótipo semelhante foi descrito em um estudo que investigou os mecanismos bioquímicos em cardiomiócitos que levam a falência ventricular direita. Nesse estudo, os autores mostraram que o desenvolvimento da falência ventricular direita era associada com o aumento de capacidade da mitocôndria de produzir espécies oxidantes e que esse

aumento era resultado do aumento de expressão proteica de SDHB que levava a maior atividade do complexo II e dos níveis de coenzima Q reduzida. E consequentemente esse aumento de coenzima Q reduzida induzia maior geração de radical ânion superóxido no complexo III (REDOUT et al., 2007).

Outra pergunta que vale a pena ser investigada é se H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> tem algum papel na sensibilidade aumentada das células *Xpc*-/- ao tratamento com radiação UV. Até então, essa sensibilidade é atribuída exclusivamente à incapacidade das células *Xpc*-/- em reparar as lesões causadas pela radiação UV. Se o tratamento com NAC ou outros antioxidantes proporcionar alguma resistência nessas células isso indicaria que parte da sensibilidade decorre de alterações metabólicas associadas ao papel, não canônico, de XPC em outras vias bioquímicas e não apenas de seu papel, canônico, no reparo de lesões causadas pela radiação UV pela via de reparo de excisão de nucleotídeos.

### 7. CONCLUSÃO

- Células deficientes em XPC apresentam expressão aumentada de p53.
  Esse aumento na expressão de p53 é acompanhado pelo aumento de expressão de importantes proteínas mitocondriais e a inibição transcricional de p53 reverte a expressão de algumas dessas proteínas.
- O tratamento com antimicina A induz aumento na expressão de p53 de forma mais pronunciada na linhagem Xpc<sup>-/-</sup>. Esse aumento em p53 é acompanhado pela parada de divisão e morte celular nesta linhagem.
- H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> parece exercer um papel central na estabilização de p53 e sensibilidade das células Xpc<sup>-/-</sup> ao tratamento com antimicia A, dado que a suplementação dessas células com o antioxidante NAC reverte ambos os efeitos.
### 9. **BIBLIOGRAFIA**

ADIMOOLAM, S.; FORD, J. M. p53 and DNA damage-inducible expression of the xeroderma pigmentosum group C gene. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 99, n. 20, p. 12985–12990, 2002.

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, n. 5806, p. 457–465, 1981.

ARUOMA, O. I.; HALLIWELL, B.; HOEY, B. M.; BUTLER, J. The antioxidant action of N-acetylcysteine: Its reaction with hydrogen peroxide, hydroxyl radical, superoxide, and hypochlorous acid. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 6, n. 6, p. 593–597, 1989.

AZZU, V.; BRAND, M. D. The on-off switches of the mitochondrial uncoupling proteins. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 35, n. 5, p. 298–307, 2010.

BARTLETT, J. D.; CLOSE, G. L.; DRUST, B.; MORTON, J. P. The Emerging Role of p53 in Exercise Metabolism. **Sports Medicine**, v. 44, n. 3, p. 303–309, 2014.

BEJMA, J.; JI, L. L. Aging and acute exercise enhance free radical generation in

rat skeletal muscle. **The American Physiological Society**, v. 87, n. 1, p. 465–470, 1999.

BISHOP, N. A.; LU, T.; YANKNER, B. A. Neural mechanisms of ageing and cognitive decline. **Nature**, v. 464, n. 7288, p. 529–535, 2010.

BOVERIS, A.; CHANCE, B. The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. General properties and effect of hyperbaric oxygen. **Biochemical Journal**, v. 134, n. 3, p. 707–716, 1973.

BRAAKHUIS, A. J.; HOPKINS, W. G. Impact of Dietary Antioxidants on Sport Performance : A Review. **Sports Medicine**, v. 45, n. 7, p. 939–955, 2015.

CADET, J.; DOUKI, T.; GASPARUTTO, D.; RAVANAT, J. L. Oxidative damage to DNA: Formation, measurement and biochemical features. **Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 531, n. 1–2, p. 5–23, 2003.

CAIRNS, R. A.; HARRIS, I. S.; MAK, T. W. Regulation of cancer cell metabolism. **Nature Reviews Cancer**, v. 11, n. 2, p. 85–95, 2011.

CANMAN, C. E. Activation of the ATM Kinase by Ionizing Radiation and Phosphorylation of p53. **Science**, v. 281, n. 5383, p. 1677–1679, 1998.

CARDOSO, A. R.; QUELICONI, B. B.; KOWALTOWSKI, A. J. Mitochondrial ion

transport pathways: Role in metabolic diseases. **Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics**, v. 1797, n. 6–7, p. 832–838, 2010.

CHEHAB, N. H.; MALIKZAY, A.; STAVRIDI, E. S.; HALAZONETIS, T. D. Phosphorylation of Ser-20 mediates stabilization of human p53 in response to DNA damage. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 96, n. 24, p. 13777–82, 1999.

CHEN, Q. M.; BARTHOLOMEW, J. C.; CAMPISI, J.; ACOSTA, M.; REAGAN, J. D.; AMES, B. N. Molecular analysis of H2O2-induced senescent-like growth arrest in normal human fibroblasts: p53 and Rb control G1 arrest but not cell replication. **The Biochemical journal**, v. 332 (Pt 1, p. 43–50, 1998.

CHEN, Y.; LIU, K.; SHI, Y.; SHAO, C. The tango of ROS and p53 in tissue stem cells. **Cell Death and Differentiation**, v. 25, n. 4, p. 637–639, 2018.

COSKUN, P.; WYREMBAK, J.; SCHRINER, S. E.; CHEN, H. W.; MARCINIACK, C.; LAFERLA, F.; WALLACE, D. C. A mitochondrial etiology of Alzheimer and Parkinson disease. **Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects**, v. 1820, n. 5, p. 553–564, 2012.

COWAN, K. J. Mitogen-activated protein kinases: new signaling pathways functioning in cellular responses to environmental stress. **Journal of Experimental Biology**, v. 206, n. 7, p. 1107–1115, 2003.

D'ERRICO, M.; PARLANTI, E.; TESON, M.; DE JESUS, B. M. B.; DEGAN, P.; CALCAGNILE, A.; JARUGA, P.; BJØRÅS, M.; CRESCENZI, M.; PEDRINI, A. M.; EGLY, J.-M.; ZAMBRUNO, G.; STEFANINI, M.; DIZDAROGLU, M.; DOGLIOTTI, E. New functions of XPC in the protection of human skin cells from oxidative damage. **The EMBO Journal**, v. 25, n. 18, p. 4305–4315, 2006.

DUPUY, A.; VALTON, J.; LEDUC, S.; ARMIER, J.; GALETTO, R.; GOUBLE, A.; LEBUHOTEL, C.; STARY, A.; PÂQUES, F.; DUCHATEAU, P.; SARASIN, A.; DABOUSSI, F. Targeted gene therapy of xeroderma pigmentosum cells using meganuclease and TALEN<sup>™</sup>. **PLoS ONE**, v. 8, n. 11, p. 1–8, 2013.

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

FRIEDBERG, E. C. How nucleotide excision repair protects against cancer. **Nature Reviews Cancer**, v. 1, n. 1, p. 22–33, 2001.

GASPARI, M.; LARSSON, N. G.; GUSTAFSSON, C. M. The transcription machinery in mammalian mitochondria. **Biochimica et Biophysica Acta -Bioenergetics**, v. 1659, n. 2–3, p. 148–152, 2004.

GEORGE VLATAKIS, LARS I. ANDERSSON, RALF MULLER, K. M. Instability and decay of the primary structure of DNA. Letters to Nature, v. 366, n. 2 December 1993, p. 461–464, 1993.

GIACCIA, A. J.; KASTAN, M. B. The complexity of p53 modulation: Emerging patterns from divergent signals. **Genes and Development**, v. 12, n. 19, p. 2973–2983, 1998.

GUO, Z.; DESHPANDE, R.; PAULL, T. T. ATM activation in the presence of oxidative stress. **Cell Cycle**, v. 9, n. 24, p. 4805–4811, 2010.

HOPPEL, C. L.; TANDLER, B.; FUJIOKA, H.; RIVA, A. Dynamic organization of mitochondria in human heart and in myocardial disease. **International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, v. 41, n. 10, p. 1949–1956, 2009.

HOSSEINI, M.; MAHFOUF, W.; SERRANO-SANCHEZ, M.; RAAD, H.; HARFOUCHE, G.; BONNEU, M.; CLAVEROL, S.; MAZURIER, F.; ROSSIGNOL, R.; TAIEB, A.; REZVANI, H. R. Premature Skin Aging Features Rescued by Inhibition of NADPH Oxidase Activity in XPC-Deficient Mice. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 135, n. 4, p. 1108–1118, 2015.

KANG, D.; KIM, S. H.; HAMASAKI, N. Mitochondrial transcription factor A (TFAM): Roles in maintenance of mtDNA and cellular functions. **Mitochondrion**, v. 7, n. 1–2, p. 39–44, 2007.

KITAGAWA, Y.; SUZUKI, K.; YONEDA, A.; WATANABE, T. Effects of oxygen concentration and antioxidants on the in vitro developmental ability, production

of reactive oxygen species (ROS), and DNA fragmentation in porcine embryos. **Theriogenology**, v. 62, n. 7, p. 1186–1197, 2004.

KOMAROV, P. G. A Chemical Inhibitor of p53 That Protects Mice from the Side Effects of Cancer Therapy. **Science**, v. 285, n. 5434, p. 1733–1737, 1999.

KRAEMER, K. H. Sunlight and skin cancer: Another link revealed. v. 95, n. 21, p. 10–14, 1998.

KRAEMER, K. H.; LEE, M. M.; SCOTTO, J. Dna repair protects against cutaneous and internal neoplasia: Evidence from xeroderma pigmentosum. **Carcinogenesis**, v. 5, n. 4, p. 511–514, 1984.

KRUISWIJK, F.; LABUSCHAGNE, C. F.; VOUSDEN, K. H. P53 in survival, death and metabolic health: A lifeguard with a licence to kill. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 16, n. 7, p. 393–405, 2015.

KRZESZINSKI, J. Y.; CHOE, V.; SHAO, J.; BAO, X.; CHENG, H.; LUO, S.; HUO, K.; RAO, H. XPC promotes MDM2-mediated degradation of the p53 tumor suppressor. **Molecular Biology of the Cell**, v. 25, n. 2, p. 213–221, 2014.

KULAWIEC, M.; AYYASAMY, V.; SINGH, K. K. p53 regulates mtDNA copy number and mitocheckpoint pathway. **Journal of carcinogenesis**, v. 8, p. 8, 2009. KUNKEL, T. A.; ERIE, D. A. Dna Mismatch Repair. Annual Review of Biochemistry, v. 74, n. 1, p. 681–710, 2005.

LANGIE, S. A. S.; KNAAPEN, A. M.; HOUBEN, J. M. J.; VAN KEMPEN, F. C.; DE HOON, J. P. J.; GOTTSCHALK, R. W. H.; GODSCHALK, R. W. L.; VAN SCHOOTEN, F. J. The role of glutathione in the regulation of nucleotide excision repair during oxidative stress. **Toxicology Letters**, v. 168, n. 3, p. 302–309,2007.

LEES-MILLER, S. P.; SAKAGUCHI, K.; ULLRICH, S. J.; APPELLA, E.; ANDERSON, C. W. Human DNA-activated protein kinase phosphorylates serines 15 and 37 in the amino-terminal transactivation domain of human p53. **Molecular and cellular biology**, v. 12, n. 11, p. 5041–5049, 1992.

LEGERSKI, R. J.; LIU, P.; LI, L.; PETERSON, C. A.; ZHAO, Y.; LEACH, R. J.; NAYLOR, S. L.; SICILIANO, M. J. Assignment of xeroderma pigmentosum group C (XPC) gene to chromosome 3p25Genomics, v. 21, n. 1, p. 266-269, 1994.

LIEBER, M. R. The Mechanism of Double-Strand DNA Break Repair by the Nonhomologous DNA End-Joining Pathway. **Molecular Microbiology**, v. 79, n. 3, p. 181–211, 2011.

MADDOCKS, O. D. K.; VOUSDEN, K. H. Metabolic regulation by p53. Journal

of Molecular Medicine, v. 89, n. 3, p. 237–245, 2011.

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

MARTÍNEZ, P.; THANASOULA, M.; MUÑOZ, P.; LIAO, C.; TEJERA, A.; MCNEES, C.; FLORES, J. M.; FERNÁNDEZ-CAPETILLO, O.; TARSOUNAS, M.; BLASCO, M. A. Increased telomere fragility and fusions resulting from TRF1 deficiency lead to degenerative pathologies and increased cancer in mice. **Genes and Development**, v. 23, n. 17, p. 2060–2075, 2009.

MAYO, L. D.; TURCHI, J. J.; BERBERICH, S. J. Mdm-2 Phosphorylation by DNA-dependent Protein Kinase Prevents Interaction with p53 Advances in Brief Mdm-2 Phosphorylation by DNA-dependent Protein Kinase Prevents Interaction. p. 5013–5016, 1997.

MCCOY, M. K.; COOKSON, M. R. Mitochondrial quality control and dynamics in Parkinson's disease. **Antioxidants & redox signaling**, v. 16, n. 9, p. 869–82, 2012.

MCCULLOCH, S. D.; KOKOSKA, R. J.; MASUTANI, C.; IWAI, S.; HANAOKA, F.; KUNKEL, T. A. Preferential cis-syn thymine dimer bypass by DNA polymerase η occurs with biased fidelityNature, 2004. MELIS, J. P. M.; KUIPER, R. V.; ZWART, E.; ROBINSON, J.; PENNINGS, J. L. A.; VAN OOSTROM, C. T. M.; LUIJTEN, M.; VAN STEEG, H. Slow accumulation of mutations in Xpc-/- mice upon induction of oxidative stress. **DNA Repair**, v. 12, n. 12, p. 1081–1086, 2013.

MELIS, J. P. M.; LUIJTEN, M.; MULLENDERS, L. H. F.; VAN STEEG, H. The role of XPC: Implications in cancer and oxidative DNA damage. **Mutation Research - Reviews in Mutation Research**, v. 728, n. 3, p. 107–117, 2011.

MELIS, J. P. M.; WIJNHOVEN, S. W. P.; BEEMS, R. B.; ROODBERGEN, M.; VAN DEN BERG, J.; MOON, H.; FRIEDBERG, E.; VAN DER HORST, G. T. J.; HOEIJMAKERS, J. H. J.; VIJG, J.; VAN STEEG, H. Mouse Models for Xeroderma Pigmentosum Group A and Group C Show Divergent Cancer Phenotypes. **Cancer Research**, v. 68, n. 5, p. 1347–1353, 2008.

MEMISOGLU, A.; SAMSON, L. Base excision repair in yeast and mammals. **Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 451, n. 1–2, p. 39–51, 2000.

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

MORI, M. P.; COSTA, R. A. P.; SOLTYS, D. T.; FREIRE, T. de S.; ROSSATO, F. A.; AMIGO, I.; KOWALTOWSKI, A. J.; VERCESI, A. E.; DE SOUZA-PINTO, N. C. Lack of XPC leads to a shift between respiratory complexes I and II but sensitizes cells to mitochondrial stress. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 155, 2017.

MULLAART, E.; LOHMAN, P. H. M.; BERENDS, F.; VIJG, J. DNA damage metabolism and aging. **Mutation Research DNAging**, v. 237, n. 5–6, p. 189–210, 1990.

MURPHY, M. P.; HOLMGREN, A.; LARSSON, N. G.; HALLIWELL, B.; CHANG, C. J.; KALYANARAMAN, B.; RHEE, S. G.; THORNALLEY, P. J.; PARTRIDGE, L.; GEMS, D.; NYSTRÖM, T.; BELOUSOV, V.; SCHUMACKER, P. T.; WINTERBOURN, C. C. Unraveling the biological roles of reactive oxygen species. **Cell Metabolism**, v. 13, n. 4, p. 361–366, 2011.

NARENDRA, D.; TANAKA, A.; SUEN, D.; YOULE, R. J.; THE, S.; BIOLOGY, C.; DEC, N.; NARENDRA, D.; TANAKA, A.; SUEN, D.; YOULE, R. J. Parkin is recruited selectively to impaired mitochondria and promotes their autophagy. **The Journal of Cell Biology**, v. 183, n. 5, p. 795–803, 2008.

NEMZOW, L.; LUBIN, A.; ZHANG, L.; GONG, F. XPC: Going where no DNA damage sensor has gone before. **DNA Repair**, v. 36, p. 19–27, 2015.

PARK, J. Y.; WANG, P. y; MATSUMOTO, T.; SUNG, H. J.; MA, W.; CHOI, J. W.; ANDERSON, S. A.; LEARY, S. C.; BALABAN, R. S.; KANG, J. G.; HWANG, P. M. p53 Improves Aerobic Exercise Capacity and Augments Skeletal Muscle Mitochondrial DNA Content. **Circulation Research**, v. 105, n.

PETERNELJ, T.; COOMBES, J. S. Antioxidant Supplementation during Exercise Training Beneficial or Detrimental ? v. 41, n. 12, p. 1043–1069, 2011.

REARDON, J. T.; MU, D.; SANCAR, A. Nucleic Acids , Protein Synthesis , and Molecular Genetics : Overproduction , Purification , and Characterization of the XPC Subunit of the Human DNA Repair Excision Nuclease Overproduction , Purification , and Characterization of the XPC Subunit of the H. v. 271, n. 32, p. 19451–19456, 1996.

REDOUT, E. M.; WAGNER, M. J.; ZUIDWIJK, M. J.; BOER, C.; MUSTERS, R. J. P.; HARDEVELD, C. Van; PAULUS, W. J.; SIMONIDES, W. S. Rightventricular failure is associated with increased mitochondrial complex II activity and production of reactive oxygen species. v. 75, p. 770–781, 2007.

REID, M. B. Free radicals and muscle fatigue : Of ROS , canaries , and the IOC. v. 44, p. 169–179, 2008.

REIF, V. R. P. and A. E. Inhibition of an electron transport component by antimycin A. Journal of Biological Chemistry, v. 194, n. 1, p. 287–297, 1952.

REZVANI, H. R.; MAZURIER, F.; KIM, A. L.; ALI, N.; DALY, M.; DE VERNEUIL, H.; TAIEB, A.; BICKERS, D. R. XPC silencing in normal human keratinocytes induces AKT activation and triggers metabolic alterations that drive the formation of squamous cell carcinomas. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 130, n. 1, p. S27–S27, 2010.

SAFDAR, A.; BOURGEOIS, J. M.; OGBORN, D. I.; LITTLE, J. P.; HETTINGA, B. P. Endurance exercise rescues progeroid aging and induces systemic mitochondrial rejuvenation in mtDNA mutator mice. **PNAS**, v. 4, n. 10, p. 4135– 4140, 2011.

SAFDAR, A.; KHRAPKO, K.; FLYNN, J. M.; SALEEM, A.; LISIO, M. De; JOHNSTON, A. P. W.; KRATYSBERG, Y.; SAMJOO, I. A.; KITAOKA, Y.; OGBORN, D. I.; LITTLE, J. P.; RAHA, S. Exercise-induced mitochondrial p53 repairs mtDNA mutations in mutator mice Exercise-induced mitochondrial p53 repairs mtDNA mutations in mutator mice. **Skeletal Muscle**, v. 6, n. 7, p. 1–17, 2016.

SAHIN, E.; COLLA, S.; LIESA, M.; MOSLEHI, J.; MÜLLER, F. L.; GUO, M.; COOPER, M.; KOTTON, D.; FABIAN, A. J.; WALKEY, C.; MASER, R. S.; TONON, G.; FOERSTER, F.; XIONG, R.; WANG, Y. A.; SHUKLA, S. A.; JASKELIOFF, M.; MARTIN, E. S.; HEFFERNAN, T. P.; PROTOPOPOV, A.; IVANOVA, E.; MAHONEY, J. E.; KOST-ALIMOVA, M.; PERRY, S. R.; BRONSON, R.; LIAO, R.; MULLIGAN, R.; SHIRIHAI, O. S.; CHIN, L.; DEPINHO, R. A. Telomere dysfunction induces metabolic and mitochondrial compromise. **Nature**, v. 470, n. 7334, p. 359–365, 2011.

SAN FILIPPO, J.; SUNG, P.; KLEIN, H. Mechanism of Eukaryotic Homologous

Recombination. **Annual Review of Biochemistry**, v. 77, n. 1, p. 229–257, 2008.

SARASIN, A.; MUTAGENBE, D. Deficiency in the catalase activity in human precancerous stages of Xeroderma pigmentosum: Comparison with XP, at and blomm's cultured fibroblasts and SV40 transformed human cell extracts. **Bioelectrochemistry and Bioenergetics**, v. 232, n. 1–3, p. 271–282, 1987.

SARASTE, M. Oxidative phosphorylation at the fin de siècle. Science (New York, N.Y.), v. 283, n. 5407, p. 1488–1493, 1999.

SATOAKI MATOBA, JU-GYEONG KANG, WILLMAR D. PATINO, ANDREW WRAGG, MANFRED BOEHM; OKSANA GAVRILOVA, PAULA J. HURLEY, FRED BUNZ, P. M. H. p53 Regulates Mitochondrial Respiration. **Science**, v. 312, n. June, p. 1650–1653, 2006.

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

SFEIR, A.; KOSIYATRAKUL, S. T.; HOCKEMEYER, D.; MACRAE, S. L.; KARLSEDER, J.; SCHILDKRAUT, C. L.; DE LANGE, T. Mammalian Telomeres Resemble Fragile Sites and Require TRF1 for Efficient Replication. **Cell**, v. 138, n. 1, p. 90–103, 2009.

SHAH, P.; HE, Y. Y. Molecular regulation of UV-induced DNA repair.

**Photochemistry and Photobiology**, v. 91, n. 2, p. 254–264, 2015.

SHOSHAN-BARMATZ, V.; ISRAELSON, A.; BRDICZKA, D.; SHEU, S. S. The voltage-dependent anion channel (VDAC): function in intracellular signalling, cell life and cell death. **Current Pharmaceutical Design**, v. 12, p. 2249–2270, 2006.

SLEIGH, A. Mitochondrial dysfunction in patients with primary congenital insulin resistance. **The Journal of Clinica Investigation**, v. 121, n. 6, p. 2457–2461, 2011.

SOUZA-PINTO, N. C. De; BOHR, V. A. THE MITOCHONDRIAL THEORY OF AGING : INVOLVEMENT OF MITOCHONDRIAL DNA DAMAGE AND REPAIR. International Review of Neurobiology, v. 53, p. 519–534, 2002.

SPENCER, S. L.; SORGER, P. K. Measuring and modeling apoptosis in single cells. **Cell**, v. 144, n. 6, p. 926–939, 2011.

STOUT, G. J.; BLASCO, M. A. Telomere length and telomerase activity impact the UV sensitivity syndrome xeroderma pigmentosum C. **Cancer Research**, v. 73, n. 6, p. 1844–1854, 2013.

SUGASAWA, K.; SHIMIZU, Y.; IWAI, S.; HANAOKA, F. A molecular mechanism for DNA damage recognition by the xeroderma pigmentosum group C protein complex. **DNA Repair**, v. 1, n. 1, p. 95–107, 2002.

TIBBETTS, R. S.; BRUMBAUGH, K. M.; WILLIAMS, J. M.; SARKARIA, J. N.; CLIBY, W. A.; SHIEH, S. Y.; TAYA, Y.; PRIVES, C.; ABRAHAM, R. T. A role for ATR in the DNA damage-induced phosphorylation of p53. **Genes and Development**, v. 13, n. 2, p. 152–157, 1999.

TOSHIYUKI, M.; REED, J. C. Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human bax gene. **Cell**, v. 80, n. 2, p. 293–299, 1995.

TRIFUNOVIC, A.; WREDENBERG, A.; FALKENBERG, M. Premature ageing in mice expressing defective mitochondrial DNA polymerase. **Nature**, v. 429, n. May, p. 417–423, 2004.

TRINDADE, D.; PEREIRA, C.; CHAVES, S.; MANON, S.; CORTE-REAL, M.; JOAO SOUSA, M. VDAC regulates AAC-mediated apoptosis and cytochrome c release in yeast. **Microbial Cell**, v. 3, n. 10, p. 500–510, 2016.

TSENG, Y. H.; CYPESS, A. M.; KAHN, C. R. Cellular bioenergetics as a target for obesity therapy. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 9, n. 6, p. 465–481, 2010.

VOGELSTEIN, B.; LANE, D.; LEVINE, A. J. Surfing the p53 network. **Nature**, v. 408, n. 6810, p. 307–310, 2000.

WANG, G.; CHUANG, L.; ZHANG, X.; COLTON, S.; DOMBKOWSKI, A.;

REINERS, J.; DIAKIW, A.; XU, X. S. The initiative role of XPC protein in cisplatin DNA damaging treatment-mediated cell cycle regulation. **Nucleic Acids Research**, v. 32, n. 7, p. 2231–2240, 2004.

WANG, W.; CHENG, X.; LU, J.; WEI, J.; FU, G.; ZHU, F.; JIA, C.; ZHOU, L.; XIE, H.; ZHENG, S. Mitofusin-2 is a novel direct target of p53. **Biochemical** and **Biophysical Research Communications**, v. 400, n. 4, p. 587–592, 2010.

WEI, C. L.; WU, Q.; VEGA, V. B.; CHIU, K. P.; NG, P.; ZHANG, T.; SHAHAB,
A.; YONG, H. C.; FU, Y. T.; WENG, Z.; LIU, J.; ZHAO, X. D.; CHEW, J. L.; LEE,
Y. L.; KUZNETSOV, V. A.; SUNG, W. K.; MILLER, L. D.; LIM, B.; LIU, E. T.;
YU, Q.; NG, H. H.; RUAN, Y. A global map of p53 transcription-factor binding
sites in the human genome. **Cell**, v. 124, n. 1, p. 207–219, 2006.

WEST, A. P.; SHADEL, G. S.; GHOSH, S. Mitochondria in innate immune responses. **Nature Reviews Immunology**, v. 11, n. 6, p. 389–402, 2011.

YOKOI, M.; MASUTANI, C.; MAEKAWA, T.; SUGASAWA, K.; OHKUMA, Y.; HANAOKA, F. The xeroderma pigmentosum group C protein complex XPC-HR23B plays an important role in the recruitment of transcription factor IIH to damaged DNA. **J Biol Chem**, v. 275, n. 13, p. 9870–9875, 2000.

YOULE, R. J.; VAN DER BLIEK, A. M. Mitochondrial fission, fusion, and stress. **Science**, v. 337, n. 6098, p. 1062–1065, 2012.

ZHANG, C.; LIN, M.; WU, R.; WANG, X.; YANG, B.; LEVINE, A. J.; HU, W.; FENG, Z. Parkin, a p53 target gene, mediates the role of p53 in glucose metabolism and the Warburg effect. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 108, n. 39, p. 16259–64, 2011.

ZHOU, S.; KACHHAP, S.; SINGH, K. K. Mitochondrial impairment in p53deficient human cancer cells malignancy remains unclear. **Mutagenesis**, v. 18, n. 3, p. 287–292, 2003.

### **10. APÊNDICE**

# XPC-p53-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> axis and mitochondrial dysfunction: Who is the key player?

Thiago de S. Freire<sup>1</sup>, Mateus P. Mori<sup>1</sup>, Jose N. F. de Ataíde Miranda<sup>1</sup>, Nadja C. de Souza Pinto<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Biochemistry, Institute of Chemistry, University of São Paulo (USP), São Paulo, SP, Brazil.

### Abstract

XPC deficiency is associated with several phenotypes characteristic of mitochondrial dysfunction, decreased activity of electron transport chain complexes, reduction of oxygen consumption, greater production of reactive oxygen species, and greater sensitivity to agents that cause mitochondrial stress. However, a mechanistic description of the regulation of mitochondrial functions caused by XPC deficiency is still not well established.

Here we show that XPC deficiency is associated with increased expression of the tumor suppressor p53. This increase is accompanied by increased expression of several proteins that participate in important mitochondrial functions. Inhibition of p53 reverses the expression of some of these proteins. In addition, treatment with antimycin A induces increased expression of p53 more strongly in the  $Xpc^{-/-}$  cells. And the treatment of this cells with the antioxidant N-acetylcysteine decreases basal H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production, p53 expression and sensitivity to antimycin A treatment. Thus, suggesting a central participation of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in the regulation of p53 expression and the sensitivity of  $Xpc^{-/-}$  to agents that cause mitochondrial stress.

### Introduction

XPC is a GG-NER (global genome nucleotide excision repair) protein that participates in the recognition of several different types of lesions that cause physical distortions in the double helix of DNA and in the recruitment of the other components of the NER machinery to the site of the injury<sup>1,2</sup>. XPC deficiency causes a rare autosomal disease associated with more than 1000-fold increase in the risk of developing skin cancer from basal and squamous cellular origins and increased risk of 10-20 fold in the development of internal cancer<sup>3</sup>. Despite the well-established role of XPC in the NER pathway, many studies have emerged in the literature demonstrating the participation of XPC in other pathways, such as participation in the base excision repair (BER)<sup>4</sup>, in the regulation of redox homeostasis<sup>5</sup> and on the cell cycle checkpoint signaling pathways<sup>6</sup>.

The deficiency in XPC has also been implicated in important changes in mitochondrial functions, such as activity of the electron transport chain complexes, oxygen consumption and ROS production <sup>7</sup>.

Studies performed by our group with XPC-deficient fibroblasts have shown that these cells have higher production of mitochondrial H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, lower activity of glutathione peroxidase, lower activity of complex I, and greater activity of complex II. In addition to increased sensitivity to compounds that cause mitochondrial stress<sup>8</sup>. These results demonstrated that XPC deficiency leads to an imbalance in mitochondrial functions, suggesting that mitochondria may be one of the targets in the cellular dysfunction mechanism due to the lack of XPC. However, there is still no mechanistic model linking XPC deficiency to mitochondrial phenotype.

#### Materials and methods

**Cell lines and culture.** The human SV40-transformed fibroblast cell lines XP4-PA and corrected XP4-PA cell line were maintained in DMEM/high glucose supplemented with 10% FBS, penicillin 100 IU/mL and streptomycin 100  $\mu$  g/mL, at 37 °C in a humidified atmosphere with 5% CO<sub>2</sub> (standard conditions). Cultures were routinely sub-cultured, by trypsinization, when reached up to 80% confluence. For the experiments investigating the use of antioxidant, the cells were grown in medium supplemented with 10mM of N-acetylcysteine (NAC). For inhibition of p53, 30  $\mu$ M pifithrin- $\alpha$  (Sigma-Aldrish) was add to the culture medium.

**Western blotting.** Protein concentrations from a whole cell lysate extract were determined using the BCA assay (Pierce). Equal amounts of protein were subjected to electrophoresis. Western blotting was performed in triplicate using antibodies including p(ser20)-p53, MDM-2, DNA PK<sub>cs</sub>, Ku70, Tfam, PINK, Mfn1, Mfn2, VDAC1 (Santa Cruz Biotechnology), XPC, Bax, NDUFS3, UQCRC2, COX II, Parkin, LC3, mTor (Abcam), SDBH, F1α (MitoSciences) p53 and β-actin (equal loading control; Sigma Adrich) according to the recommendation of the manufacturer.

**Flow cytometry**. For this experiment 3x10<sup>5</sup> cells were seeded in 6-well plate (TPP), treated or not with different concentrations of antimycin A for 4 hours in serum-free culture medium, after this time the culture medium was replaced with the complete normal culture medium. At the end of 24 and 48 hours the cells were labeled with propidium iodide (Sigma) using standard protocol and subjected to analysis on the Guava<sup>®</sup> PCA-96 System flow cytometer (Millipore). The results were analyzed with flowing software 2.

**Quantification of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.** H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production by the cells was monitored spectrofluorimetrically on SpectraMax 190 microplate reader (Molecular Devices<sup>®</sup>) using Amplex<sup>®</sup> Red (Invitrogen) in the presence of 0.1 U / ml HRP according to the manufacturer's specifications.

**Clonogenic assay.** Briefly,  $1.0 \times 10^5$  cells were seeded in 6-well plate (TPP) and incubated for 24 h, at standard conditions. For treatment with AA, 500 cells were plated in 6-well plate (TPP) in triplicate and incubated for 24 h in standard conditions. Cells were washed twice with PBS and incubated with AA at 0.25, 0.50, 1.0 and 2.0  $\mu$  M in DMEM without FBS for 4 h. After that, AA was washed out with PBS and cells were incubated in complete medium in standard conditions for 6 to 7 days. Colonies were washed in ice-cold PBS, ethanol-fixed and stained with 1% (w/v) crystal violet solution. Survival rate was calculated as the ratio of number of colonies in treated over non-treated conditions.

**Statistical analyses.** Results are shown as mean  $\pm$  standard deviation (SD) of at least 3 independent experiments. ANOVA with Tukey regression was used in Xpc<sup>-/-</sup> and Xpc<sup>+/+</sup> comparison between more than two groups, while Student' s *t* test was used to assess differences between two groups, considering significant *p* < 0.05.

### Results

### XPC deficiency is associated with increased expression of p53 and DNA $PK_{cs}$

The models used for this study were immortalized human fibroblast XP4-PA ( $Xpc^{-/-}$ )<sup>9</sup> and corrected XP4-PA ( $Xpc^{+/+}$ ) which had the xpc gene reintroduced into locus (**Figure 1A**).

XPC deficiency is associated with an approximately 2.5-fold increase in p53 expression (**Figures 1B and 1C**). This increase in p53 expression is accompanied by an increase in p53 serine 20 phosphorylation which is associated with increased stability of the protein<sup>10</sup>. The  $Xpc^{-/-}$  cells also showed increase in Bax expression which is known to be under the transcriptional control of p53<sup>11</sup> (**Figures 1D e 1E**). Indicating that transcriptional activity of p53 may also be increased in the  $Xpc^{-/-}$  cells.

Among the proteins that can phosphorylate p53 like ATM<sup>12</sup>, ATR<sup>13</sup> and DNA PK<sup>14</sup>, the latter had the expression of the catalytic subunit (DNA PK<sub>cs</sub>) increased by more than 2 fold in the  $Xpc^{-/-}$  cell line (Figure 2A and 2B).

## XPC deficiency causes alterations in mitochondrial proteins expression and p53 inhibition reverses some of these changes

Figure 3A shows the expression pattern of some important mitochondrial maintenance and function-related proteins such as components of electron transport chain (ETC), mitochondrial fusion, autophagy and mitophagy.

Related to the electron transport chain, SDHB (complex II) and COXII (complex IV) subunits had increased expression in the *Xpc<sup>-/-</sup>* cells (**Figure 3C and 3E**, respectively). Those involved in the autophagy, mitophagy and mitochondrial fusion, only Parkin<sup>15</sup> e Mfn2<sup>16</sup> had their expressions altered in the *Xpc<sup>-/-</sup>* cells (**Figure 3D and 3F** respectively). The *Xpc<sup>-/-</sup>* cells also showed higher

expression of Tfam which is an important factor controlling the expression of ETC subunits, mtDNA copy number and maintenance<sup>17</sup> and VDAC1, component of the voltage dependent anion channel that participates in the transport of ATP, Ca<sup>2+</sup> and other metabolites between the mitochondrial matrix and the cytosol and in situations of stress stimulates programmed cell death<sup>18</sup> (**Figures 3B e 3G** respectively).

Treatment of  $Xpc^{-/-}$  cells with pifithrin- $\alpha$  (PFT- $\alpha$ ), inhibitor of p53<sup>19</sup>, was able to reduce the expression of DNA PK<sub>cs</sub>, Tfam, SDHB and COX II (**Figures 4A-4E**). Indicating a possible participation of p53 in the regulation of these proteins.

### Treatment with antimycin A increases p53 expression and induces cell division arrest and death in XPC deficient cells

As previously reported,  $Xpc^{-/-}$  cells are more sensitive to treatment with antimycin A (complex inhibitor III<sup>20</sup>). Here we show that antimicin A treatment causes increased expression of p53 in both  $Xpc^{-/-}$  and  $Xpc^{+/+}$  cells, with the expression being most pronounced in the  $Xpc^{-/-}$  cells (**Figure 5A and 5B**). Since p53 can regulate cell cycle arrest and programmed cell death<sup>21</sup>. Thus, we investigate whether some of these pathways would be involved in mediating the hypersensitivity of  $Xpc^{-/-}$  cells to antimycin A treatment.

The cell cycle study of cells treated with different concentrations and times showed that for the treatment with low concentration of antimycin A (1 $\mu$ M), the cells initially stopped the at G1 fase of the cell cycle (24 hours after treatment) and then returned to the normal cell cycle profile 48 after treatment. However, the treatment with higher concentrations (2 $\mu$ M) caused a complete stop of cell division in the *Xpc*<sup>-/-</sup> cells (**Figure 5C and 5D**).

Analysis of the sub G1 population, which is an indicative of cell death, showed significant increase only in the  $Xpc^{-/-}$  cells (**Figure 5E and 5F**). Thus, these results indicate that the increased sensitivity of the  $Xpc^{-/-}$  cells to antimycin A treatment is mediated by arrest of cell division and cell death.

### Treatment with the antioxidant N-acetylcysteine decreased basal H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production, p53 expression and sensitivity to antimycin A treatment in XPC-deficient cells

It is already known that antimycin A treatment increases the mitochondrial production of  $H_2O_2$ <sup>22</sup>. And that treatment with  $H_2O_2$  increases the expression and activity of p53<sup>23</sup>. Thus, we hypothesized that the sensitivity of *Xpc*<sup>-/-</sup> cells could be mediated via  $H_2O_2$  redox signaling.

Treatment of  $Xpc^{-/-}$  cells with the antioxidant N-acetylcysteine (NAC)<sup>24</sup> decreased basal H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production (**Figure 6A**) and p53 expression (**Figure 6B and 6C**). In addition, NAC treatment was sufficient to raise the survival level of antimycin A treated  $Xpc^{-/-}$  cells to levels comparable to  $Xpc^{+/+}$  controls cells (**Figure 6D**), this result was also confirmed by a decrease in sub G1 population in the  $Xpc^{-/-}$  treated with antimycin A (**Figures 6E and 6F**). Together these results

corroborate the hypothesis that an  $H_2O_2$  mediated redox pathway acts on the  $Xpc^{-/-}$  cells mediating p53 expression and the sensitivity to compounds that cause mitochondrial stress.

#### Discussion

The canonical function of XPC, the recognition of lesions that cause distortions in the physical structure of DNA in the nucleotide excision pathway of the global genome (GG NER) has been extensively studied and its implications in the genesis of skin cancer are well established. However, many phenotypes found in mice, patients and XP-C cells are not related to the role of XPC in the NER pathway, implying the possible participation of XPC in other biochemical pathways<sup>25</sup>.

As mentioned earlier, our group and others have reported the presence of mitochondrial alterations in *Xpc<sup>-/-</sup>* cells. As there is no evidence that XPC exerts a direct participation in mitochondria, the most plausible hypothesis would be that XPC directly or indirectly acts on some factors, for example transcription factors, that regulates mitochondrial activities.

A plausible candidate for this function is the transcription factor and tumor suppressor p53. In addition to being known as the guardian of the genome, by being able to activate the pathways of DNA damage responses that can lead to cell cycle arrest, DNA repair, senescence and programmed cell death. P53 also plays a central role in the homeostasis of metabolic functions and under moderate stress conditions regulates biogenesis and mitochondrial functions and redox processes<sup>21</sup>.

It has been known for some time that in response to DNA damage, p53 is able to promote XPC expression <sup>26</sup>. But only recently XPC has been implicated in the negative regulation of p53, participating in its degradation. Suggesting that there is a negative feedback loop in which under stress conditions p53 activates the expression of XPC and after repair of the lesion XPC promotes the degradation of p53.

Based on what was mentioned above, we hypothesized that the absence of XPC could compromise the homeostasis of p53 levels and altering its activity in the *Xpc*<sup>-/-</sup> cells therefore being responsible for part of the phenotype exhibiting by these cells.

According to this hypothesis, in this work we report a series of results that suggest the participation of p53 in the protein expression profile in  $Xpc^{-/-}$  cells.

We first show that *Xpc*<sup>-/-</sup> cells show increased expression of p53 and Bax, indicating that p53 expression correlates with the expression of proteins that are under their transcriptional control. This increase in expression is not due to a decrease in the expression of MDM-2, E-3 ubiquitin ligase responsible for ubiquitination-mediated degradation of p53 via proteasome. Suggesting, that the increase in p53 expression may be via protein stabilization. According to

this hypothesis, the *Xpc*<sup>-/-</sup> cells presented a higher p53 serine 20 phosphorylation, post-translational modification associated with increased protein stability.

The stabilization and activation of p53 via phosphorylation can be mediated by DNA damage sensing proteins, ATM, ATR and DNA PK, or factors activated by these kinases <sup>27</sup>. Among these kinases we found a massive expression of DNA  $PK_{cs}$ , the catalytic subunit of DNA PK, in the Xpc<sup>-/-</sup> cells. It is already known that DNA PK can participate in the stabilization of p53 under stress conditions<sup>28</sup>. Therefore, it is possible to speculate that there is a role of DNA PK in the stabilization and activation of p53. However, this relationship may not be unilateral, since inhibition of p53 in the *Xpc<sup>-/-</sup>* cells was able to block the overexpression of DNA PK<sub>cs</sub>. Thus, it is possible to suggest a positive feedback loop in which p53 promotes the expression DNA of PK<sub>cs</sub> and DNA of PK<sub>cs</sub> promotes the stabilization of p53.

The Xpc<sup>-/-</sup> cells presented differential expression of several proteins that have important mitochondrial functions. Among them are Tfam, SDHB, COX II, Parkin, Mfn2 and VDAC1. Most of these proteins can have their expressions regulated by p53. For example, p53 has been shown to be a determinant factor for Tfam expression and mtDNA content<sup>29</sup>. In addition, p53 is involved in the regulation of oxidative phosphorylation (OXPHOS) via modulation in the activity of complexes I and IV<sup>30</sup> and the absence of functional p53 is associated with a decrease in COX activity <sup>31</sup>. This decrease is attributed to the transcriptional and posttranscriptional regulation exerted by p53 on COX subunits I and II <sup>32</sup>. P53 has also been implicated in promoting the expression of Mfn2<sup>33</sup> and Parkin, and in this situation Parkin counteracts the Warburg effect by inhibiting the glycolytic pathway <sup>34</sup>. And the inhibition of p53 in the Xpc<sup>-/-</sup> cells was able to reverse the expression of Tfam, SDHB and COX II. Thus, there is evidence that p53 plays a role in regulating the expression of mitochondrial factors in the  $Xpc^{-/-}$  cells and at first this regulation appears to be adaptive since p53 appears to be regulating proteins dedicated to homeostasis of mitochondrial functions. However, high levels of p53 could sensitize Xpc<sup>-/-</sup> cells to additional stresses, which would explain the increased sensitivity of these cells to various stress - causing agents.

The increased sensitivity of *Xpc<sup>-/-</sup>* cells to agents that cause mitochondrial stress, make these compounds important tools for the mechanistic study of the mitochondrial dysfunction phenotype of these cells.

In previous results we have shown that  $Xpc^{-/-}$  cells have reduced survival relative to  $Xpc^{+/+}$  cells when treated with antimycin A. Here we show that antimycin A treatment increases p53 expression in both cells lines, with increased expression in the  $Xpc^{-/-}$  cells reaches 4.5 times the baseline expression of the  $Xpc^{+/+}$  cells. In addition, treatment with 2 µM of antimycin A was able to completely induce cell division arrest and increase in sub G1 population (indicative of cell death) in the *Xpc*<sup>-/-</sup> cells.

Similar results were found in a study by Kulawiec et al., in which the effects of inhibitors of the electron transport chain were investigated on  $p53^{+/+}$  and  $p53^{-/-}$  cells<sup>35</sup>. In this study the authors hypothesized that the effects of inhibitors were mediated via p53-dependent H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production. In addition, it is already known that treatment with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> increases the expression of p53<sup>34</sup> and treatment with antimycin A increases H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production. Thus, it can be concluded that increased expression of p53 that occurs after antimycin A treatment could be mediated via H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> signaling. In view of these results and the fact that  $Xpc^{-/-}$  cells are more sensitive to agents that cause oxidative stress, as is demonstrated in numerous studies<sup>36</sup>, we hypothesized that H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-mediated redox signaling could be operating in the  $Xpc^{-/-}$  cells and be responsible for the increased expression of p53 and possibly the others phenotypes presented in this cells.

According to this hypothesis the treatment with the antioxidant NAC was able to reduce the basal production of  $H_2O_2$ . This reduction in hydrogen peroxide production was accompanied by a reduction in p53 expression and a recovery in the survival of  $Xpc^{-/-}$  cells when treated with antimycin A. Together these results corroborate the hypothesis of the  $H_2O_2$ -mediated redox signaling pathway in the participation of p53 stabilization and the sensitivity of  $Xpc^{-/-}$  cells to agents that cause mitochondrial stress.

The central role of p53 or  $H_2O_2$  is difficult to determine since both appear together under various conditions.

Sahin et al., showed that telomeric dysfunction causes an increase in the transcriptional activity of p53, which inhibits the expression of PGC-1 $\alpha$  and PGC-1 $\beta$  causing mitochondrial alterations<sup>37</sup>. The most interesting about these results is that some of them are present in our model such as increased mitochondrial H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production, decreased PGC-1 $\alpha$  expression, PPAR $\alpha$  expression and decreased glutathione peroxidase and complex I activity. Also related to telomere homeostasis has been shown that *Xpc<sup>-/-</sup>* Terc<sup>+/+</sup> cells present a dramatic increase in telomere with multiple telomere signals (MTS), which is curiously exacerbated in *Xpc<sup>-/-</sup>* G1-G2Terc<sup>-/-</sup> cells, suggesting increased chromosomal instability of these cells<sup>38</sup>. MTS are related to DNA replication problems in telomeres <sup>39,40</sup> therefore, these results suggest that *Xpc<sup>-/-</sup>* cells experience difficulty in telomeric DNA replication even in the absence of DNA damage. On the other hand, *Xpc<sup>-/-</sup>* cells exposed to 3% O<sub>2</sub> showed a significant reduction in the mean number of MTS per chromosome, to the levels equivalent to *Xpc*<sup>+/+</sup> cells, suggesting factor for ROS generation it is possible to speculate once again that H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> plays an important role in this phenotype.

### Conclusion

XPC-deficient cells have increased p53 expression. This increase in p53 expression is accompanied by increased expression of important mitochondrial proteins and transcriptional inactivation of p53 reverses the expression of some of these proteins.

Treatment with antimycin A induces increased expression of p53 more pronouncedly in the  $Xpc^{-/-}$  cells. This increase in p53 is accompanied by complete arrest of cell division and increased cell death in these cells.

 $H_2O_2$  appears to play a central role in the stabilization of p53 and sensitivity of  $Xpc^{-/-}$  cells to the antimycin A, since the treatment of these cells with the antioxidant NAC reverses both effects.

### References

- Sugasawa, K., Shimizu, Y., Iwai, S. & Hanaoka, F. A molecular mechanism for DNA damage recognition by the xeroderma pigmentosum group C protein complex. *DNA Repair (Amst)*. 1, 95–107 (2002).
- Yokoi, M. *et al.* The xeroderma pigmentosum group C protein complex XPC-HR23B plays an important role in the recruitment of transcription factor IIH to damaged DNA. *J Biol Chem* 275, 9870–9875 (2000).
- Kraemer, K. H., Lee, M. M. & Scotto, J. Dna repair protects against cutaneous and internal neoplasia: Evidence from xeroderma pigmentosum. *Carcinogenesis* 5, 511–514 (1984).
- 4. Errico, M. D. *et al.* New functions of XPC in the protection of human skin cells from oxidative damage. *EMBO J.* **25**, 4305 (2006).
- 5. Langie, S. A. S. *et al.* The role of glutathione in the regulation of nucleotide excision repair during oxidative stress. *Toxicol. Lett.* **168**, 302–309 (2007).
- Wang, G. *et al.* The initiative role of XPC protein in cisplatin DNA damaging treatment-mediated cell cycle regulation. *Nucleic Acids Res.* 32, 2231–2240 (2004).
- Hosseini, M. *et al.* Premature skin aging features rescued by inhibition of NADPH oxidase activity in XPC-deficient mice. *J. Invest. Dermatol.* 135, 1108– 18 (2015).
- 8. Mori, M. P. *et al.* Lack of XPC leads to a shift between respiratory complexes I and II but sensitizes cells to mitochondrial stress. *Sci. Rep.* **7**, 155 (2017).
- 9. Sarasin, A. & Mutagenbe, D. Deficiency in the catalase activity in human precancerous stages of Xeroderma pigmentosum: Comparison with XP, at and blomm's cultured fibroblasts and SV40 transformed human cell extracts.

Bioelectrochemistry Bioenerg. 232, 271–282 (1987).

- Chehab, N. H., Malikzay, A., Stavridi, E. S. & Halazonetis, T. D. Phosphorylation of Ser-20 mediates stabilization of human p53 in response to DNA damage. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96, 13777–82 (1999).
- 11. Toshiyuki, M. & Reed, J. C. Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human bax gene. *Cell* **80**, 293–299 (1995).
- 12. Canman, C. E. Activation of the ATM Kinase by Ionizing Radiation and Phosphorylation of p53. *Science* (80-. ). **281**, 1677–1679 (1998).
- 13. Tibbetts, R. S. *et al.* A role for ATR in the DNA damage-induced phosphorylation of p53. *Genes Dev.* **13**, 152–157 (1999).
- Lees-Miller, S. P., Sakaguchi, K., Ullrich, S. J., Appella, E. & Anderson, C. W. Human DNA-activated protein kinase phosphorylates serines 15 and 37 in the amino-terminal transactivation domain of human p53. *Mol. Cell. Biol.* 12, 5041– 5049 (1992).
- 15. Narendra, D. *et al.* Parkin is recruited selectively to impaired mitochondria and promotes their autophagy. *J. Cell Biol.* **183**, 795–803 (2008).
- Youle, R. J. & van der Bliek, A. M. Mitochondrial Fission, Fusion, and Stress. Science (80-. ). 337, 1062–1065 (2012).
- Gaspari, M., Larsson, N. G. & Gustafsson, C. M. The transcription machinery in mammalian mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.* 1659, 148–152 (2004).
- Shoshan-Barmatz, V., Israelson, A., Brdiczka, D. & Sheu, S. S. The voltagedependent anion channel (VDAC): function in intracellular signalling, cell life and cell death. *Curr. Pharm. Des.* 12, 2249–2270 (2006).
- Komarov, P. G. A Chemical Inhibitor of p53 That Protects Mice from the Side Effects of Cancer Therapy. *Science* (80-. ). 285, 1733–1737 (1999).
- 20. Reif, V. R. P. and A. E. Inhibition of an electron transport component by antimycin A. J. Biol. Chem. **194**, 287–297 (1952).
- Kruiswijk, F., Labuschagne, C. F. & Vousden, K. H. P53 in Survival, Death and Metabolic Health: a Lifeguard With a Licence To Kill. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 16, 393–405 (2015).
- Boveris, A. & Chance, B. The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. General properties and effect of hyperbaric oxygen. *Biochem. J.* 134, 707–716 (1973).

- Chen, Q. M. *et al.* Molecular analysis of H2O2-induced senescent-like growth arrest in normal human fibroblasts: p53 and Rb control G1 arrest but not cell replication. *Biochem. J.* 332 (Pt 1, 43–50 (1998).
- Aruoma, O. I., Halliwell, B., Hoey, B. M. & Butler, J. The antioxidant action of N-acetylcysteine: Its reaction with hydrogen peroxide, hydroxyl radical, superoxide, and hypochlorous acid. *Free Radic. Biol. Med.* 6, 593–597 (1989).
- 25. Nemzow, L., Lubin, A., Zhang, L. & Gong, F. XPC: Going where no DNA damage sensor has gone before. *DNA Repair (Amst).* **36**, 19–27 (2015).
- Adimoolam, S. & Ford, J. M. p53 and DNA damage-inducible expression of the xeroderma pigmentosum group C gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99, 12985–12990 (2002).
- Vogelstein, B., Lane, D. & Levine, A. J. Surfing the p53 network. *Nature* 408, 307–310 (2000).
- Mayo, L. D., Turchi, J. J. & Berberich, S. J. Mdm-2 Phosphorylation by DNAdependent Protein Kinase Prevents Interaction with p53 Advances in Brief Mdm-2 Phosphorylation by DNA-dependent Protein Kinase Prevents Interaction. 5013–5016 (1997).
- Park, J. Y. *et al.* p53 Improves Aerobic Exercise Capacity and Augments Skeletal Muscle Mitochondrial DNA Content. *Circ. Res.* 105, 705–712 (2009).
- Maddocks, O. D. K. & Vousden, K. H. Metabolic regulation by p53. J. Mol. Med. 89, 237–245 (2011).
- Satoaki Matoba, Ju-Gyeong Kang, Willmar D. Patino, Andrew Wragg, Manfred Boehm & Oksana Gavrilova, Paula J. Hurley, Fred Bunz, P. M. H. p53 Regulates Mitochondrial Respiration. *Science (80-. ).* 312, 1650–1653 (2006).
- 32. Zhou, S., Kachhap, S. & Singh, K. K. Mitochondrial impairment in p53-deficient human cancer cells malignancy remains unclear. Studies have indicated that was attributed to decreased protein levels of the COXII subunit encoded by the mitochondrial genome and was not due to mutation in the mi. *Mutagenesis* 18, 287–292 (2003).
- Wang, W. et al. Mitofusin-2 is a novel direct target of p53. Biochem. Biophys. Res. Commun. 400, 587–592 (2010).
- Zhang, C. *et al.* Parkin, a p53 target gene, mediates the role of p53 in glucose metabolism and the Warburg effect. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108, 16259–64 (2011).

- 35. Kulawiec, M., Ayyasamy, V. & Singh, K. K. p53 regulates mtDNA copy number and mitocheckpoint pathway. *J. Carcinog.* **8**, 8 (2009).
- Melis, J. P. M., Luijten, M., Mullenders, L. H. F. & Van Steeg, H. The role of XPC: Implications in cancer and oxidative DNA damage. *Mutat. Res. - Rev. Mutat. Res.* 728, 107–117 (2011).
- 37. Sahin, E. *et al.* Telomere dysfunction induces metabolic and mitochondrial compromise. *Nature* **470**, 359–65 (2011).
- Stout, G. J. & Blasco, M. A. Telomere length and telomerase activity impact the UV sensitivity syndrome xeroderma pigmentosum C. *Cancer Res.* 73, 1844– 1854 (2013).
- Martínez, P. *et al.* Increased telomere fragility and fusions resulting from TRF1 deficiency lead to degenerative pathologies and increased cancer in mice. *Genes Dev.* 23, 2060–2075 (2009).
- 40. Sfeir, A. *et al.* Mammalian Telomeres Resemble Fragile Sites and Require TRF1 for Efficient Replication. *Cell* **138**, 90–103 (2009).

**Figure 1**. Western blot of total protein extract from XPC <sup>-/-</sup> (-) and XPC <sup>+/+</sup> (+) cells.  $\beta$ -actin was used as loading control. The quantification of the bands is given by the mean ± standard deviation of N = 3 independent samples. (A) Western blot of XPC. (B) Western blot of p53. (C) Relative expression of p53 (p <0.0001). (D) Western blot of p- (ser20) -p53, Bax and MDM-2. (E) Relative expression of Bax (p = 0.0278).

**Figure 2**. Western blot of total protein extract from XPC  $^{-/-}$  (-) and XPC  $^{+/+}$  (+) cells.  $\beta$ -actin was used as loading control. The quantification of the bands is given by the mean  $\pm$  standard deviation of N = 3 independent samples. (A) Western blot of DNA PKcs. (B) Relative expression of DNA PK<sub>cs</sub> (p = 0.0128). (C) Western blot of Ku 70.

**Figure 3**. Western blot of the total protein extract from XPC <sup>-/-</sup> (-) and XPC <sup>+/+</sup> (+) cells.  $\beta$ -actin was used as loading control. The quantification of the bands is given by the mean ± standard deviation of N = 3 independent samples. (**A**) Western blot from Tfam, NDUFS3, UQCRC2, F1 $\alpha$ , SDHB, COX II, Parkin, PINK, LC3-I, LC3-II, mTor, Mfn1, Mfn2, VDAC1. (**B**) Relative expression of Tfam (p = 0.0020). (**C**) Relative expression of SDHB (p = 0.0254). (**D**) Relative expression of COX II (p = 0.0003). (**E**) Relative expression of Parkin (p = 0.0495). (**F**) Relative expression of Mfn2 (p = 0.0005). (**G**) Relative expression of VDAC1 (p = 0.0019).

**Figure 4.** Western blot of the total protein extract from XPC <sup>-/-</sup> (-) and XPC <sup>+/+</sup> (+) cells treated with 30  $\mu$ M of pifythrin- $\alpha$  (PFT- $\alpha$ ).  $\beta$ -actin was used as loading control. The quantification of the bands is given by the mean ± standard deviation of N = 3 independent samples. (A) Western blot of DNA PK<sub>cs</sub>, Tfam, SDHB and COX II. (B) Relative expression of DNA PK<sub>cs</sub>. (C) Relative expression of Tfam. (D) Relative expression of SDHB. (E) Relative expression of COX II. (\* p <0.05; \*\* p <0.01; \*\*\* p <0.001).

**Figure 5**. (**A**) Western blot of p53 of the total protein extract of XPC <sup>-/-</sup> (-) and XPC <sup>+/+</sup> (+) cells treated with 1  $\mu$ M antimycin A (AA).  $\beta$ -actin was used as loading control. The quantification of the bands is given by the mean ± standard deviation of N = 3 independent samples. (**B**) Relative expression of p53. (**C**) Profile of the cell cycle on linear scale corresponding to 20,000 events determined by flow cytometry. (**D**) Graph of percentages of G1, S and G2 populations. (**E**) Profile of the cell cycle on a logarithmic scale corresponding to 20,000 events determined by flow cytometry. (**F**) Graph of the percentage of sub G1 population. (\* p <0.05; \*\* p <0.01).

**Figure 6**. (**A**) Graphic of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production. **XPC**<sup>-/-</sup>: slope 7.098 ± 0.1147 (r<sup>2</sup> = 0.9985), **XPC**<sup>-/-</sup> **NAC**: slope 4,514 ± 0.1319 (r<sup>2</sup> = 0.9953). (**B**). Western blot of p53 from total protein extract of XP4-PA (XPC<sup>-/-</sup>) cells treated with N-acetylcysteine (NAC). β-actin was used as loading control. The quantification of the bands is given by the mean ± standard deviation of N = 3 independent samples. (**C**) Relative expression of p53 (p = 0.026). (**D**) Survival curve (wt: control; unXP-C: Xpc<sup>-/-</sup>; conXP-C: Xpc<sup>+/+</sup>; NAC: Xpc<sup>-/-</sup> treated with N-acetylcysteine) (**E**) Profile of cell cycle on a logarithmic scale corresponding to 50,000 events determined by flow cytometry. (**F**) Graph of the percentage of sub G1 population. (\* p <0.05; \*\*\* p <0.001).

**Figure 1**. Western blot of total protein extract from XPC <sup>-/-</sup> (-) and XPC <sup>+/+</sup> (+) cells.  $\beta$ -actin was used as loading control. The quantification of the bands is given by the mean ± standard deviation of N = 3 independent samples. (**A**) Western blot of XPC. (**B**) Western blot of p53. (**C**) Relative expression of p53 (p <0.0001). (**D**) Western blot of p- (ser20) -p53, Bax and MDM-2. (**E**) Relative expression of Bax (p = 0.0278).

**Figure 2**. Western blot of total protein extract from XPC  $^{-/-}$  (-) and XPC  $^{+/+}$  (+) cells.  $\beta$ -actin was used as loading control. The quantification of the bands is given by the mean  $\pm$  standard deviation of N = 3 independent samples. (A) Western blot of DNA PKcs. (B) Relative expression of DNA PK<sub>cs</sub> (p = 0.0128). (C) Western blot of Ku 70.

**Figure 3**. Western blot of the total protein extract from XPC <sup>-/-</sup> (-) and XPC <sup>+/+</sup> (+) cells.  $\beta$ -actin was used as loading control. The quantification of the bands is given by the mean ± standard deviation of N = 3 independent samples. (**A**) Western blot from Tfam, NDUFS3, UQCRC2, F1 $\alpha$ , SDHB, COX II, Parkin, PINK, LC3-I, LC3-II, mTor, Mfn1, Mfn2, VDAC1. (**B**) Relative expression of Tfam (p = 0.0020). (**C**) Relative expression of SDHB (p = 0.0254). (**D**) Relative expression of COX II (p = 0.0003). (**E**) Relative expression of Parkin (p = 0.0495). (**F**) Relative expression of Mfn2 (p = 0.0005). (**G**) Relative expression of VDAC1 (p = 0.0019).

**Figure 4.** Western blot of the total protein extract from XPC <sup>-/-</sup> (-) and XPC <sup>+/+</sup> (+) cells treated with 30  $\mu$ M of pifythrin- $\alpha$  (PFT- $\alpha$ ).  $\beta$ -actin was used as loading control. The quantification of the bands is given by the mean ± standard deviation of N = 3 independent samples. (A) Western blot of DNA PK<sub>cs</sub>, Tfam, SDHB and COX II. (B) Relative expression of DNA PK<sub>cs</sub>. (C) Relative expression of Tfam. (D) Relative expression of SDHB. (E) Relative expression of COX II. (\* p <0.05; \*\* p <0.01; \*\*\* p <0.001).

**Figure 5**. (**A**) Western blot of p53 of the total protein extract of XPC <sup>-/-</sup> (-) and XPC <sup>+/+</sup> (+) cells treated with 1  $\mu$ M antimycin A (AA).  $\beta$ -actin was used as loading control. The quantification of the bands is given by the mean ± standard deviation of N = 3 independent samples. (**B**) Relative expression of p53. (**C**) Profile of the cell cycle on linear scale corresponding to 20,000 events determined by flow cytometry. (**D**) Graph of percentages of G1, S and G2 populations. (**E**) Profile of the cell cycle on a logarithmic scale corresponding to 20,000 events determined by flow cytometry. (**F**) Graph of the percentage of sub G1 population. (\* p <0.05; \*\* p <0.01).

**Figure 6**. (**A**) Graphic of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production. **XPC**<sup>-/-</sup>: slope 7.098 ± 0.1147 (r<sup>2</sup> = 0.9985), **XPC**<sup>-/-</sup> **NAC**: slope 4,514 ± 0.1319 (r<sup>2</sup> = 0.9953). (**B**). Western blot of p53 from total protein extract of XP4-PA (XPC<sup>-/-</sup>) cells treated with N-acetylcysteine (NAC). β-actin was used as loading control. The quantification of the bands is given by the mean ± standard deviation of N = 3 independent samples. (**C**) Relative expression of p53 (p = 0.026). (**D**) Survival curve (wt: control; unXP-C: Xpc<sup>-/-</sup>; conXP-C: Xpc<sup>+/+</sup>; NAC: Xpc<sup>-/-</sup> treated with N-acetylcysteine) (**E**) Profile of cell cycle on a logarithmic scale corresponding to 50,000 events determined by flow cytometry. (**F**) Graph of the percentage of sub G1 population. (\* p <0.05; \*\*\* p <0.001).

Figure 1



Figure 2





С



### Figure 3





### 105



Figure 4



Α







С








Ε



## Figure 6

