Leticia Koch Lerner

Papel das proteínas XPD e DNA polimerase eta nas respostas de células humanas a danos no genoma

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em Ciências

Programa de Oncologia

Orientador: Prof. Dr. Carlos Frederico Martins Menck

Versão corrigida, conforme Resolução CoPGr 6018, de 13/10/11

São Paulo
2014

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Lerner, Leticia Koch
Papel das proteínas XPD e DNA polimerase eta nas respostas de células humanas a danos no genoma / Leticia Koch Lerner. -- São Paulo, 2014.
Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Programa de Oncologia.
Orientador: Carlos Frederico Martins Menck.

Descritores: 1.Reparo do DNA 2.Xeroderma pigmentoso 3.Síndrome de Cockayne 4.Síndrome do tricotiodistrofia 5.Proteína grupo D do xeroderma pigmentoso 6.Estresse oxidativo 7.Azul de metileno/toxicidade 8.Fibroblastos/efeitos de radiação 9.DNA polimerase dirigida por DNA 10.Instabilidade genômica 1. Hipermutação somática de imunoglobulina

USP/FM/DBD-148/14

MEDICINA
USP

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de **09.02.2011, APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº**294/10** intitulado: **" Reparo por Excisão de Nucleotídeos e remoção de danos oxidativos no material genético de fibroblastos humanos"** e seus anexos, apresentado pelo Departamento de **Radiologia.**

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar ao CEP-FMUSP, os relatórios parciais e final sobre a pesquisa.

Pesquisador (a) Responsável: Carlos Frederico Martins Menck
Pesquisador (a) Executante: Leticia Koch Lerner

CEP-FMUSP, 09 de fevereiro de 2011.

Prof. Dr. Daniel Romero Muñoz
Vice-coordenador
Comitê de Ética em Pesquisa

Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
Av. Dr. Arnaldo , 455 – Instituto Oscar Freire 1º andar CEP 01246903 – Fone : 3061-8004
mail: cep.fmusp@hcnet.usp.br

Aos pacientes Xeroderma Pigmentosum, que há quase 50 anos contribuem para o avanço do conhecimento e nos permitem realizar nossas pesquisas através da doação de suas amostras.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Carlos Menck, pela oportunidade de realizar minha tese em seu laboratório. É uma honra fazer parte da sua equipe e ter a oportunidade de conviver com um pesquisador que continua apaixonado pela ciência, e que, além de orientador, continua sendo meu professor, desde o início da graduação, até o fim do doutorado. Sua vontade de fazer uma pesquisa séria, honesta e de qualidade, além da sua vontade de poder ajudar, nem que seja um pouco, a melhorar a vida dos pacientes XP, me deram forças pra continuar nos dias difíceis. Tenho certeza que não teria feito uma tese melhor se tivesse outro orientador. E no fim de quatro anos de convivência diária, encontrei dois defeitos: ele está certo em 99% das vezes, e é palmeirense roxo.

A todos os membros desse laboratório incrível, que tornam a rotina no laboratório um ótimo motivo pra se ir trabalhar todo dia. Nesse lab não encontrei somente colegas, mas sim amigos de verdade. Muito obrigada por toda a ajuda, e não só em termos laboratoriais ou científicos. Um agradecimento especial às meninas: Ligia (companheira dentro e fora do laboratório), Camila (opa, professora Camila!), Annabel, Natália, Nilmara, Juliana, Luciana, Marinas, Alessandra e Huma. E também aos amiguinhos, Alexandre, Leonardo, Satoru e Davi. Um agradecimento mais que especial à Veri, que faz o lab funcionar, e à Clarissa, por toda a ajuda com os experimentos mais legais do mundo. E um mais especial ainda pra Maria Helena, que não só ajuda com a bagunça incrível que aparece todo dia na sala de lavagem, mas que é principalmente um exemplo de vida pra todos que a conhecem. Muito obrigada pela alegria que foi conviver com todos vocês durante esses pouco mais de quatro anos de lab! Afinal, a gente ganha pouco, trabalha muito, mas se diverte!

Agradeço também às ex-membros do lab, Carol Quayle, companheira desde tempos imemoriáveis, e principalmente à Daniela Soltys, que me ensinou quase todos os experimentos que eu aprendi a fazer nesse lab. Mesmo não estando mais juntas todo dia, vocês continuam fazendo parte da minha vida.

Às minhas amigas do ex-lab do dr. Luiz Fernando Lima Reis, que continuam me ajudando, com questões científicas ou não, e que continuam comigo nos momentos de

alegria e também de desespero: Nair (pra sempre minha mestra), Barbara, Juliana e Aline. Ao meu amigo da Bio, Fabio (Japão), que continua ouvindo meus papos de bióloga de laboratório há 12 anos, sempre com muita paciência.

A todos os membros da unidade 8200 do Institut Gustave Roussy, que me acolheram muito bem desde meu primeiro dia de estágio no exterior. Merci beaucoup aux filles qui m'ont pas laissée seule même pas pour un moment: Camille, Emma, Sana, Noémie, Indiana, Emilie, Julie et Vy. Merci à Xavier, qui est devenu plus qu'un collegue du labo, et qui m'as beaucoup aidé depuis mon premier jour dans l'unité. Merci à Patricia Kannouche, pour m'accepter comme membre de cette unité. Et merci beaucoup à mes directeurs d'estage Said Aoufouchi et Alain Sarasin, pour l'opportunité de faire partie de votre labo pendant une année; c'était une honneur et une joie de vous connaître. Merci beaucoup!

Muito obrigada à minha família, que sempre me apoiou nessa vida de cientista desde a escolha da faculdade: Cynthia, Guilherme, e principalmente aos meus pais, Leonardo e Ana Rosa, sempre preocupados com os experimentos, prazos, provas, apresentações, mas principalmente, com a minha felicidade. Muito obrigada por me permitirem seguir em frente, e por me apoiarem nas minhas decisões. Agradeço também aos meus avós, Mafalda e Karl, que mesmo não tendo a menor ideia do que se faz num laboratório, estão sempre preocupados em saber se eu continuo trabalhando muito e ganhando pouco. Faz parte vô; afinal, você que me ensinou: a vida é dura pra quem é mole (Koch, comunicação pessoal).

Um agradecimento muito especial aos pacientes XP da comunidade de Araras, em especial à Gleice Machado, fundadora da Associação Brasileira de Xeroderma Pigmentosum (ABRAXP), uma das pessoas mais fortes que eu já conheci. Agradeço muito pela oportunidade de conhecer um pouco da rotina dessa comunidade, foi um privilégio para mim poder conhecê-los. Agradeço imensamente aos pacientes e controles que nos forneceram suas amostras, permitindo a realização não só desse mas de inúmeros trabalhos científicos. Todos são pessoas muito especiais.

À FAPESP e à CAPES, pelo apoio financeiro que me permitiram realizar esse trabalho.

“Two years work wasted, I have been breeding those flies for all that time and I´ve got nothing out of it.”

Thomas Hunt Morgan

Esta tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3a ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

SUMÁRIO

Lista de abreviaturas, símbolos e siglas
Lista de figuras
Lista de tabelas
Lista de anexos
Resumo
Summary
1 INTRODUÇÃO.....1
1.1 Agentes capazes de danificar o DNA.....2
1.1.2 Luz ultravioleta (UV).....3
1.1.3 Espécies Reativas de Oxigênio (ERO) e estresse oxidativo.....5
1.1.4 Estresse oxidativo e dano ao DNA.....8
1.1.5 Azul de metileno (MB).....11
1.2 Vias de Reparo do DNA.....12
1.2.1 Reparo Direto.....12
1.2.2 Reparo de quebras na fita dupla (DSBs).....14
1.2.3 Reparo de Emparelhamento Errôneo (MMR, de *Mismatch Repair*).....15
1.2.4 Reparo de ligações cruzadas (ICLs, de *Interstrand Cross-Links*).....16
1.2.5 Reparo por Excisão de Base (BER).....17
1.2.6 Reparo por Excisão de Nucleotídeos (NER).....20
1.3 Mecanismos de tolerância a dano: síntese translesão (TLS).....27
1.4 Doenças relacionadas à deficiência nos genes de reparo.....30
1.4.1 Doenças relacionadas à deficiência em NER.....30
1.4.2 Xeroderma Pigmentosum (XP).....30
1.4.3 Síndrome de Cockayne (CS).....33
1.4.4 Tricotiodistrofia (TTD).....36
1.4.5 Mutações em *XPD/ERCC2*.....37
1.5 Xeroderma Pigmentosum Variante (XP-V).....42
1.5.1 O papel de pol η no processo de Hipermutação Somática (SHM).....43
1.6 Participação de NER no reparo de danos causados por estresse oxidativo.....45
2 OBJETIVOS.....48
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....49
3.1 Linhagens celulares.....49

3.2 Tratamentos com agentes oxidantes: Azul de Metileno (MB) e Bromato de Potássio ($KBrO_3$).....51
3.3 Tratamentos com inibidores: cafeína, 3-Aminobenzamida (3-Ab) e pifitrina-α.....52
3.4 Irradiação com luz UVC.....52
3.5 Sobrevivência clonogênica.....53
3.6 Ensaios de viabilidade com XTT.....53
3.7 Ensaios de fluorescência para detecção de apoptose/necrose.....53
3.8 Ensaios de complementação.....55
3.9 Ensaios de *Host Cell Reactivation* (HCR).....54
3.10 Extração de proteínas e Western Blot (WB).....55
3.11 Marcações para citometria: PI, PI + γ-H2AX, PI + Caspase 3 ativada, PI + BrdU.....57
3.12 *DNA Fiber Assay*.....58
3.13 Silenciamento por siRNA.....59
3.14 PCR Tempo Real (*Real Time PCR*).....60
3.15 Ensaio de Cometa alcalino (*Single Cell Gel Eletrophoresis*).....60
3.16 Análises estatísticas.....61
3.17 Análise do perfil de Hipermutação Somática de pacientes XP-V.....62
3.17.1 Pacientes.....62
3.17.2 Isolamento de células B de memória.....62
3.17.3 PCR, clonagem e sequenciamento.....63
3.17.4 Análise das mutações.....64
4 RESULTADOS.....65
4.1 Resposta das células com diferentes mutações em *XPD/ERCC2* ao estresse oxidativo.....65
4.1.1 Sensibilidade das células XP-D, XP-D/CS e TTD/XPD ao estresse oxidativo.....65
4.1.2 Complementação das deficiências em reparo das células mutadas com o cDNA do gene *XPD/ERCC2*.....67
4.1.3 Alterações no ciclo celular após estresse oxidativo.....68
4.1.4 Análise dos mecanismos de morte em resposta a danos no DNA.....72
4.1.5 Análise da sinalização em resposta a danos no DNA.....76
4.1.6 Resposta das células deficientes em NER ao estresse oxidativo após modulação da via de BER.....77
4.1.7 Diferenças na capacidade de reparo de danos genotóxicos em DNA plasmidial entre as células com mutações em *XPD*: Ensaios de *Host Cell Reactivation* (HCR).....80

4.1.8 Diferenças na capacidade de reparo de quebras geradas pelo tratamento com MB fotoativado.....81

4.2 Resposta das células com diferentes mutações em *POLH* ao estresse oxidativo.....83

4.2.1 Linhagens de fibroblastos de pacientes XP-V brasileiros utilizadas neste estudo.....83

4.2.2 Sensibilidade das células XP-V ao estresse oxidativo.....87

4.2.3 Alterações no ciclo celular após estresse oxidativo.....89

4.2.4 Análise da população em apoptose após estresse oxidativo.....91

4.2.5 Capacidade de reparo de quebras geradas pelo tratamento com MB fotoativado.....93

4.3 Indução da proteína DNA polimerase η após danos genotóxicos.....94

4.3.1 Cinética de indução e dependência de p53.....94

4.3.2 Pré-dose de UVC induz diferenças na distribuição do ciclo celular e diminuição da população em apoptose após doses elevadas de UVC.....96

4.3.3 Pré-dose de UVC induz aumento da capacidade de replicação de DNA.....97

4.3.4 DNA polimerase η é essencial para o aumento da sobrevivência celular induzido pela pré-dose de UVC.....100

4.4 Determinação da funcionalidade da proteína DNA polimerase η nas células de pacientes XP-V através do sequenciamento dos genes variáveis das imunoglobulinas.....101

4.4.1 Confirmação do diagnóstico da síndrome XP-V com base no perfil das mutações dos genes variáveis das imunoglobulinas.....101

4.4.2 Análise dos tipos de mutações encontradas nas regiões sequenciadas.....104

5 DISCUSSÃO.....108

5.1 Estresse oxidativo e homeostase celular.....108

5.1.1 Estresse oxidativo e doenças neurológicas em pacientes com síndromes associadas a deficiências em reparo.....109

5.1.2 Sensibilidade das células deficientes em XPD frente ao estresse oxidativo.....111

5.1.3 Diferenças entre os mecanismos de morte celular entre as células deficientes em XPD frente ao estresse oxidativo.....116

5.1.4 Interações entre as vias de BER e NER no reparo de lesões causadas por estresse oxidativo.....120

5.1.5 Capacidade de reparo e/ou retomada da transcrição após danos genotóxicos causados por estresse oxidativo das células com mutações em *XPD*.....123

5.1.6 Sensisbilidade das células XP-V aos danos genotóxicos causados por estresse oxidativo.....126

5.2 Indução da DNA polimerase η após estresse genotóxico e suas consequências nas respostas celulares.....131

5.3 Determinação da funcionalidade da proteína DNA polimerase η nas células de pacientes XP-V através do padrão de mutações dos genes variáveis das imunoglobulinas após Hipermutação Somática.....136

5.3.1 Papel da DNA polimerase η na manutenção da região dos genes variáveis de imunoglobulinas em idosos.....137

6 CONCLUSÕES.....139

7 ANEXOS.....141

Anexo 1: Artigo publicado.....142

Anexo 2: Tabela com as sequências dos *primers* utilizados.....153

8 REFERÊNCIAS.....154

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E SIGLAS

$^1O_2$: oxigênio singlete

3-Ab: 3-aminobenzamida

6-4 PP: fotoproduto pirimidina 6-4 pirimidona (do inglês *6-4 Photoproduct*)

8-oxo ou 8-OHdG: 8-hidroxi-2´-desoxiguanosina

BER: reparo por excisão de base (do inglês *Base Excision Repair*)

BSA: *bovine serum albumine*

cIAP: *cellular Inhibitor of Apoptosis Protein*

CNS: sistema nervosa central (do inglês *Central Nervous System*)

CPD: dímero de pirimidina ciclobutano (do inglês *cis-syn Cyclobutane Pyrimidine Dimers*)

CS: Síndrome de Cockayne (do inglês *Cockayne Syndrome*)

DDR: resposta a danos no DNA (do inglês *DNA Damage Response*)

DMEM: *Dulbecco´s Modified Eagle Medium*

DNA: ácido desoxirribonucleico

DOXO: doxorrubicina

DSB: quebra na fita dupla da molécula de DNA (do inglês *Double Strand Break*)

ERO: Espécies Reativas de Oxigênio

FA: Anemia de Fanconi (do inglês *Fanconi anaemia*)

FADD: *Fas-Associated Death Domain*

FISH: *Fluorescent In Situ Hybridization*

FLIP: *Flice-Like Inhibitory Protein*

GGR: reparo do genoma global (do inglês *Global Genome Repair*)

H_2O_2: peróxido de hidrogênio

HCR: reativação pela célula hospedeira (do inglês *Host Cell Reactivation*)

HPA: hidrocarboneto policíclico aromático

HR: reparo por recombinação homóloga (do inglês *Homologous Recombination*)

ICL: ligações cruzadas entre as fitas do DNA (do inglês *Interstrand Cross-Link*)

IR: radiação ionizante (do inglês *Ionizing Radiation*)

IRES: *Internal Ribosome Entry Site*

JNK: JUN quinase

$KBrO_3$: bromato de potássio

LPO: peroxidação de lipídeos (do inglês *Lipid Peroxidation*)

MB: azul de metileno (do inglês *methylene blue*)

MGMT: metilguanina-DNA-metiltransferase

MLKL: *Mixed Lineage Kinase Domain-Like*

MMC: mitomicina C

MMR: reparo por emparelhamento errôneo (do inglês *Mismatch Repair*)

MMS: metilmetanosulfonato

NER: reparo por excisão de nucleotídeos (do inglês *Nucleotide Excision Repair*)

NF-κB: *Nuclear Factor-κB*

NHEJ: reparo pela junção de extremidades não-homólogas (do inglês *NonHomologous End Joining*)

$NO^{\bullet}$: radical óxido nítrico

$O_2^{\bullet -}$: radical superóxido

$OH^{\bullet}$: radical hidroxila

PARP: Poli(ADP-ribose) polimerase

PBMC: células mononucleadas do sangue periférico (do inglês *Peripheral Blood Mononuclear Cells*)

PBS: *Phosphate buffered saline*

PCNA: *Proliferating Cell Nuclear Antigen*

PCR: reação em cadeia da polimerase (do inglês *Polymerase Chain Reaction*)

PI: iodeto de propídio (do inglês *Propidium Iodide*)

RFC: *Replication Factor C*

RIPK: *Receptor Interacting Protein Kinase*

RNA: ácido ribonucleico

RPA: *Replication Protein A*

SFB: soro fetal bovino

Sítio AP: sítio abásico (apurínico/apirimidínico)

SHM: hipermutação somática (do inglês *Somatic Hypermutation*)

siRNA: RNA de interferência (do inglês *small interfering RNA*)

SOD: superóxido dismutase ($O_2^{\bullet -} + O_2^{\bullet -} + 2H^+ \rightarrow O_2 + H_2O_2$)

SSB: quebra na fita simples (do inglês *Single Strand Break*) da molécula de DNA

ssDNA: DNA simples fita (do inglês *single-stranded DNA*)

TBS: *Tris buffered saline*

TCR (ou TC-NER): reparo acoplado à transcrição (do inglês *Transcription-Coupled Repair)*

TFIIH: fator de transcrição (do inglês *Transcription Factor*) IIH

TLS: síntese translesão (do inglês *Translesion Synthesis*)

TNF: *Tumor Necrosis Factor*

TRADD: *TNFR1-Associated Death Domain*

TTD: tricotiodistrofia

UV: luz ultravioleta

UVA: luz ultravioleta no comprimento de onda de 315 a 400 nm

UVB: luz ultravioleta no comprimento de onda de 280 a 315 nm

UVC: luz ultravioleta no comprimento de onda de 200 a 280 nm

UVSS: Síndrome UV-Sensível (do inglês *UV-Sensitive Syndrome*)

XFE: Síndrome XPF-ERCC1

XP: Xeroderma Pigmentosum

XTT: sal tetrazolium

WB: *Western Blot*

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Agentes genotóxicos e exemplos de lesões induzidas por esses agentes

Figura 2: Estrutura química dos fotoprodutos

Figura 3: Orbitais moleculares do oxigênio e de algumas espécies radicalares e não radicalares derivadas

Figura 4: Estruturas de algumas das principais bases oxidadas formadas por ROS no DNA, além de um exemplo de uma lesão em tandem e de uma lesão do tipo *cross-link* DNA-proteína

Figura 5: Mecanismo de Reparo por Excisão de Base (BER)

Figura 6: Mecanismo de Reparo por Excisão de Nucleotídeo (NER)

Figura 7: Mecanismo de Síntese Translesão (TLS)

Figura 8: Domínios funcionais, estrutura e mutações da proteína XPD

Figura 9: Plasmídeo pSHIRES-XPD utilizado nos ensaios de complementação

Figura 10: Esquema da separação das PBMCs por gradiente de ficol após centrifugação

Figura 11: Sensibilidade de células com mutações em *XPD* após tratamento com Azul de Metileno fotoativado, determinado por XTT (A) e sobrevivência clonogênica (B)

Figura 12: Sensibilidade das células primárias com mutações em *XPD* após tratamento com Azul de Metileno fotoativado, através de ensaios de XTT

Figura 13: Sensibilidade das células com mutações em *XPD* ao tratamento com bromato de potássio ($KBrO_3$), através de ensaios de XTT

Figura 14: Complementação da deficiência em reparo de danos genotóxicos causados por Azul de Metileno fotoativado (A) e luz UVC (B) em células com diferentes mutações em *XPD* pelo cDNA do gene *XPD/ERCC2*

Figura 15: Células com mutações em *XPD* apresentam um bloqueio em G2/M 48 horas após tratamento com Azul de Metileno fotoativado

Figura 16: Células primárias com diferentes mutações em *XPD* apresentam bloqueio em G2/M 48 horas após tratamento com Azul de Metileno fotoativado

Figura 17: Aumento da população em apoptose (Sub-G1) em resposta ao tratamento com MB + luz nas células com mutações em *XPD*

Figura 18: Aumento da população em apoptose (Sub-G1) em resposta ao tratamento com concentrações crescentes de $KBrO_3$ nas células com mutações em *XPD*

Figura 19: Ativação de caspase 3 após tratamento com concentrações crescentes de MB fotoativado nas células com mutações em *XPD*

Figura 20: Análise do tipo de morte celular em resposta ao tratamento com MB fotoativado através de corantes fluorescentes (DAF, PI e Hoechst)

Figura 21: Presença de danos no DNA (γ-H2AX) após tratamento com MB fotoativado nas células deficientes em XPD

Figura 22: Ação do inibidor de PARP (3-Ab) na viabilidade de células tratadas com MB fotoativado

Figura 23: Efeito do silenciamento da expressão de OGG1 e pol β na sobrevivência das células deficientes em XPD após tratamento com concentrações crescentes (0, 2, 4 e 8 μM) de MB fotoativado

Figura 24: Diminuição da capacidade de reparo de danos genotóxicos causados em DNA plasmidial tratado com A: MB fotoativado e B: luz UVC nas células com diferentes mutações em *XPD*

Figura 25: Cinética de reparo de quebras causadas pelo tratamento com concentrações crescentes (0, 4 e 8 μM) de MB fotoativado em células selvagens e com mutações em XPD

Figura 26: Sensibilidade das células primárias do paciente XP05SP ao tratamento com UVC na presença de cafeína, determinado por XTT

Figura 27: Expressão da proteína DNA polimerase η (XPV) em fibroblastos primários após irradiação com luz UVC

Figura 28: Expressão da proteína DNA polimerase η (XPV) em fibroblastos primários dos pacientes de Araras

Figura 29: Sensibilidade de células com mutações em *POLH* após tratamento com Azul de Metileno fotoativado, determinado por XTT (A) e sobrevivência clonogênica (B)

Figura 30: Sensibilidade das células primárias com mutações em *POLH* ao tratamento com Azul de Metileno fotoativado, determinado por XTT

Figura 31: Sensibilidade das células com mutações em *POLH* ao tratamento com bromato de potássio ($KBrO_3$), determinado por XTT

Figura 32: Diferentes linhagens de células XP-V apresentam um bloqueio no ciclo celular 48 horas após tratamento com Azul de Metileno fotoativado

Figura 33: As células primárias com mutações em *POLH* apresentam diferenças no bloqueio do ciclo celular, após tratamento com Azul de Metileno fotoativado

Figura 34: Presença de danos no DNA (γ-H2AX) após tratamento com MB fotoativado nas células deficientes na DNA polimerase η

Figura 35: Aumento da população em apoptose (Sub-G1) após tratamento com MB fotoativado nas células deficientes na DNA polimerase η

Figura 36: Ativação de caspase 3 72 horas após tratamento com concentrações crescentes de MB fotoativado nas células XP-V

Figura 37: Cinética de reparo de quebras causadas pelo tratamento com concentrações crescentes (0, 4 e 8 μM) de MB fotoativado em células selvagens e XP-V

Figura 38: Expressão da proteína DNA polimerase η (XPV) em fibroblastos transformados por SV40 após irradiação com luz UVC

Figura 39: Inibição da indução da proteína pol η após irradiação com luz UVC em fibroblastos primários pelo tratamento com inibidor de p53 (pifitrina-α)

Figura 40: Pré-dose de UVC induz diferenças na distribuição do ciclo celular e diminuição da população em apoptose após doses altas de UVC em fibroblastos primários XP-C

Figura 41: Pré-dose de UVC leva ao aumento da população em S 24 horas após doses altas de UVC em fibroblastos primários XP-C

Figura 42: Pré-dose de UVC leva ao aumento da capacidade de sintetizar cadeias maiores de DNA após doses altas de UVC em fibroblastos primários normais e deficientes em GG-NER (XP-C)

Figura 43: Efeitos do silenciamento do gene *POLH* sobre fibroblastos primários XP-C após doses repetidas de UVC

Figura 44: Análise da expressão da proteína pol η em fibroblastos primários de pacientes XP-V

Figura 45: Aumento na frequência de mutações e na instabilidade genômica em pacientes XP-V idosos

Figura 46: Aumento na frequência de mutações das regiões J_H-FR3 dos genes variáveis das imunoglobulinas em função da idade dos indivíduos

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Manifestações clínicas dos pacientes com mutações no gene *XPD*.

Tabela 2: Idade, tipo de mutação e padrão de Hipermutação Somática dos pacientes estudados neste projeto

Tabela 3: Idade e frequências de mutações das regiões J_H-FR3 dos genes variáveis das imunoglobulinas, dos pacientes e controles

Tabela 4: Características das mutações encontradas nas regiões J_H-FR3 dos genes variáveis das imunoglobulinas dos pacientes XP-V idosos e nos controles

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1: Paper publicado. Rocha CR e Lerner LK, Okamoto OK, Marchetto MC, Menck CF. The role of DNA repair in the pluripotency and differentiation of human stem cells. Mutat Res 752(1): 25-35, 2013.

Anexo 2: Tabela com as sequências dos *primers* utilizados.

RESUMO

Lerner LK. *Papel das proteínas XPD e DNA polimerase eta nas respostas de células humanas a danos no genoma* [Tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2014.

A via de Reparo por Excisão de Nucleotídeos (NER) é responsável pelo reparo das lesões causadas pela luz ultravioleta (UV) e de outras lesões capazes de distorcer a dupla hélice, bloqueando a replicação e a transcrição. Os pacientes que apresentam as síndromes recessivas raras Xeroderma Pigmentosum (XP), tricotiodistrofia (TTD) e síndrome de Cockayne (CS) possuem mutações em algum dos 11 genes relacionados ao NER e à transcrição basal. Mutações na proteína XPD levam ao surgimento de diferentes fenótipos: XP, TTD, XP/CS ou COFS (*Cerebro-Oculo-Facio-Skeletal Syndrome*), uma forma rara de CS. Os pacientes XP apresentam alta incidência de câncer de pele, o que não ocorre com os pacientes TTD e CS, além de poderem apresentar perda neuronal progressiva, enquanto todos os CS e TTD apresentam uma diminuição na mielinização do cérebro. As neuropatologias são provavelmente associadas a problemas no reparo de danos endógenos no DNA das células nervosas. Diversos trabalhos mostraram o envolvimento do NER no reparo desses danos, os quais pensava-se serem reparados apenas por outro mecanismo, o Reparo por Excisão de Base. Neste trabalho mostramos que fibroblastos de pacientes XP-D, XP-D/CS e TTD, portadores de mutações em XPD, são sensíveis ao estresse oxidativo induzido pelo tratamento com azul de metileno fotoativado, apresentando bloqueio prolongado no ciclo celular e permanência da sinalização de danos ao DNA. A complementação das diferentes linhagens com o gene *XPD/ERCC2* foi capaz de restaurar a sobrevivência celular. Foram detectadas diferenças importantes na capacidade de reparo/retomada da transcrição após danos gerados por estresse oxidativo em DNA plasmidial, além da ativação de vias diferentes de morte celular: fibroblastos XP-D apresentam maior capacidade de reparo e apresentam morte por apoptose após estresse oxidativo, enquanto os fibroblastos XP-D/CS e TTD apresentam menor capacidade de reparo ativação de mais de uma via de morte celular (apoptose e necrose), diferenças que podem estar ligadas ao fenótipo dos pacientes. Mutações no gene codificante para a DNA polimerase η, *POLH,* estão associadas à forma variante de XP (XP-V). Pol η é uma polimerase especializada na síntese translesão (TLS) de fotoprodutos, além de estar implicada na TLS de outros tipos de lesões como bases oxidadas, e em vias não relacionadas à TLS como a hipermutação somática e à replicação de regiões de DNA com arquiteturas não-canônicas. Neste trabalho mostramos que os fibroblastos de pacientes XP-V apresentam sensibilidade ao estresse oxidativo. Mostramos uma indução da proteína pol η em fibroblastos primários após danos genotóxicos, associada ao aumento da capacidade de lidar com a parada na forquilha de replicação, possibilitando a continuidade da replicação do DNA e ao aumento da sobrevivência celular. Mostramos uma diferença na estabilidade genômica nos genes das imunoglobulinas dos pacientes XP-V idosos em comparação com os pacientes jovens e controles de idade pareada, mostrando que a ausência dessa polimerase pode estar ligada ao aumento da instabilidade genômica nesses genes.

Descritores: Reparo do DNA; Xeroderma pigmentoso; Síndrome de Cockayne; Síndrome do tricotiodistrofia; Proteína grupo D do xeroderma pigmentoso; Estresse oxidativo; Azul de metileno/toxicidade; Fibroblastos/efeitos de radiação; DNA polimerase dirigida por DNA; Instabilidade genômica; Hipermutação somática de imunoglobulina.

SUMMARY

Lerner LK. *Role of XPD and DNA polymerase eta in the response of human cells to DNA damage* [Thesis]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2014.

The Nucleotide Excision Repair (NER) pathway is responsible for the repair of UV photoproducts and other bulky lesions that block both replication and transcription. Patients with the rare recessive disorders Xeroderma Pigmentosum (XP), trichothiodystrophy (TTD) and Cockayne Syndrome (CS) carry mutations in one of the 11 NER genes, linked to repair and basal transcription. Mutations in XPD lead to different phenotypes: XP, TTD, XP/CS or COFS (Cerebro-Oculo-Facio-Skeletal Syndrome), a rare form of CS. XP patients have high incidence of skin cancer, which does not occur in TTD or CS patients, although ther may present neurodegeneration, while all CS and TTD patients have neurodevelopmental symptoms linked to dysmielynation. The pathology of these neurological diseases is probably associated with deficient repair of DNA lesions in nervous cells, generated by endogenous processes. Many groups including ours have demonstrated the involvement of NER in the repair of these lesions, previously thought to be exclusively repaired by Base Excision Repair. In this work we show high sensitivity of both primary and transformed XP-D, XP-D/CS and TTD human fibroblasts in response to oxidative stress generated by photoactivated methylene blue, with prolonged cell cycle arrest and DNA damage signaling. The complementation of the three different cell lines with the *XPD/ERCC2* gene was able to restore cell survival. We detected important differences in repair capacity/transcription resumption after damage generated by oxidative stress in plasmid DNA, besides the activation of different cell death pathways: XP-D cells have higher repair capacity and die by apoptosis, while XP-D/CS and TTD cells have little repair capacity and activate more than one death pathway (apoptosis and necrosis). We believe these differences can be related to the patients' phenotypes. Mutations in DNA polymerase η coding gene, *POLH*, are associated with the variant form of XP (XP-V). Pol η is a translesion synthesis (TLS) polymerase specialized in the TLS past CPD photoproducts, besides other lesions like oxidized bases, and in other processes like somatic hypermutation and DNA replication in structured regions. In this work we show XP-V human fibroblasts are sensitive to oxidative stress. We detected an induction of pol η after genotoxic stress in primary cells, associated with increased ability to deal with the stalled replication fork, and consequently to DNA replication restart and cell survival. In addition, we detected a difference in genomic stability in immunoglobulin genes in aged XP-V patients in comparison to both young patients and age-matched controls, showing the absence of this polymerase may be linked to increased genomic instability in these genes.

Descriptors: DNA repair; Xeroderma pigmentosum; Cockayne syndrome; Trichothiodystrophy syndromes; Xeroderma pigmentosum group D protein; Oxidative stress; Methylene blue/toxicity; Fibroblasts/radiation effects; DNA-directed DNA polymerase/radiation effects; Genomic instability; Somatic hypermutation, immunoglobulin.

1. INTRODUÇÃO

O DNA é a molécula orgânica detentora da informação genética de todos os organismos vivos, sejam procariontes ou eucariontes; assim, é a biomolécula responsável pelo desenvolvimento e funcionamento dos organismos, assim como pela transmissão da informação genética para as próximas gerações. Entretanto, apesar da grande importância dessa molécula na manutenção da vida e na hereditariedade, sua estrutura química apresenta certa instabilidade. Diversas alterações espontâneas, decorrentes da instabilidade química inerente das ligações específicas dos nucleotídeos, podem ocorrer durante o metabolismo celular, como desemparelhamentos, desaminações e perdas de bases, gerando sítios abásicos (Lindahl, 1993). De fato, por exemplo, em células com genomas de tamanho grande como os humanos, estima-se que ocorram entre 2000 e 10.000 perdas de bases purínicas por dia, através de hidrólise espontânea (Lindahl e Nyberg, 1972).

Além de alterações espontâneas, os genomas celulares estão constantemente em contato com uma grande variedade de agentes endógenos e exógenos que danificam o DNA, e podem levar a morte celular e mutagênese, com consequências em processos fisiológicos, como o envelhecimento, e patológicos, como doenças neurodegenerativas e câncer (Friedberg et al, 2004). Apesar dos eventos mutagênicos serem essenciais para os processos evolutivos, eles são em sua maioria deletérios para o funcionamento normal da célula e do organismo como um todo. Assim, ao longo da evolução, os organismos desenvolveram diversos mecanismos de resposta à presença de agentes genotóxicos e aos danos que eles causam às células, assim como à própria instabilidade da molécula do DNA em si, como os mecanismos de sinalização, reparo e tolerância aos diferentes tipos de dano que podem ocorrer no genoma.

Uma vez que a célula é exposta a agentes genotóxicos, ocorre uma série de modificações na fisiologia celular, seja como resposta ou como consequência dos danos (Lombard et al, 2005). Entre essas alterações no metabolismo celular estão a remoção dos danos e restauração da integridade da dupla fita pelo reparo de DNA, a ativação de mecanismos de *checkpoint*, respostas transcricionais (que incluem tanto a

ativação de genes como a inibição do processo transcricional), a indução de mecanismos de morte celular (como a apoptose) ou de tolerância aos danos, e, em situações nas quais os danos não foram reparados, a eventos mutagênicos (Sancar et al, 2004).

1.1 Agentes capazes de danificar o DNA

Existem diferentes tipos de lesões que podem alterar a estrutura do DNA, causadas por agentes químicos e físicos, tanto de origem exógena e endógena (Hoeijmakers, 2001)(Figura 1). Além das lesões espontâneas, ligadas à instabilidade da molécula do DNA, e das lesões que podem ocorrem durante o metabolismo normal do DNA, como erros de replicação, outra fonte endógena de danos estão as espécies reativas de oxigênio (ERO), formadas por exemplo durante a respiração celular ou a resposta imune (Lambeth, 2004).

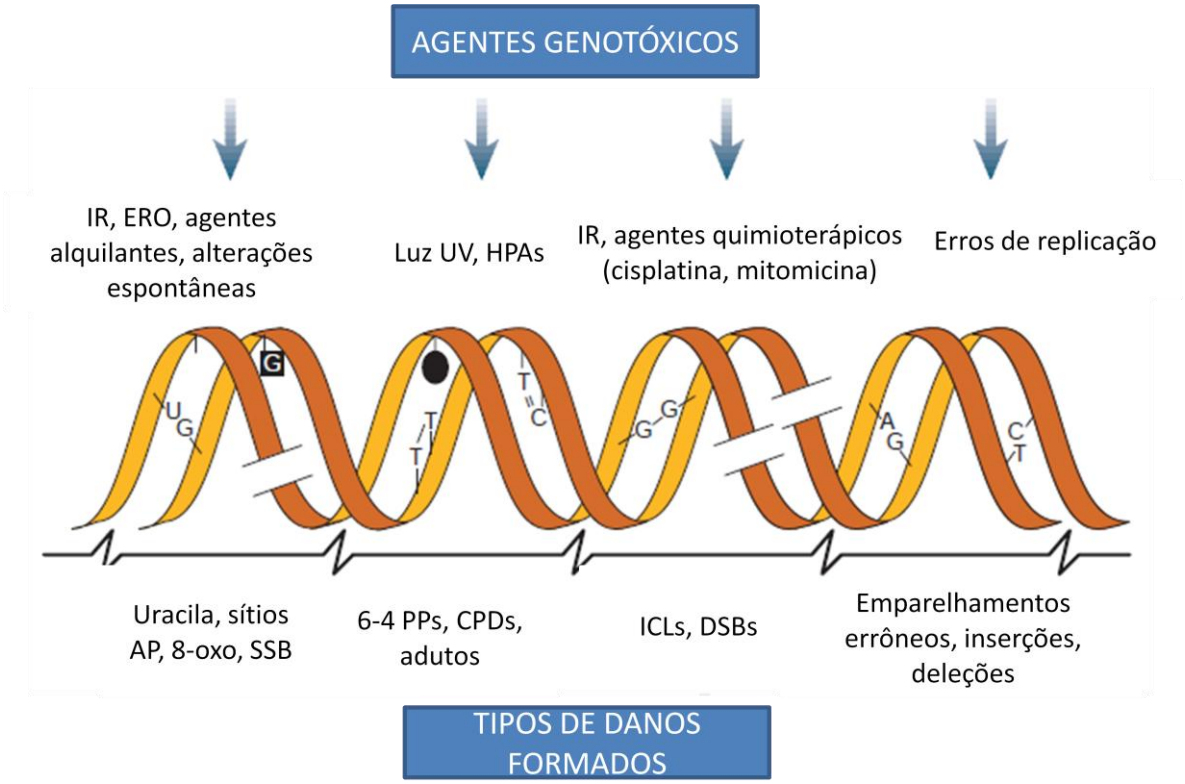


Figura 1: Agentes genotóxicos e exemplos de lesões induzidas por esses agentes. Adaptada de Hoeijmakers, 2001.

Dentre os agentes químicos exógenos estão os agentes quimioterápicos, como a cisplatina, a mitomicina e outros agentes alquilantes, a doxorrubicina, agentes radiomiméticos como a bleomicina, inibidores das topoisomerases I e II como a camptotecina e o etoposídeo, além de muitas outras substâncias que causam diversos tipos de danos ao DNA e são utilizados como drogas antitumorais (Helleday et al, 2008). Além dos agentes quimioterápicos, outros agentes químicos exógenos, como diversos componentes da fumaça do cigarro (Hoeijmakers, 2001) e da poluição do ar (Garcia et al, 2013), além de substâncias genotóxicas consumidas através da alimentação, como por exemplo as aflatoxinas, produtos secundários do metabolismo dos fungos do gênero *Aspergillus* que contaminam diversos alimentos (Williams et al, 2004), são capazes de causar adutos que danificam o DNA.

A radiação ionizante (IR) é um dos principais agentes físicos que podem danificar o DNA, causando diversos tipos de danos como quebras na fita simples (SSBs, de *Single Strand Breaks*), quebras na fita dupla (DSBs, de *Double Strand Breaks*), *cross-links* entre DNA e proteínas e modificações em bases (Kobayashi et al, 2008). De fato, devido às propriedades genotóxicas da IR, a radioterapia é utilizada há mais de um século como tratamento para diversos tipos de tumores (Bernier et al, 2004).

1.1.2 Luz ultravioleta (UV)

O mais estudado agente físico que pode causar lesões no DNA, entretanto, é a luz ultravioleta (UV) (Callegari e Kelly, 2007), que corresponde ao menor comprimento de onda do espectro eletromagnético proveniente da luz solar, e pode ser dividida em três componentes: UVA (320-400 nm), UVB (280-320 nm) e UVC (200-280 nm). Enquanto a radiação UVC é completamente barrada pela camada de ozônio, as radiações nos maiores comprimentos de onda como uma parte da luz UVB e toda a UVA são capazes de atingir a superfície terrestre (Schuch et al, 2009). Tanto a radiação UVA quanto a UVB são capazes de transpor a barreira da pele, sendo que a penetração dos comprimentos de onda mais longos e menos energéticos (UVA) é mais eficaz.

As bases do DNA podem absorver fótons provenientes de comprimentos de onda curtos, como os de luz UVC ou UVB, o que leva à formação de ligações covalentes

entre pirimidinas adjacentes. Assim, ocorre a formação dos dois principais tipos de fotolesões, ambos capazes de causar distorções no DNA: dímeros de pirimidina ciclobutano (CPDs, de *cis-syn Cyclobutane Pyrimidine Dimers*) e os fotoprodutos pirimidina 6-4 pirimidona (6-4 PPs). Além disso, as lesões do tipo 6-4 PPs, ao absorverem luz na faixa dos 320 nm pode formar um fotoisômero conhecido como Dewar (DewPPs) (Cadet et al, 2005)(Figura 2). A absorção de fótons no comprimento de onda da luz UVA pelo DNA é mais baixa, mas esta pode causar lesões através da fotossensibilização de cromóforos presentes nas células, levando à formação de ERO (Sage et al, 2012), além de também ser capaz de levar à formação de CPDs e 6-4PPs (Schuch et al, 2010). As lesões do tipo 6-4 PPs causam uma maior distorção da fita de DNA, e provavelmente por isso seu reparo é mais rápido do que o das lesões do tipo CPD, mesmo sendo estas últimas formadas com maior frequência por doses equivalentes de UVC: Kobayashi e colaboradores (2001) detectaram o reparo de mais de 90% dos 6-4 PPs em 3 horas, enquanto mais da metade dos CPDs ainda estavam presentes nas células 24 horas depois da irradiação com UVC.

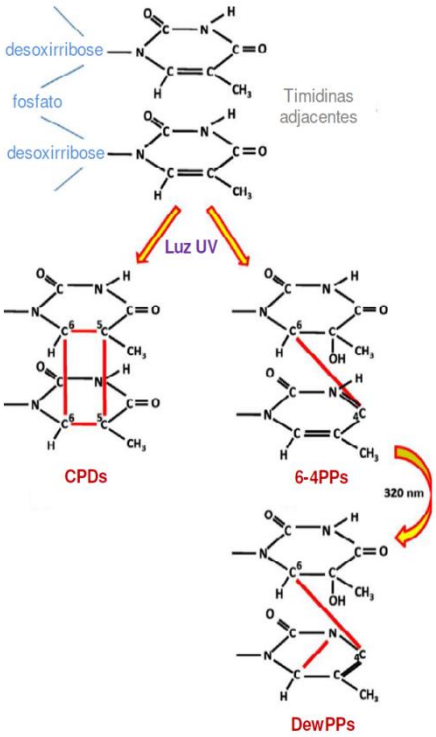


Figura 2: Estrutura química dos fotoprodutos. Adaptada de Batista et al, 2009.

Ambos os fotoprodutos, por causarem distorções na estrutura da dupla-hélice de DNA, são capazes de bloquear as polimerases que atuam tanto na replicação quanto na transcrição do DNA, levando à parada desses processos, o que ativa os mecanismos de sinalização em resposta ao dano no DNA (DDR, de *DNA Damage Response*), como parada no ciclo celular e recrutamento das maquinarias de reparo ou tolerância aos danos. Se não forem reparadas, os fotoprodutos levam à formação de mutações principalmente do tipo transições C→T ou CC→TT (conhecida como assinatura mutagênica da luz UV), devido à inserção errônea de adeninas no lugar das citosinas presentes nos fotoprodutos (Giglia-Mari e Sarasin, 2003). De fato, a assinatura mutagênica da luz UVB é encontrada tanto em genes supressores de tumor (*TP53*) quanto oncogenes (*RAS*) na maioria dos tumores de pele (Daya-Grosjean e Sarasin, 2005), assim como nos genomas tumorais como um todo, tanto em carcinomas quanto em melanomas (Alexandrov et al, 2013). São mais recentes os estudos sobre o papel da UVA na carcinogênese dos tumores de pele; entretanto, sabe-se que a radiação UVA em doses semelhantes às ambientais é capaz de induzir lesões do tipo CPD e 8-hidroxi-2´-desoxiguanosina (8-oxoG ou 8-OHdG) sendo portanto mutagênica (Sage et al, 2012), além de estar ligada a processos de envelhecimento de pele (Takeuchi e Rünger, 2013).

1.1.3 Espécies Reativas de Oxigênio (ERO) e estresse oxidativo

O termo ERO engloba tanto as espécies radicalares do oxigênio (são consideradas radicais livres somente as moléculas que possuem um ou mais elétrons desemparelhados, como o radical hidroxila, $OH^{\bullet}$ ou o superóxido, $O_2^{\bullet -}$) como as espécies derivadas do oxigênio e que não são radicais, por exemplo o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), o ozônio (O_3) e o oxigênio singlete ($^1O_2$) (Halliwell e Gutteridge, 2007). O próprio oxigênio, no seu estado mais estável ($^3\Sigma g\text{-}O_2$), é um agente oxidante pois possui dois elétrons desemparelhados, cada um em um orbital diferente, podendo assim capturar elétrons de outra molécula (Figura 3). Entretanto, como esses elétrons têm o mesmo *spin*, o oxigênio tende a receber apenas um elétron (de *spin* antiparalelo) de cada vez, para que ele possa se ajustar aos espaços vazios de cada

orbital; é por esse motivo que as reações do oxigênio com outros compostos não radicalares são muito lentas.

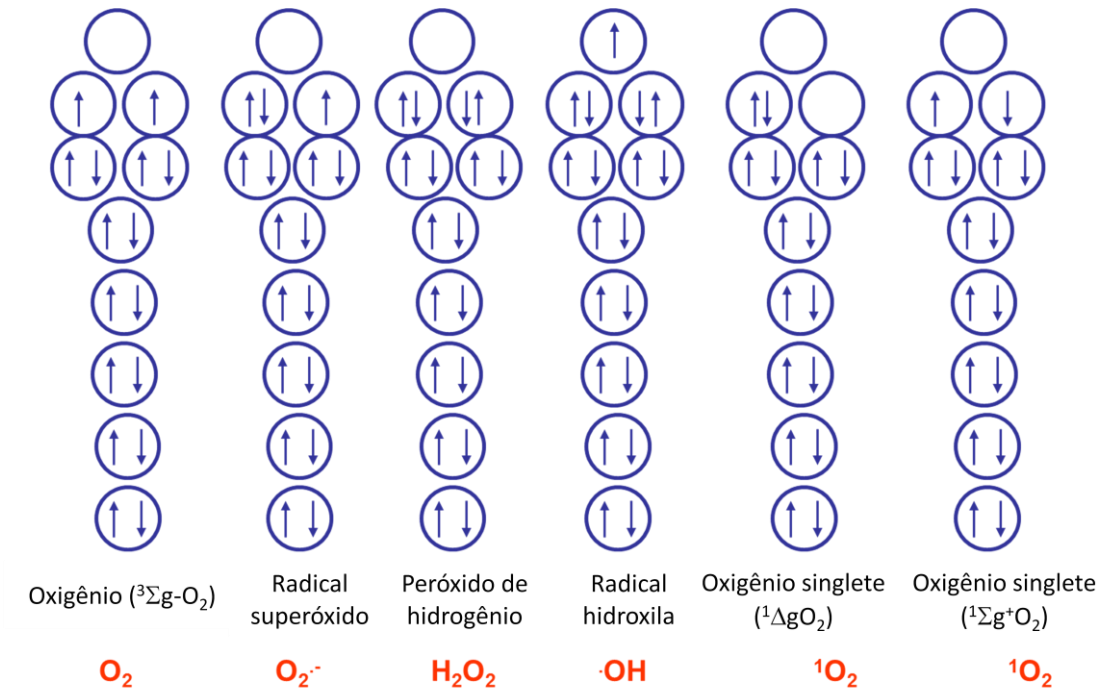


Figura 3: Orbitais moleculares do oxigênio e de algumas espécies radicalares e não radicalares derivadas.

As ERO são constantemente geradas dentro das células dos organismos, sendo após exposição a agentes como luz UV ou IR, ou através de mecanismos fisiológicos ligados à resposta imune (Lambeth, 2004), à sinalização e à respiração celular. De fato, as células possuem enzimas especializadas na síntese de ERO e nitrogênio (óxido nítrico sintase, NADPH oxidases e ciclooxigenases, por exemplo) que são produzidas de forma controlada e estão ligadas à sinalização de diversos processos, como o controle do tônus muscular ($NO^{\bullet}$ e $O_2^{\bullet-}$), do ritmo respiratório e do equilíbrio do estado redox das células (principalmente $O_2^{\bullet-}$) (Dröge, 2002). Entretanto, a maior fonte de geração de ERO dentro das células é a mitocôndria, durante o processo de respiração celular: o extravasamento (*leakage*) de elétrons pela cadeia de transporte de elétrons e sua reação com oxigênio molecular leva a uma geração constante de $O_2^{\bullet-}$ dentro das células aeróbicas (Turrens, 2003). Quando há uma produção em excesso de ERO ou quando a célula é exposta a agentes oxidantes, as ERO podem causar diversos danos às células, levando a um estado de estresse redox (Wang et al, 2013).

De forma a manter o equilíbrio no seu estado redox, as células adquiriram ao longo da evolução diversos mecanismos de defesa antioxidante para balancear a produção de ERO. Existem sistemas enzimáticos, como as superóxido dismutases (SODs), que catalisam a conversão de $O_2^{\bullet -}$ em H_2O_2, e as catalases (CATs), que convertem H_2O_2 em água. Outras enzimas, como a tioredoxina, a glutationa peroxidase (GPx) e a tioredoxina redutase formam uma reserva de antioxidantes que são responsáveis pela manutenção do equilíbrio entre as formas reduzidas e oxidadas dos agentes redutores (Valko et al, 2007). Existem também antioxidantes não-enzimáticos como o ácido ascórbico (vitamina C), o α-tocoferol (vitamina E), a glutationa (GSH) e diversos carotenóides e flavonóides que também fazem parte das defesas antioxidantes das células.

Algumas ERO, como o H_2O_2 ou o $O_2^{\bullet -}$, não reagem diretamente com os ácidos nucléicos; seu potencial oxidativo se deve à capacidade de produzir radicais altamente reativos (como o $OH^{\bullet}$) através da reação de Fenton ($H_2O_2 + M^{n+} \rightarrow M^{n+1} + OH^- + OH^{\bullet}$), quando entra em contato com os íons metálicos (principalmente ferro, e em menor extensão cobre, cromo ou cobalto) próximos ao DNA. Outros radicais livres como o carbonato ($CO_3^{\bullet -}$), peroxil ($RO_2^{\bullet}$) e alcoxil ($RO^{\bullet}$), também podem interagir com o DNA, formando principalmente lesões do tipo bases oxidadas.

O oxigênio singlete ($^1O_2$) é uma forma mais reativa do oxigênio, e pode ser gerada através de mecanismos de transferência de energia. O $^1O_2$ pode apresentar duas formas, uma mais reativa ($^1\Sigma g^+O_2$) e outra menos reativa ($^1\Delta gO_2$), sendo que a forma $^1\Sigma g^+O_2$ decai rapidamente para a forma $^1\Delta gO_2$, assim é essa a forma geralmente considerada importante em sistemas biológicos (Figura 2). O oxigênio singlete na forma $^1\Delta gO_2$ não é um radical livre pois não possui elétrons desemparelhados; porém, essa forma é altamente reativa pois, ao contrário do oxigênio, não há restrições de *spin* para as transferências de elétrons com outras moléculas (Halliwell e Gutteridge, 2007).

1.1.4 Estresse oxidativo e dano ao DNA

Os principais danos celulares causados pelo estresse oxidativo são os danos à estrutura do DNA (incluindo o mitocondrial), às proteínas e às membranas celulares. A peroxidação de lipídeos leva à diminuição da fluidez da membrana, ao aumento da sua permeabilidade e causa danos às proteínas integrais das membranas (como enzimas, receptores e canais iônicos), além de levar à propagação das reações oxidativas, através da sua decomposição em produtos tóxicos, como aldeídos bifuncionais (Cejas et al, 2004). Essa propagação tem sido associada à carcinogênese, doenças neurodegenerativas como Alzheimer e Parkinson, arterosclerose, doenças inflamatórias como artrite reumatoide, diabetes e envelhecimento (Bartsch e Nair, 2004; Valko et al, 2007). Além das membranas externas, as membranas do retículo endoplasmático e do Complexo de Golgi também podem ser danificadas, alterando a capacidade das células de sintetizar e exportar proteínas. Podem ocorrer danos também nos componentes mitocondriais, como em suas enzimas da matriz e componentes da cadeia de transporte de elétrons (Victor et al, 2005), além do DNA mitocondrial.

Do genoma original da α-proteobactéria que foi engolfada pela célula precursora da célula eucariótica moderna, iniciando um processo de simbiose há mais de dois bilhões de anos (Lane e Martin, 2010), restam atualmente, na célula humana, apenas 16 kbp de material genético em um genoma circular, que é responsável pela síntese de 13 proteínas pertencentes aos complexos I-IV da cadeia de transporte de elétrons. Todo o restante foi perdido ou transferido para o genoma nuclear (Gabaldón e Huynen, 2004), ao longo do processo simbiótico durante o qual a mitocôndria adquiriu novas funções, como as ligadas ao destino da célula através dos mecanismos de morte, além de manter sua função inicial, de produção de energia. Esse genoma circular, presente em diversas cópias, assim como os genomas nucleares, apresenta-se compactado e organizado em estruturas denominadas nucleóides, presentes na matriz mitocondrial (Friedman e Nunnari, 2014). Os nucleóides podem apresentar uma certa forma de proteção, porém, uma vez que o DNA mitocondrial (mtDNA) encontra-se associado à membrana interna da mitocôndria, onde ocorre grande formação de ERO

durante a fosforilação oxidativa. De fato, as mitocôndrias possuem vias de reparo de DNA, assim como diversos mecanismos de defesa antioxidante (tanto enzimáticos, como a SOD, quanto não enzimáticos, como o α-tocoferol), responsáveis pela manutenção da integridade do mtDNA. Entretanto, existem cada vez mais evidências de doenças humanas cuja patologia está associada estresse redox e ao consequente acúmulo de danos no mtDNA, como alguns tipos de câncer e doenças degenerativas (Costa et al, 2011).

As ERO são capazes de danificar o DNA através de diversos mecanismos, tanto na base nitrogenada quanto na desoxirribose, levando à formação de vários tipos de bases oxidadas (Figura 4), que, se não reparadas, levam à mutagênese e à instabilidade genética, participando assim do processo tumorigênico de diversos tumores (Hanahan e Weinberg, 2011). O $OH^{\bullet}$ é altamente reativo em sistemas biológicos, e sua reação de adição a purinas e pirimidinas resulta em diferentes compostos, dependendo da base atacada e da presença de íons metálicos (Dizdaroglu, 2012). Riboses e desoxirriboses também podem ser atacadas pelo $OH^{\bullet}$, gerando diversos radicais centrados no carbono que, na presença de O_2, podem ser rapidamente convertidos em radicais peroxil ($RO_2^{\bullet}$).

Além das bases oxidadas "individuais", o $OH^{\bullet}$ pode levar à formação de lesões em tandem, que consistem em duas bases adjacentes modificadas na mesma fita, ligações cruzadas entre duas bases adjacentes modificadas na mesma fita, ou ligações cruzadas entre duas bases modificadas em fitas opostas (ICLs, de *intra- ou interstrand cross-links*)(Cadet et al, 2012). Pode ocorrer também a formação de lesões em *cluster*, definidas pela presença de duas ou mais lesões (do tipo bases oxidadas, sítios AP ou quebras) dentro de uma ou duas voltas da hélice do DNA (Sage e Harrison, 2011). Além das reações com os ácidos nucléicos, o $OH^{\bullet}$ também pode reagir com proteínas nucleares; os radicais derivados das proteínas podem formar ligações cruzadas com o DNA. Todas essas lesões complexas são capazes de interferir no reparo do DNA, na condensação da cromatina, replicação e transcrição, e são portanto mais citotóxicas do que as bases oxidadas individuais (Evans et al, 2004).

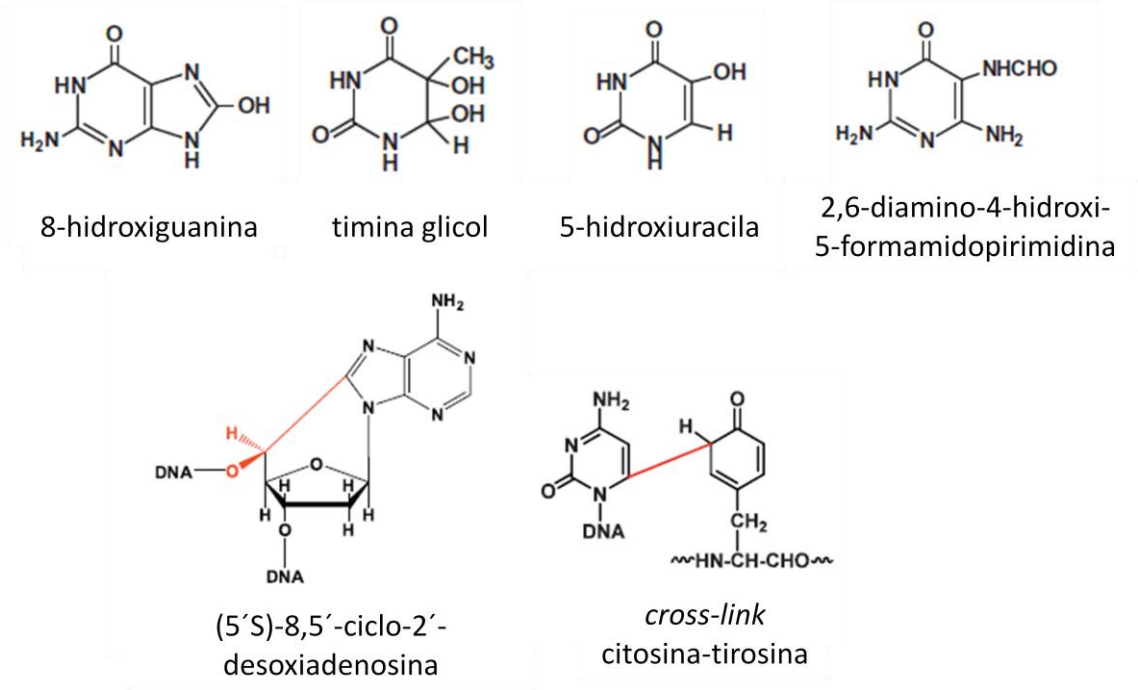


Figura 4: Estruturas de algumas das principais bases oxidadas formadas por ROS no DNA, além de um exemplo de uma lesão em tandem e de uma lesão do tipo *cross-link* DNA-proteína. Adaptada de Dizdaroglu, 2012.

O 8-hidroxi-2´-desoxiguanosina (8-OHdG ou 8-oxodG) é um dos marcadores mais utilizados para avaliação de danos gerados por oxidação (Lee e Pfeifer, 2008). Essa base modificada apresenta uma forma tautomérica denominada 8-oxo-7-hidro-2´-desoxiguanosina, ou 8-oxodG. O 8-OHdG pode ser formado por diversas espécies reativas ($OH^{\bullet}$, $CO_3^{\bullet -}$, $RO_2^{\bullet}$, $^1O_2$); uma indicação do seu grande potencial mutagênico é o grande número de mecanismos envolvidos em seu reparo, tanto antes do nucleotídeo ser incorporado como após sua incorporação no DNA (Halliwell e Gutteridge, 2007). Sua presença pode levar a diversos tipos de mutação, sendo as mais importantes as transversões G→T, uma vez que as polimerases replicativas, assim como a RNA pol II, incorporam geralmente A ao invés de C frente a 8-OHdG (Neely e Essigmann, 2006; Charlet-Berguerand et al, 2006), enquanto polimerases ligadas a processos de reparo como a DNA polimerase beta (pol β) tendem a inserir a base correta, no caso C (Shibutani et al, 1991). Acredita-se que os efeitos deletérios dessa lesão estejam ligados principalmente à mutagênese, uma vez que por não ser uma lesão distorsiva, 8-OHdG causa uma parada apenas transiente da RNA polimerase II (Tornaletti et al, 2004; Kathe et al, 2004; Larsen et al, 2004); essa parada, entretanto, pode ser

influenciada por outras variáveis como a concentração de ATP ou a sequência na qual a lesão está inserida (Allgayer et al, 2013).

1.1.5 Azul de metileno (MB)

O azul de metileno (MB, de *Methylene Blue*) é um fotossensibilizador pertencente à classe dos corantes fenotiazínicos, utilizado em terapias fotodinâmicas para alguns tipos de tumores superficiais, doenças causadas por bactérias (Wainwright et al, 1997) e vírus (Tardivo et al, 2012), além de ter sido a primeira droga utilizada no tratamento da malária (Wainwright e Amaral, 2005). A fotoativação é a reação de geração de espécies reativas por uma substância fotossensibilizadora, após a absorção de luz visível ou UV; no caso do MB, o pico de absorção ocorre no comprimento de onda do vermelho, a 665 nm.

O fotossensibilizador é uma molécula capaz de absorver luz em um determinado comprimento de onda, e de transferir a energia para outras moléculas através da transferência de elétrons. Essa reação se inicia com a excitação eletrônica do fotossensibilizador pela energia luminosa, o que o leva ao estado singlete ($^1sens^*$) ou triplete ($^3sens^*$), que tem maior duração que o singlete. As moléculas no estado triplete podem ter dois destinos: através do mecanismo tipo I há transferência de elétrons entre o $^3sens^*$ e outros componentes do sistema, gerando íons radicais que podem reagir com o oxigênio resultando em produtos oxidados. No mecanismo tipo II ocorre a transferência direta de energia do $^3sens^*$ para o oxigênio, gerando oxigênio singlete ($^1O_2$). Além da sua capacidade de gerar $^1O_2$ através de fotólise, em meio biológico o MB pode sofrer reação de redução após excitação eletrônica, gerando o radical semi-reduzido $MB^\bullet$ e leuco-MB, que sofre autoxidação gerando H_2O_2 e $O2^{\bullet-}$. Estes radicais podem danificar diretamente as biomoléculas, ou serem convertidos em $OH^\bullet$ na presença de íons metálicos via reação de Fenton (Tuite et al, 1993).

O MB é facilmente incorporado pelas células pelo seu caráter hidrofílico e por possuir carga positiva. O tratamento com MB fotoativado leva à formação de grandes quantidades de 8-OHdG, tanto em DNA plasmidial (Schneider et al, 1990) quanto celular (Epe et al, 1993). Além das bases oxidadas individuais, não se pode descatar a formação de danos complexos, como as lesões em cluster e em tandem, após o

tratamento com MB fotoativado (BERRA et al, 2013). Na ausência de luz o MB apresenta pouca ou nenhuma toxicidade (Blazquez-Castro et al, 2009).

1.2 Vias de Reparo do DNA

Ao longo da evolução, os organismos desenvolveram diversos mecanismos para reparar os danos que, se forem mantidos nas células, podem ser deletérios para a existência dos seres vivos (Moraes et al, 2012a). As vias de reparo de DNA não são essenciais somente na manutenção da integridade do organismo através do reparo de danos genotóxicos no DNA das células somáticas como um todo, como também possui um papel essencial na manutenção da integridade do DNA das células tronco. De fato, as células tronco possuem vias de reparo extremamente eficazes, além de mecanismos de resposta a dano como indução de senescência, apoptose ou diferenciação, de modo a impedir a propagação de células com alterações genômicas, o que seria extremamente deletério para o organismo (Rocha e Lerner et al, 2013). Uma revisão sobre o papel do reparo de DNA nas células tronco pode ser encontrada no final dessa tese.

Até o momento foram descritas diversas vias de reparo do DNA, que podem ser divididas em cinco categorias: reparo direto da lesão, reparo por excisão de base, reparo por excisão de nucleotídeos, reparo de quebra na fita dupla e reparo de ligações cruzadas (Sancar et al, 2004).

1.2.1 Reparo Direto

As vias de reparo direto da lesão são a fotorreversão de CPDs e 6-4 PPs pelas DNA fotoliases após a absorção de fótons de luz azul, a remoção de grupos O^6-metil de O^6-metilguanina (O^6MeG) pela enzima metilguanina-DNA-metiltransferase (MGMT), e a remoção de bases danificadas por agentes alquilantes pela família de enzimas AlkB.

As fotoliases apareceram muito cedo na evolução, estando presentes tanto em *Archea* e *Bacteria* quanto em *Eucaria*, e estão entre os mecanismos mais eficientes no reparo dos dois principais fotoprodutos (Menck, 2002). Cada uma das fotoliases age de forma específica para cada fotolesão, ligando-se ao dímero de forma independente da

luz, e utilizando a energia de um fóton de luz azul (350-450 nm) para clivar as ligações covalentes dos dímeros, retornando-os à estrutura original (Brettel e Byrdin, 2010), com a ação de dois cromóforos como cofatores. Essas enzimas estão presentes em todos os vertebrados, com exceção dos mamíferos placentários; nesses organismos (assim como em outros animais e plantas) encontram-se outras proteínas fotoativas da família das fotoliases, chamadas criptocromos. Os criptocromos apresentam estrutura similar às fotoliases, com domínios fotoativos e de ligação a cromóforos semelhantes, assim acredita-se que ambas as proteínas tenham uma origem evolutiva comum (Chaves et al, 2011). Os criptocromos, entretanto, não apresentam nenhuma função de reparo, mas estão ligados à regulação de diversas respostas biológicas, como o ritmo circadiano (Muraro et al, 2013).

Diversas substâncias presentes na alimentação, na fumaça do cigarro e muitos agentes quimioterápicos são capazes de gerar espécies eletrofílicas que reagem com o DNA formando diversas lesões conhecidas como bases alquiladas (adição de grupos metil ou etil às bases nitrogenadas) (Kaina et al, 2007). Esses adutos são tóxicos para as células, estando ligados à apoptose, assim como a processos mutagênicos. A enzima metilguanina DNA metiltransferase (MGMT) é responsável pelo reparo direto das lesões O^6MeG e O^4MeT, através da transferência do grupo alquil do oxigênio da base danificada para um resíduo de cisteína no grupo catalítico da MGMT, restaurando a base nitrogenada e inativando a enzima (Pegg, 2000). A MGMT alquilada é ubiquitinada e degradada pelo proteassoma (Xu-Welliver e Pegg, 2002). O reparo das bases alquiladas não é feito somente de forma direta, mas também por outras vias de reparo, como o reparo por excisão de base (BER, de *Base Excision Repair*) e o reparo por emparelhamento errôneo (MMR, de *Mismatch Repair*), descritos em detalhes mais adiante (Taira et al, 2013).

As bases alquiladas no nitrogênio, como N1-metil-adenina (N1MeA), N1-metil-citosina (N1MeC), N3-metil-timina (N3-MeT) e N1-metil-guanina (N1MeG) são reparadas pelas enzimas ABH2 e ABH3, homólogas à AlkB de *Escherichia coli* (Yang et al, 2009). Essas enzimas pertencem à família das dioxigenases dependentes de α-cetoglutarato e Fe2+; o mecanismo de reparo envolve a oxidação do grupo alquil resultando na desmetilação, ou seja, o reparo direto da lesão, com a liberação do

grupo metil hidroxilado na forma de formaldeído (Kaina et al, 2007). AlkB e ABH3 reparam preferencialmente lesões em DNA simples fita, enquanto ABH2 repara preferencialmente fita dupla; além disso, AlkB e ABH3 também podem reparar bases alquiladas no RNA (Aas et al, 2003).

1.2.2 Reparo de quebras na fita dupla (DSBs)

As DSBs podem ser reparadas através de dois mecanismos: o reparo por recombinação homóloga (HR, de *Homologous Recombination*) e o reparo pela junção de extremidades não-homólogas (NHEJ, de *NonHomologous End-Joining*). O processo de HR começa com a invasão da fita e a migração dos braços dos cromossomos para a formação de uma *Holliday junction* (estrutura na qual os dois complexos recombinantes são ligados covalentemente), com a participação das proteínas Rad51, Rad52, Rad54, Rad55, BRCA1 e BRCA2, e do complexo Mre11/Rad50/NBS1 (M/R/N). A *Holliday junction* é resolvida por endonucleases específicas denominadas resolvases (Kakarougkas e Jeggo, 2014). Esse processo tem uma taxa de erro muito baixa, uma vez que a informação perdida pela DSB é copiada do outro alelo.

O mecanismo de NHEJ é iniciado pela proteína Ku (heterodímero Ku70/Ku80), que se liga às extremidades da DSB formando um complexo Ku:DNA em cada extremidade da DSB, com grande flexibilidade em relação ao tamanho do fragmento de DNA simples fita, da sequência e do tipo da extremidade gerada. Essa ligação protege as extremidades da digestão por nucleases e aumenta a afinidade da ligação servindo ao recrutamento dos outros componentes da maquinaria, como os complexos da nuclease (Artemis:DNA-PKcs) e da ligase (XLF:XRCC4:DNA ligase IV) , assim como das polimerases λ e μ (Lieber, 2010). Esta via é importante para a recuperação de forquilhas de replicação colapsadas, e essencial para o processo de recombinação V(D)J e para o reparo de DSBs induzidas por radiação ionizante e ROS. Existem evidências recentes da existência de outros mecanismos de NHEJ: o mecanismo descrito acima, dependente das proteínas Ku e do complexo XRCC4/DNA ligase IV) é denominado NHEJ canônico (C-NHEJ), enquanto outras vias de reparo por EJ, denominadas alternativas (A-EJ), podem ocorrer na ausência de Ku80 e XRCC4 (Bétermier et al, 2014).

Enquanto o processo de HR é altamente fiel, o reparo por NHEJ é intrinsicamente mutagênico, uma vez que a ligação ocorre entre dois fragmentos independentemente das extremidades pertencem ao mesmo cromossomo, podendo gerar deleções, inserções e translocações (Kobayashi et al, 2008). Entretanto, enquanto o reparo por HR demora aproximadamente sete horas, o reparo por NHEJ demora em média trinta minutos (Mao et al, 2008), além de estar ativo em todas as fases do ciclo celular, enquanto o HR ocorre somente nas células em S ou G2, uma vez que há a necessidade da cromátide irmã. Assim, apesar de mutagênico, o NEHJ é importante para as células na presença de DSBs, uma vez que essas quebras, quando não reparadas, podem levar a perdas no material genético, aberrações cromossômicas ou à morte celular (Daley e Sung, 2014).

1.2.3 Reparo de Emparelhamento Errôneo (MMR, de *Mismatch Repair*)

Os erros de emparelhamento, assim como pequenas inserções e deleções, gerados naturalmente durante a replicação do DNA são corrigidos pelo mecanismo conhecido como Reparo de Emparelhamento Errôneo (MMR). Essa via é altamente conservada ao longo da evolução, e mutações nos genes dessa via estão ligados a diversas doenças que têm em comum a instabilidade genética, como o câncer colorretal não-poliposo familiar (HNPCC ou síndrome de Lynch), e outros tumores hereditários e esporádicos. Em células de eucariotos, a fita recém-sintetizada (que contém o erro) é reconhecida através de descontinuidades da fita (extremidade 3'-OH ou fragmentos de Okazaki)(Fukui, 2010). O reconhecimento da lesão é feito pelos heterodímeros de MutS, MutSα (MSH2-MSH6) ou MutSβ (MSH2-MSH3); MutSα geralmente reconhece emparelhamentos errôneos e deleções/inserções de 1-2 nucleotídeos, enquanto MutSβ reconhece principalmente bolhas formadas por deleções/inserções (Hsieh, 2001). A incisão é feita pelo heterodímero MutLα (principalmente MLH1-PMS1)(Modrich, 2006), com a participação das proteínas PCNA (*Proliferating Cell Nuclear Antigen*) e RFC (*Replication Factor C*). O *flap* resultante da incisão é removido pela ação das enzimas RPA e Exo1; a DNA pol δ é responsável pela ressíntese do DNA com base na fita molde, e a ligação é feita por uma DNA ligase (Hsieh e Yamane, 2008).

1.2.4 Reparo de ligações cruzadas (ICLs, de *Interstrand Cross-Links*)

Como descrito anteriormente, em situações de estresse redox pode ocorrer reações oxidativas que atacam as membranas celulares, processo conhecido como peroxidação de lipídeos (LPO, de *lipid peroxidation*). Alguns produtos finais da LPO, como por exemplo a acroleína, o crotonaldeído e o malondialdeído são capazes de formar adutos no DNA que podem dar origem a ligações cruzadas. Diversos agentes quimioterápicos, como os compostos de platina (cisplatina, carboplatina, oxaliplatina), as mostardas nitrogenadas (ciclofosfamida, melfalano), a mitomicina C e os psoralenos também são capazes de formar ligações cruzadas tanto entre duas bases adjacentes na mesma fita (ligações cruzadas intra-fitas) como entre duas bases de fitas diferentes (ICLs), sendo essas últimas as mais tóxicas. As ligações cruzadas são extremamente tóxicas pois, ao formarem ligações covalentes com bases em fitas opostas, impedem a abertura da dupla fita que deve ocorrer durante processos vitais como replicação e transcrição. Na presença de uma quantidade de ICLs maior do que a capacidade de reparo das células, essas lesões levam à morte celular por catástrofe mitótica ou por apoptose (Deans e West, 2011).

O reparo das ICLs é um mecanismo extremamente engenhoso, que envolve a ação de um grande número de proteínas, como as proteínas FANC (Anemia de Fanconi, de *Fanconi anaemia*), e uma interconexão com outras vias de reparo, principalmente o HR (Räschle et al, 2008). O reparo dessas lesões é iniciado pelo reconhecimento da lesão, através da parada na forquilha de replicação, pela proteína FANCM (Kim et al, 2008), o que leva ao recrutamento do complexo FA *core*, constituído por sete proteínas FANC (FANCA, FANCB, FANCC, FANCE, FANCF, FANCG e FANCL), além de FANCM (Wang, 2007). FANCL é uma E3 ubiquitina ligase que catalisa a ubiquitinação de FANCD2 e FANCI, estabilizando essas proteínas no local do dano e sinalizando para o recrutamento de nucleases e polimerases necessárias para o processo de reparo/translesão, como pol ν (POLN) e a nuclease FAN1. FANCM também é responsável pelo recrutamento do complexo BTR (BLM, TOPOIIIα, RMI1 e RMI2) envolvido na resolução das estruturas complexas formadas durante essa via de reparo em fim S/G2, como as *Holliday junctions* (Wu e Hickson, 2003). As proteínas BRCA1 e BRCA2 (FANCD1) também são recrutadas pelas proteínas FANC (Garcia-Higuera et al,

2001) e estão envolvidas na coordenação dos processos de reparo por recombinação necessários para a estabilização da forquilha bloqueada e continuação do reparo na fase S, também dependentes de RAD51 e das polimerases REV1 (Mirchandani et al, 2008), ν (Moldovan et al, 2010) e ξ (REV7/REV3L).

As vias mais relevantes para este trabalho serão descritas em detalhes, a seguir.

1.2.5 Reparo por Excisão de Base (BER)

O Reparo por Excisão de Base (BER, de *Base Excision Repair*) é a principal via para reparo de danos resultantes de oxidação, alquilação, desaminação e sítios AP (David et al, 2007). Lesões causadas por estes tipos de dano podem levar à incorporação de uma base incorreta pelas RNA e DNA polimerases, levando à formação de mutações durante os processos de replicação e transcrição. Além disso, como descrito acima, lesões desse tipo, apesar de causarem uma menor distorção na estrutura da dupla fita (quando comparado com os fotoprodutos, por exemplo), podem levar à parada nos mecanismos de replicação e transcrição, estando associados também à senescência e morte celular, além da mutagênese (Chen et al, 2007). Assim, ao longo da evolução, surgiram nos seres vivos vias altamente conservadas, e geralmente redundantes, para reparar danos desse tipo: de fato, muitas destas lesões podem ser reparadas por diversas vias já descritas acima, como o MMR e o reparo direto, o Reparo por Excisão de Nucleotídeo (NER, descrito adiante), além da via de BER (Hoeijmakers, 2001).

A via de BER foi por anos menos estudada do que as vias de MMR e de NER, provavelmente porque não há nenhuma síndrome humana ligada a deficiências nessa via; entretanto, a existência de diversas proteínas redundantes nessa via presentes nas células de mamíferos pode ser uma indicação da grande importância dessa via na manutenção da integridade do genoma e do organismo como um todo (Hazra et al, 2007). De fato, polimorfismos em genes pertencentes à via de BER, além de variações na via como um todo, podem estar associados à longevidade em seres humanos (Debrabant et al, 2014).

O BER pode ser dividido em duas vias: a via curta (*short-patch* BER), responsável pelo reparo de apenas uma base, ou a via longa (*long-patch* BER), que pode remover de duas a oito bases (Figura 5).

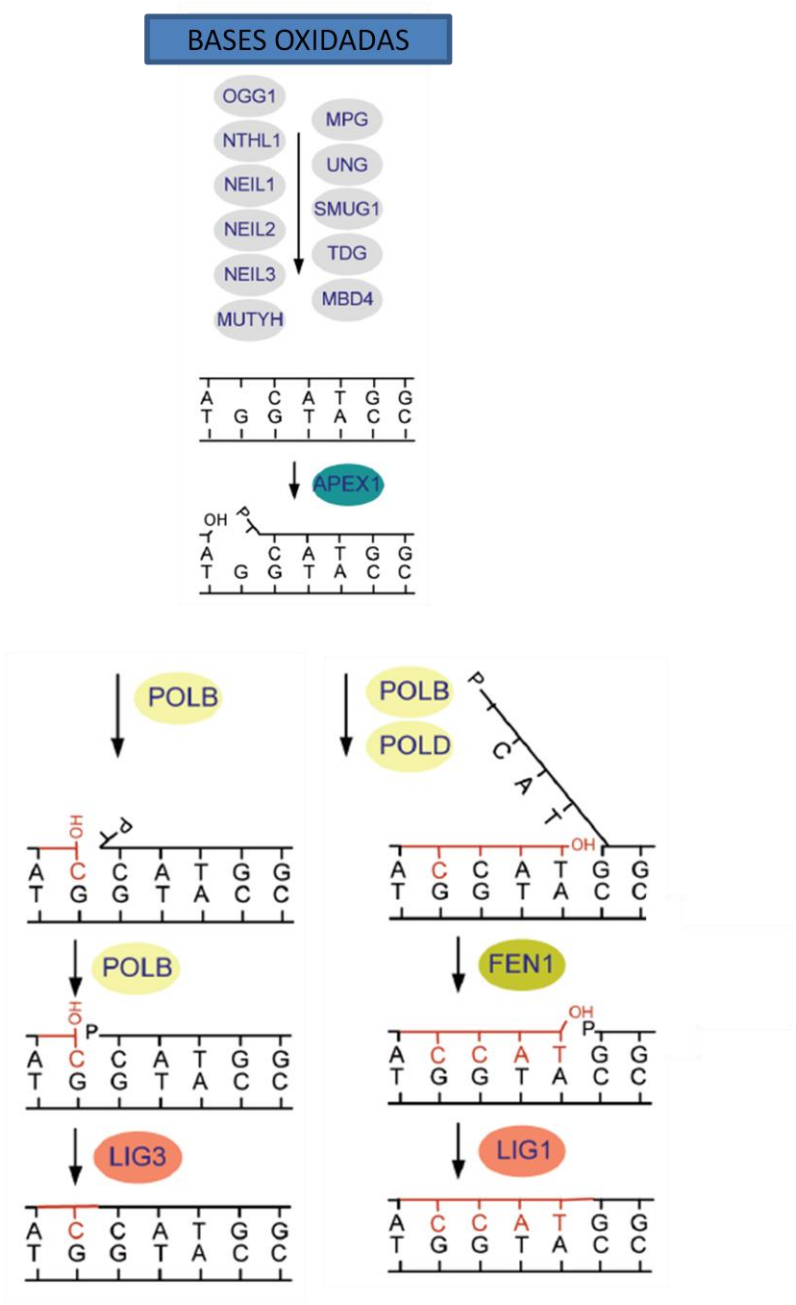


Figura 5: Mecanismo de Reparo por Excisão de Base (BER). O reconhecimento da lesão e a excisão da base danificada são realizados por uma DNA glicosilase, gerando um sítio AP. Uma endonuclease ou uma glicosilase bifuncional clivam o esqueleto de DNA formando uma lacuna. A partir desse passo pode ocorrer a continuação do reparo pela via curta (à esquerda) ou pela via longa (à direita). Na via curta, uma polimerase preenche a lacuna com a base correta utilisando a outra fita como molde, e uma DNA ligase restaura a interidade da fita. Na via longa, uma polimerase sintetiza um

fragmento de DNA mais longo, levando à formação de uma estrutura em *flap* que é resolvida pela endonuclease específica (FEN1), seguida da ação da ligase. Apenas as proteínas principais das subvias são mostradas. Adaptado de Robertson et al, 2009.

O funcionamento do BER depende da ação coordenada de quatro tipos de proteínas: DNA glicosilase, AP endonuclease ou AP DNA liase, DNA polimerase e DNA ligase (Kubota et al, 1996). O atual modelo de BER leva em conta uma sequência de cinco passos enzimáticos para o reparo das bases danificadas: reconhecimento da lesão por uma DNA glicosilase específica, clivagem da ligação N-glicosídica e remoção da base danificada, gerando um sítio AP. O esqueleto de DNA é clivado por uma AP liase ou AP endonuclease, gerando uma incisão a 3' (atividade AP liase de algumas glicosilases, chamadas glicosilases bifuncionais) ou 5' (AP endonuclease) da base oxidada, que é posteriormente processada por uma DNA endonuclease, formando uma lacuna. A lacuna é preenchida por uma DNA polimerase, e uma DNA ligase completa o processo de reparo restaurando a integridade da fita selando as lacunas (Robertson et al, 2009).

O início do BER é o mesmo, independente da via a ser seguida (via curta ou longa). O reconhecimento da lesão é feito por uma das onze DNA glicosilases já descritas até hoje em humanos, que também são responsáveis pela formação do sítio AP (Krokan e Bjørås, 2013). Cada glicosilase é responsável pelo reconhecimento de algumas lesões relacionadas, sendo que cada glicosilase pode reconhecer mais de um tipo de lesão, assim como cada tipo de lesão pode ser reconhecida e clivada por mais de uma glicosilase, o que promove mais um grau de redundância no reparo dessas lesões (Maynard et al, 2009): por exemplo, a DNA glicosilase OGG1 (8-oxoguanina DNA glicosilase) pode reconhecer tanto 8-oxoG quanto FapyG. As glicosilases podem ser separadas de acordo com suas lesões-alvo, como bases oxidadas/reduzidas (8-oxoG ou formamidopirimidinas), alquiladas (geralmente metiladas) ou desaminadas (uracil), ou pelo seu mecanismo de ação, em monofuncionais (possuem somente atividade de glicosilase, como a uracil-DNA-glicosilase, UNG) ou bifuncionais (possuem atividade de glicosilase e AP liase, como a OGG1).

Após a ação de uma DNA glicosilase, uma endonuclease (como a APEX1) catalisa a formação da lacuna no DNA. Na via curta, a DNA polimerase β (POLB) catalisa a remoção do sítio AP, e a ligação das extremidades por uma ponte fosfodiéster é feita pela DNA ligase III (LIG3). Na via longa, a ação da APEX1 pode recrutar as DNA polimerases β ou δ (POLD), que catalisam a polimerização de duas ou mais bases, numa reação dependente da proteína PCNA. O processo prossegue com a ação da enzima FEN1 (que resolve a extremidade não ligável deixada pela polimerase), e a ligação é feita pela DNA ligase I (LIG1). Ainda não há consenso sobre os mecanismos de escolha entre as duas vias; estudos mostram que essa decisão pode estar relacionada à disponibilidade de ATP na proximidade do sítio AP, além do tipo de intermediário que é gerado após a incisão que forma o sítio AP, dependente do tipo de lesão e da glicosilase que fez o reconhecimento e a excisão (Petermann et al, 2003).

1.2.6 Reparo por Excisão de Nucleotídeos (NER)

O Reparo por Excisão de Nucleotídeos (NER, de *Nucleotide Excision Repair*) foi descoberto há 50 anos através dos estudos de Pettijohn e Hanawalt (1964), que demonstraram a síntese de DNA ligada ao reparo da ausência de luz após irradiação com luz UV em bactérias. O NER é a via responsável pelo reparo de danos estruturalmente diferentes, capazes de distorcer a fita dupla, interferir no emparelhamento e bloquear a duplicação e a transcrição, sendo assim mutagênicos e citotóxicos. Exemplos de lesões reparadas por NER são os fotoprodutos causados pela luz UV (CPDs e 6,4-PPs), além de diversos adutos gerados no DNA por agentes químicos provenientes do meio ambiente, como componentes da fumaça de cigarro e da poluição do ar, assim como da dieta, como as aflatoxinas, além dos agentes utilizados no tratamento do câncer, como os compostos de platina (cisplatina, carboplatina) e nitrosouréias (Wood, 2010). O NER também está envolvido no reparo de alguns tipos de lesões do tipo bases oxidadas capazes de distorcer a fita dupla e/ou levar à parada da RNA polimerase (Curtin, 2012); estes mecanismos ainda não foram completamente elucidados e serão melhor discutidos posteriormente.

O mecanismo básico de ação do NER depende da ação orquestrada de forma sequencial de um grande número de proteínas (Volker et al, 2001; Costa et al, 2003), e consiste no reconhecimento da lesão, abertura da dupla hélice e excisão de um fragmento de 20 a 30 nucleotídeos contendo a região danificada da fita simples pela ação seqüencial de helicases e endonucleases (Staresincic et al, 2009), seguido da polimerização da região removida utilizando a fita intacta como molde (Figura 6). O NER pode ser dividido em duas vias, de acordo com as proteínas envolvidas no reconhecimento da lesão, que posteriormente convergem para o recrutamento da mesma maquinaria de abertura da dupla hélice: o Reparo do Genoma Global (GGR, de *Global Genome Repair*) e o Reparo acoplado à Transcrição (TCR, de *Transcription Coupled Repair*). Enquanto o GGR é responsável pelo reparo das lesões em regiões não transcritas do genoma, assim como nas fitas não transcritas dos genes ativos, o TCR reconhece danos que causam distorções nas regiões ativas da cromatina, reparando-as de forma mais eficiente (Hanawalt e Spivak, 2008). O TCR foi descoberto 20 anos após o NER, por Bohr et al (1985), que descreveram o reparo preferencial de CPDs em um gene transcricionalmente ativo quando comparado ao restante do genoma em células de roedor. Dois anos depois, Mellon et al (1987) descreveram que o reparo preferencial que ocorre nos genes ativos dirigidido à fita transcricionalmente ativa.

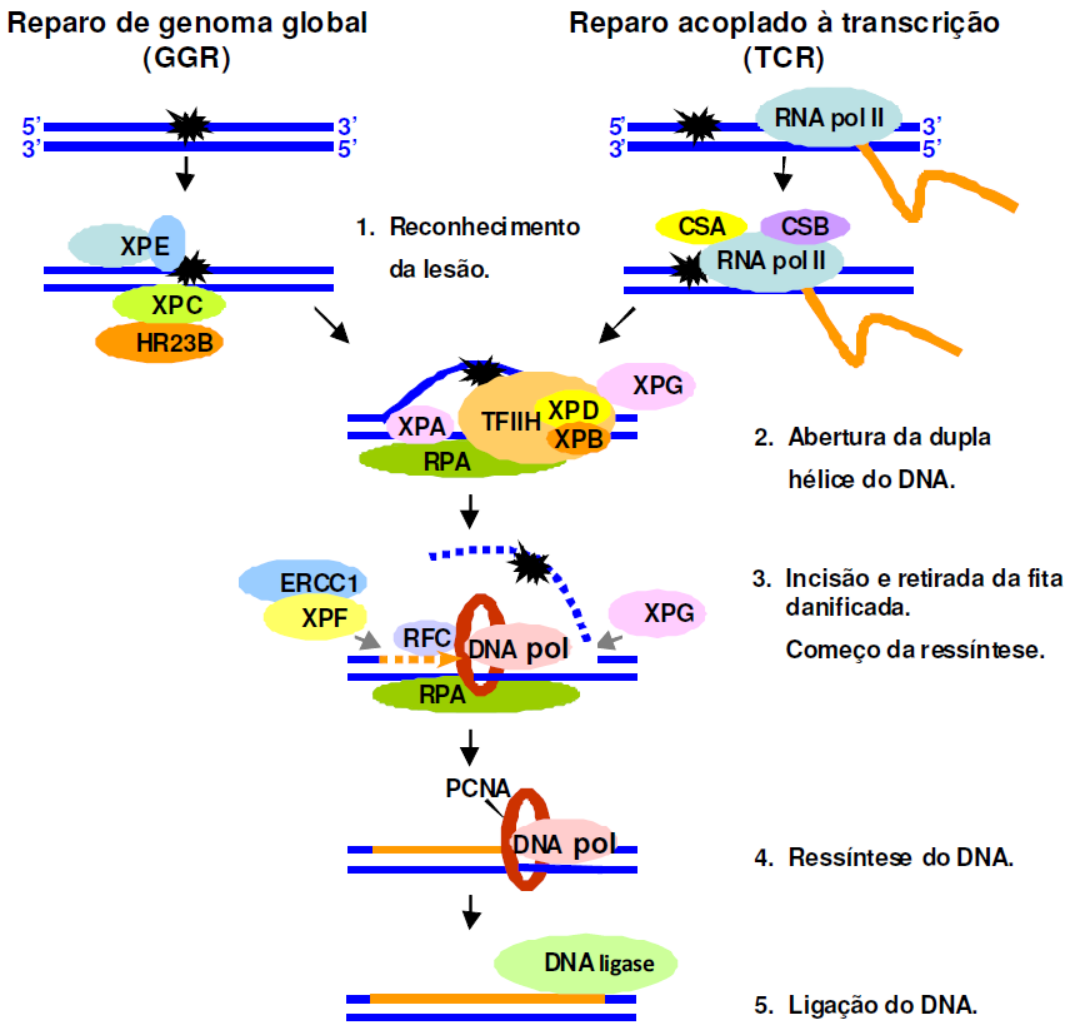


Figura 6: Mecanismo do Reparo por Excisão de Nucleotídeos (NER). A via de NER é composta por duas sub-vias, que diferem entre si quanto ao mecanismo de reconhecimento da lesão: na via de GGR o reconhecimento é realizado principalmente pelos complexos proteicos XPC-hHR23B e DDB1/DDB2 (XPE), enquanto na via de TCR o reconhecimento ocorre pela parada da RNA pol II ao encontrar a lesão, durante a transcrição. Os passos seguintes são os mesmos para ambas as vias: abertura da dupla hélice pelas helicases do complexo TFIIH, incisão da fita danificada pelas endonucleases XPG e XPF-ERCC1, retirada do fragmento contendo a lesão, ressíntese do DNA com base na fita intacta, e ligação. Fonte: Lima-Bessa e Soltys et al, 2009.

No GGR, o complexo XPC-hHR23B/RAD23B é o responsável pelo reconhecimento primário da lesão (Sugasawa et al, 1998), sendo capaz de reconhecer uma grande variedade de lesões que distorcem a fita dupla. XPC-hHR23B são os homólogos das proteínas Rad4 e Rad23 de leveduras; a proteína XPC purificada de

extratos celulares pode ser coprecipitada com hHR23B, e na minoria das vezes com hHR23A (Masutani et al, 1994). Mais recentemente outro componente do complexo foi identificado, CEN2 (Araki et al, 2001). Na ausência de hHR23B existe uma grande diminuição nos níveis da proteína XPC (Ng et al, 2003), assim acredita-se que a função da proteína hHR23B esteja ligada à estabilização da proteína XPC, impedindo sua degradação; além disso, essa proteína está ligada ao aumento da afinidade de XPC por *templates* de DNA danificado (Bergink et al, 2012). O complexo XPC-hHR23B reconhece DNA danificado com maior afinidade do que DNA íntegro (Reardon et al, 1996), provavelmente pela distorção causada pela lesão na dupla hélice. De fato, esse complexo é capaz de reconhecer e se ligar a um *template* de DNA íntegro contendo uma bolha, entretanto a incisão do fragmento ocorre somente quando há a presença de uma lesão nessa mesma estrutura (Sugasawa et al, 2001). Além disso, o complexo XPE (formado pelas subunidades p127/DDB1 e p48/DDB2) participa no reconhecimento de lesões não prontamente reconhecidas pelo complexo XPC-hHR23B, como as CPDs (Sugasawa et al, 1997). As proteínas RPA e XPA também participam do processo de reconhecimento da lesão, assim como para o recrutamento do restante da maquinaria de NER (You et al, 2003), além do complexo TFIIH, que auxilia na discriminação da fita danificada (Yokoi et al, 2000).

O complexo XPC-hHR23B é dispensável para o TCR, sendo que o sinal reconhecido por esta via é o bloqueio da elongação da RNA polimerase II frente à lesão (Hanawalt e Spivak, 2008). A permanência da RNA pol II bloqueada em frente à lesão constitui um impedimento físico tanto para a continuidade da transcrição quanto para o acesso da maquinaria de reparo à região da lesão, o que constitui um sinal para que a célula entre em apoptose ou senescência (Ljungman e Lane, 2004). Assim, existem dois mecanismos possíveis para a retirada da polimerase bloqueada: a regressão (*backtracking*) ou a retirada da polimerase do DNA. O processo de *backtracking* foi demonstrado *in vitro* em experimentos que mostraram que de fato a RNA pol parada frente a um CPD regride de forma a tornar possível o acesso à lesão por outras enzimas (no caso uma fotoliase foi capaz de realizar o reparo da lesão)(Donahue et al, 1994). Após a regressão, a proteína RPA se ligaria às regiões de DNA simples fita, impedindo a renaturação e sinalizando para outras proteínas de reparo, como XPA e

TFIIH. A retirada da RNA pol II acontece através da ubiquitinação da polimerase pela E3 ubiquitina ligase NEDD4, levando à degradação da subunidade RPB1 da RNA pol II pelo proteassoma (Malik et al, 2008). Em células de mamíferos, entretanto, que contêm diversos genes de tamanho grande, é provável que o mecanismo mais frequente seja o de *backtracking* e não o de remoção da polimerase.

A imunoprecipitação das proteínas ligadas à cromatina possibilitou a detecção das proteínas associadas à RNA pol II bloqueada, e que participam do processo de *backtracking* ou retirada da polimerase para permitir o recrutamento e o acesso da maquinaria de reparo: CSA, CSB, XAB2, TFHHS, HMGN1 e p300 (Fousteri et al, 2006). Mais recentemente, três laboratórios descreveram simultaneamente mais duas proteínas participantes desse processo, UVSSA e USP7 (Zhang et al, 2012; Nakazawa et al, 2012; Schwertman et al, 2012).

A proteína CSA (produto do gene *CSA*/*ERCC8*) possui diversos motivos WD40 repetidos, o que confere à proteína uma grande capacidade de interação com outras proteínas (Xu e Min, 2011); de fato, CSA interage com CSB, p44 (subunidade de TFIIH), XAB2, DDB1 e UVSSA (Saijo, 2013). CSA é rapidamente translocada para o núcleo após irradiação com luz UV (Kamiuchi et al, 2002) ou tratamento com outros agentes genotóxicos que também forma danos que são substratos da via de TCR, como cisplatina e H_2O_2, de forma dependente de CSB e TFIIH, auxiliando assim no recrutamento das proteínas HMGN1, XAB2 e TFIIS para a RNA pol bloqueada. CSB (*CSB/ERCC6*), uma ATPase dependente de DNA, além de ser essência na translocação de CSA para a matriz nuclear após dano genotóxico, também é recrutada para a RNA pol bloqueada após irradiação com UV (Van den Boom et al, 2004), e é essencial para o recrutamento de proteínas essencias na continuidade da via de NER: XPA, XPG, XPF, RPA e o complexo TFIIH, além de fatores ligados ao remodelamento da cromatina, como TFIIS, HMGN1 e a histona acetil-transferase (HAT) p300 (Fousteri et al, 2006). CSB não está ligada somente ao TCR, mas também a mecanismos de remodelamento de cromatina e transcrição em geral (Vélez-Cruz e Egly, 2013). A proteína UVSSA (*UVSSA*) interage com CSA, CSB e TFIIH e também é recrutada para a RNA pol bloqueada na presença de fotoprodutos (Schwertman et al, 2013). Suas funções no TCR estão ligadas à estabilização de CSB através da formação do complexo com a

desubiquitinase (DUB) USP7, impedindo a degradação de CSB na presença de estresse genotóxico, e ao recomeço da transcrição após a parada da RNA pol II através de modificações pós-traducionais como fosforilação e ubiquitinação (Nakazawa et al, 2012).

Após o reconhecimento da lesão, o GGR e o TCR convergem para uma via comum de clivagem da fita dupla, com o recrutamento dos fatores TFIIH, XPA, RPA e XPG. XPA e RPA, além do seu papel no reconhecimento da lesão, auxiliam na proteção do fragmento de DNA simples fita, além de serem importantes para a estabilização do complexo de reparo como um todo (Costa et al, 2003). O TFIIH é um complexo proteico com participação fundamental como fator de transcrição das RNA polimerases II, pol I (envolvida na transcrição de RNA ribossômico, ou rRNA) e provavelmente da pol III (envolvida na transcrição de pequenos RNAs como o rRNA 5S e dos RNAs transportadores, ou tRNAs), assim como na via de NER (Compe e Egly, 2012). Formado por dez subunidades, pode ser dividido em dois subcomplexos funcionais: o complexo *core*, com seis subunidades (XPB, p62, p52, p44, p34 e p8), e o complexo CAK (de cyclin-dependent kinase (CDK)-activating kinase), com três subunidades (CDK7, MAT1 e ciclina H). Esses dois complexos são ligados pela última subunidade, XPD, que interage com p44 e MAT1. As subunidades p62 e XPB interagem com XPC após a mudança que ocorre na sua porção C-terminal após o reconhecimento do dano na subvia de GGR (Bernardes de Jesus et al, 2008), enquanto na subvia de TCR acredita-se que CSB seja o responsável pelo recrutamento do complexo TFIIH (Hanawalt e Spivak, 2008).

As proteínas XPB (*XPB/ERCC3*)(helicase 3´-5´ dependente de ATP) e XPD (*XPD/ERCC2*)(helicase 5´-3´ dependente de ATP) são as helicases responsáveis pela abertura da dupla hélice ao redor da lesão. A atividade de helicase da proteína XPD é necessária para o NER (Coin et al, 1998), enquanto a atividade helicase de XPB é dispensável; entretanto, sua atividade ATPase é importante para o ancoramento de TFIIH no DNA danificado (Fan et al, 2006), atividade que é regulada por duas subunidades do complexo, p8 e p52, além de manter as duas fitas do DNA abertas ao redor do fragmento danificado, permitindo que XPD desenrole as fitas (Coin et al, 2007). A subunidade p8/TTDA, além de ser importante na regulação da atividade

ATPase de XPB, também participa no recrutamento de XPA. A proteína XPD, além de sua função essencial como helicase, também é importante para a manutenção da estabilidade do complexo como um todo, através da interação de sua porção C-terminal com outra subunidade do complexo, p44. É possível também que a atividade de helicase da XPD participe em mais um passo do reconhecimento da lesão; após o reconhecimento da distorção da dupla hélice pelo complexo XPC-hHR23B, XPD seria importante para verificar se há de fato a presença de uma lesão (Reardon e Sancar, 2003).

A região danificada da fita simples é excisada pelas endonucleases XPG e XPF-ERCC1, responsáveis pelas incisões 3´ e 5´, respectivamente. Após a clivagem pelo complexo XPF-ERCC1 já começa a ocorrer a síntese do novo fragmento de DNA antes que ocorra a clivagem a 3´ pela XPG, provavelmente de forma a minimizar a quantidade de DNA simples fita exposto durante o processo (Staresincic et al, 2009). XPC, XPA e TFIIH são liberados do complexo de reparo logo após a incisão a 5´. XPG (*XPG/ERCC5*), além de essencial para a incisão, também tem um papel de grande importância na estabilização do complexo TFIIH (Ito et al, 2007). O heterodímero XPF-ERCC1 é composto pelas subunidades XPF (103 kDa, produto do gene *XPF/ERCC4*) e ERCC1 (31 kDa), sendo que ambas são necessárias para a estabilização do complexo (Gaillard e Wood, 2001); XPF contém o domínio catalítico de nuclease, enquanto ERCC1 é necessário para a interação com XPA e outras proteínas de NER (Tsodikov et al, 2007). O complexo XPF-ERCC1 participa não só da via de NER mas também de outros processos de reparo, como o reparo de DSBs (Ahmad et al, 2008) e ICLs (Niedernhofer et al, 2004), além de ser essencial para a viabilidade e desenvolvimento nos seres humanos (Ahmad et al, 2010).

Após a incisão feita pelo complexo XPF-ERCC1, o recrutamento das proteínas RFC e PCNA na extremidade 3´ leva à liberação da nuclease e ao início da replicação do novo fragmento de DNA (síntese de DNA pós-reparo), utilizando a fita intacta como molde. A escolha das polimerases parece depender da fase do ciclo: em células não-proliferativas há uma preferência pelas polimerases δ ou κ, enquanto em células em proliferação a síntese é feita pela pol ε (Ogi e Lehmann, 2006; Ogi et al, 2010). A ligação da região de DNA recém-sintetizada é feita pela DNA Ligase I juntamente com

FEN1 (Tomkinson e Levin, 1997), ou pelo complexo XRCC1-DNA Ligase III (Moser et al, 2007).

1.3 Mecanismos de tolerância a dano: síntese translesão (TLS)

Como mencionado anteriormente, a presença de danos no DNA causa distorções na estrutura da dupla fita que são capazes de causar a parada na forquilha de replicação, por bloquearem a ação das polimerases replicativas; a forquilha bloqueada é uma estrutura instável, onde podem ocorrer quebras e eventos de recombinação, sendo assim potencialmente perigosa para a integridade do genoma. Além disso, a existência da forquilha parada leva à sinalização para parada no ciclo celular, que, se prolongado, pode levar à morte celular. Assim, para evitar a parada prolongada na progressão do ciclo celular, as células desenvolveram mecanismos de tolerância aos danos, permitindo a continuidade do ciclo com a possibilidade de reparar os danos posteriormente (Cordeiro-Stone et al, 1999). Existem basicamente três mecanismos de tolerância já propostos: a síntese translesão (TLS, de *Translesion Synthesis*), um mecanismo de reparo pós-replicação conhecido como *gap filling*, que envolve o preenchimento das lacunas (*gaps*) deixadas durante o processo de síntese de DNA, ambos importantes na resposta das células de mamíferos na presença de danos que levam à parada da forquilha (QUINET et al, 2014), e um mecanismo muito menos frequente conhecido como regressão da forquilha (*fork regression*), que envolve a formação de uma estrutura formada por quatro fitas duplas de DNA conhecida como *chicken foot*, na qual a fita recém-sintetizada de um dos duplex de DNA é utilizada como molde para o outro duplex (Atkinson e Mcglynn, 2009).

A utilização de DNA polimerases especializadas (polimerases TLS) capazes de continuar a replicação através do dano (*bypass*), quando ocorre o bloqueio da polimerase replicativa é o mecanismo mais conhecido, entretanto leva a uma taxa de erro elevada (Guo et al, 2009). As polimerases denominadas replicativas, responsáveis pela replicação da grande maioria do genoma (composta de DNA íntegro), fazem parte das famílias B (pols α, δ e ε, que replicam o DNA nuclear) e A (pol γ, que replica o DNA mitocondrial), e possuem diversos mecanismos que garantem a incorporação do nucleotídeo correto, além de uma atividade de exonuclease 3'$\rightarrow$5' (atividade editorial

ou de *proofreading*) que realiza a checagem do último nucleotídeo inserido, permitindo sua correção caso não seja o correto. Essas características garantem de fato um grau de fidelidade na replicação do DNA íntegro extremamente alto, com uma taxa de erro (inserção de um nucleotídeo errado ou uma inserção/deleção de um nucleotídeo) de em média 1 a cada 10^7 bases incorporadas; além disso, esses erros ainda podem ser corrigidos pela via de MMR, levando a taxas de erros ainda menores durante a replicação, de aproximadamente 1 a cada 10^{10} nucleotídeos incorporados (Mcculloch e Kunkel, 2008).

As polimerases de TLS pertencem às famílias B (pol ξ, composta das subunidades REV3L, com atividade catalítica, e REV7, que função provavelmente regulatória) e, em sua maioria, Y (κ, ι, η e REV1). Essas polimerases possuem sítios catalíticos maiores do que os das polimerases replicativas, sendo capazes de acomodar estruturas distorcidas que bloqueiam a atividade das polimerases replicativas; essa característica as torna, por outro lado, menos processivas, ou seja, elas são capazes de sintetizar um número muito menor de bases antes de se desprender do DNA do que as polimerases replicativas (Sale et al, 2012). Além disso, e por causa da ausência da atividade editorial, as polimerases TLS apresentam taxas de erro na replicação do DNA íntegro extremamente altas, em média de 1 a cada 10^4 bases incorporadas, tornando o processo de TLS potencialmente mutagênico (Matsuda et al, 2000).

Dessa forma, é importante que o acesso das pols TLS ao DNA seja finamente controlado: de fato, o modelo aceito atualmente descreve uma troca das polimerases (*polymerase switching*) que ocorre quando a polimerase replicativa é bloqueada em frente à lesão, levando à parada na forquilha de replicação. A forquilha parada é um sinal para que ocorra a monoubiquinitação do fator de processividade das polimerases PCNA pelo complexo E2/E3 ubiquitina ligase RAD6/RAD18, o que levaria a um aumento da afinidade das pols TLS (que possuem, em sua maioria, domínios de interação com PCNA – PIP – e ubiquitina – UBZ)(Waters et al, 2009) e à troca da pol replicativa pela pol TLS (Kannouche et al, 2004). Após o *bypass*, PCNA é desubiquitinado pela DUB USP1, o que leva à perda da afinidade da pol TLS e à volta da pol replicativa (Huang et al, 2006)(Figura 7). Dependendo do tipo de lesão encontrado, como por exemplo adutos de cisplatina ou sítios AP, o processo de *bypass* pode

depender da ação sequencial de duas polimerases, uma responsável pela inserção do nucleotídeo frente à lesão e outra pela extensão do novo fragmento de DNA (Shachar et al, 2009).

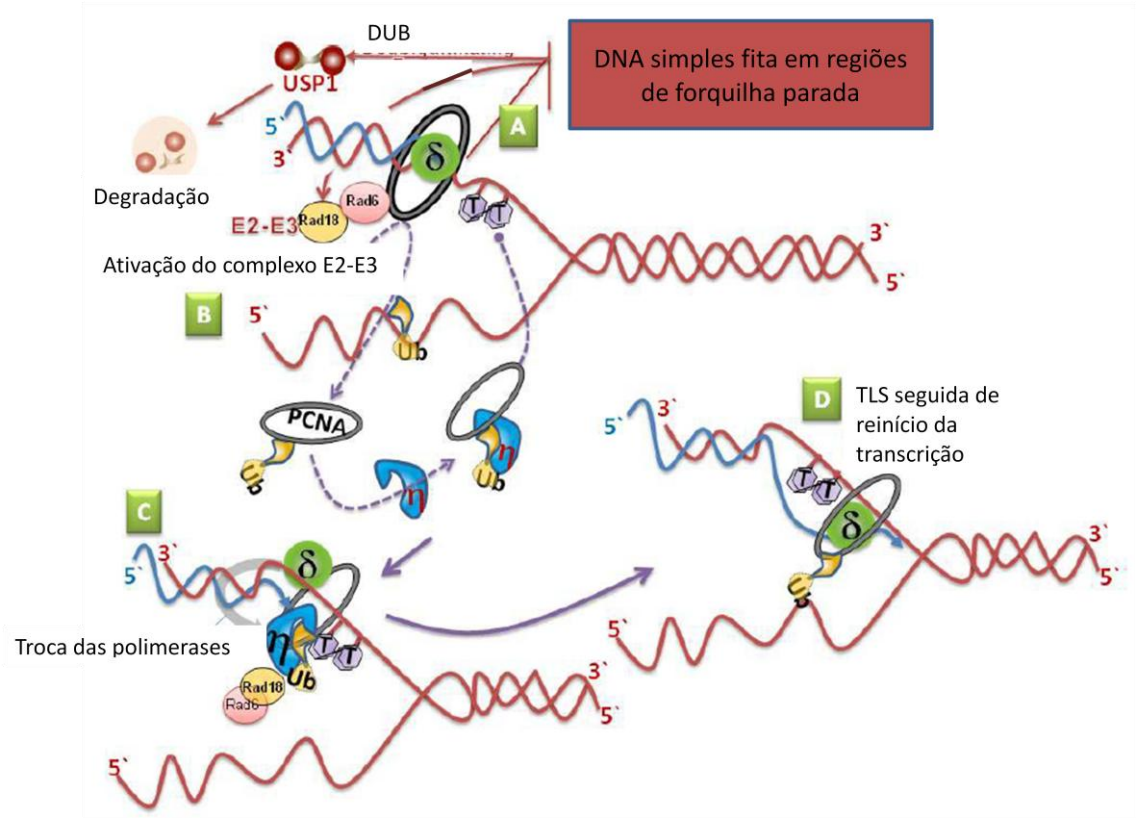


Figura 7: Mecanismo de Síntese Translesão (TLS). Na presença de DNA simples-fita após a parada na forquilha de replicação, causada pela presença de danos distorsivos no DNA (TT-CPD), PCNA é monoubiquitinado pelo complexo Rad6-Rad18, fazendo com que haja a troca da polimerase replicativa (δ) pela polimerase de TLS (η). Após o *bypass* da lesão, PCNA é desubiquitinado pela DUB USP1, fazendo com que a polimerase replicativa volte a replicar o DNA. O *bypass* da lesão mostrada na figura (TT-CPD) pela polimerase η é um processo livre de erro. Adaptado de Moraes et al, 2012a).

As pols TLS não participam apenas do processo de TLS, mas também de diversas vias de reparo (Lange et al, 2011), de replicação da cromatina onde há regiões com DNA de estrutura diferente da forma B-DNA (Boyer et al, 2013), assim como de processos ligados ao sistema imunológico, como a recombinação V(D)J e a hipermutação somática (SHM, de *Somatic Hypermutation*)(Weill e Reynaud, 2008). Além disso, algumas das funções das pols TLS, ligadas ou não ao *bypass* de lesões, ainda não foram completamente elucidados; algumas dessas funções podem ser

essenciais para o desenvolvimento correto dos organismos, como mostra o camundongo deficiente em REV3L (subunidade catalítica da pol ξ), que apresenta letalidade embrionária (Wittschieben et al, 2000).

1.4 Doenças relacionadas à deficiência nos genes de reparo

A importância do reparo no DNA na manutenção da homeostase dos organismos, assim como na prevenção dos processos de carcinogênese, é demonstrada pela existência de diversas síndromes genéticas humanas causadas por defeitos nas diferentes vias de reparo (Lehmann, 2003; Menck e Munford, 2014). Entre elas estão síndromes causadas por mutações nas vias de NER (como Xeroderma Pigmentosum, Síndrome de Cockayne e Tricotiodistrofia), por deficiências no reparo de ICLs (Anemia de Fanconi) ou de DSBs (Ataxia Telangiectasia, Síndrome de Seckel, Síndrome de Werner, Síndrome de Bloom), para citar somente alguns exemplos. A maioria destas síndromes está associada, entre manifestações sistêmicas relacionadas aos sistemas imunológico e nervoso, a processos de envelhecimento precoce e a um grande aumento na incidência de tumores nos pacientes afetados, quando comparados com a população em geral (Brosh, 2013).

1.4.1 Doenças relacionadas à deficiência em NER

As doenças causadas por deficiências em NER são Xeroderma Pigmentosum (XP), XP com complicações neurológicas, Síndrome de DeSanctis-Cacchione, Síndrome de Cockayne (CS), síndrome cérebro-óculo-facio-esquelética (COFS), Síndrome UV-Sensível (UVSS, de *UV-Sensitive Syndrome*), tricotiodistrofia (TTD), Síndrome XPF-ERCC1 (XFE) e pacientes com sintomas combinados de XP e CS ou TTD (Cleaver e Revet, 2008; Gregg et al, 2011).

1.4.2 Xeroderma Pigmentosum (XP)

A síndrome Xeroderma Pigmentosum (XP) é uma doença autossômica recessiva rara que foi primeiramente descrita em 1874 (Hebra e Kaposi, 1874), mas somente em 1968 ela foi associada a deficiências no reparo dos danos causados no DNA por luz UV (Cleaver, 1968), sendo a primeira síndrome humana associada a deficiências no metabolismo do DNA. Estudos realizados na década de 70, através da fusão de células

proficientes e deficientes e análise da capacidade da célula fusionada de complementar o defeito no reparo (Weerd-Kastelein et al, 1972), e posteriormente com a clonagem dos genes na década de 90, determinaram-se sete grupos de complementação denominados XP-A até XP-G que apresentam defeitos em NER (De Boer e Hoeijmakers, 2000), e um oitavo grupo denominado XP-V (XP variante), que é proficiente em NER e apresenta mutações na polimerase TLS η (pol eta ou *POLH*), importante na síntese de DNA na presença de fotolesões (Johnson et al, 1999; Masutani et al, 1999). A incidência de XP varia de acordo com a região, sendo de 1:450.000 na Europa e nos Estados Unidos (Kleijer et al, 2008), podendo aumentar para aproximadamente 1:20.000 em algumas regiões como o Japão, onde há um forte efeito fundador de mutações em XPA (Hirai et al, 2006), no norte da África, com prevalência de mutações em XPC (Soufir et al, 2010), e no centro do Brasil, onde há uma população com grande incidência de mutações em XPV (Chaibub, 2013).

Os sintomas mais freqüentes são a fotossensibilidade, ressecamento (xerose), expessamento e grande surgimento de sardas, pintas e bolhas na pele de áreas expostas à luz solar (*poikiloderma*), fotofobia, desenvolvimento de múltiplos tumores de pele, olhos e mucosas da boca nas áreas expostas à luz solar, e, em alguns pacientes, neurodegeneração progressiva (Digiovanna e Kraemer, 2012). Os sintomas cutâneos costumam aparecer na infância, logo nas primeiras exposições dos bebês à luz solar, e são variáveis de acordo com o grupo de complementação: pacientes XP-A, -B, -D e –G apresentam alterações na pigmentação e queimaduras mais graves dos que os grupos –C, -E e –V.

Em relação ao surgimento de tumores nas áreas expostas à luz solar, pacientes XP com menos de 20 anos apresentam uma incidência 10.000 vezes maior do que a população geral de desenvolver carcinomas cutâneos, 2.000 vezes maior de desenvolver melanomas, 1.000 vezes maior de tumores oculares e 100.000 vezes maior de desenvolver tumores na língua (Bradford et al, 2011). Além disso, existe entre os pacientes XP com menos de 20 anos uma incidência mais elevada também de tumores do sistema nervoso central (Kraemer et al, 1994). 90% dos tumores de pacientes XP apresentaram mutações do tipo transição C$\rightarrow$T em sítios de dipirimidina no gene p53, consideradas uma assinatura molecular da radiação por UV; a taxa de

mutação de p53 nos tumores de pele da população em geral é muito menor, de cerca de 50% (Giglia-Mari e Sarasin, 2003), em um exemplo da importância da luz solar na etiologia dos tumores desses pacientes.

Aproximadamente 25-30% dos pacientes XP desenvolvem anormalidades neurológicas, pertencentes aos grupos de complementação XP-A, -B, -D e -G (Kraemer et al, 1987). A idade ao surgimento varia do início da infância (em geral XP-A) até a segunda década de vida, assim como a severidade dos sintomas, que variam desde reflexos diminuídos até sintomas graves como microcefalia, perda da audição, e perda progressiva da capacidade intelectual podendo levar a dificuldades da fala, do andar e da alimentação (Kraemer et al, 2007). Os sintomas neurológicos estão associados a uma degeneração progressiva dos neurônios, levando à atrofia do córtex e concomitante aumento da espessura do osso do crânio (Rapin et al, 2000).

De fato, o desenvolvimento de tumores, assim como dos sintomas neurológicos, é responsável por uma diminuição de aproximadamente 30 anos na expectativa de vida dos pacientes XP, quando comparados com a população: a expectativa de vida dos pacientes XP sem sintomas neurológicos morrem é de em média 37 anos, enquanto a dos pacientes com sintomas neurológicos de apenas 29 anos (Bradford et al, 2011). Enquanto a etiologia dos tumores de pele dos pacientes XP está claramente ligada à radiação solar, as lesões responsáveis pelo desenvolvimento da neurodegeneração é muito menos compreendida. Atualmente acredita-se que haja um papel das lesões complexas formadas por estresse oxidativo, provavelmente de origem endógena (Brooks, 2007; Menck e Munford, 2014), porém esse assunto ainda é motivo de diversos estudos e controvérsias, e será melhor discutido posteriormente.

Em 1932, de Sanctis e Cacchione descreveram três irmãos com sintomas de XP, deficiência mental, nanismo, hipoplasia gonadal e neurodegeneração progressiva já aos 2 anos de idade (Digiovanna e Kraemer, 2012). No passado, indivíduos XP com qualquer sintoma de anormalidade neurológica era denominado XP/DeSanctis-Cacchione; entretanto, atualmente esse termo só é utilizado para os pacientes com doença neurológica severa, nanismo e desenvolvimento sexual incompleto, que é um

quadro muito mais raro do que o XP com complicações neurológicas (Kraemer et al, 2007).

O diagnóstico precoce da síndrome XP é de extrema importância uma vez que os pacientes protegidos da luz solar desde a infância não desenvolvem lesões na pele. Até o momento não existe cura para a doença. O tratamento é feito através do acompanhamento médico regular e da remoção cirúrgica das lesões (Mareddy et al, 2013). Foi documentada a prevenção do surgimento de novas neoplasias durante a administração via oral de um derivado do ácido retinóico (isotretinoína), embora com efeitos colaterais relativamente severos (Kraemer et al, 1988). O uso tópico de uma formulação lipossomal com a enzima T4 endonuclease V do vírus bacteriófago (T4N5) mostrou-se capaz de diminuir o aparecimento de lesões cutâneas (Yarosh et al, 2001). A terapia gênica pode representar uma nova forma de terapia para os pacientes XP: de fato, experimentos *in vitro* mostraram que vetores virais são capazes de corrigir as deficiências de reparo das células desses pacientes, assim como de prevenir o surgimento de tumores em modelos animais (Menck et al, 2007). Recentemente, queratinócitos XP-C corrigidos com vetores retrovirais apresentaram correção da deficiência em reparo e capacidade de se diferenciar normalmente tanto em culturas organotípicas quanto em modelos murinos de regeneração de pele humana (Warrick et a, 2012), representando esperanças no avanço das técnicas de terapia gênica *ex vivo* para pacientes XP.

1.4.3 Síndrome de Cockayne (CS)

A Síndrome de Cockayne também é uma doença genética autossômica recessiva, descrita pela primeira vez em 1936 por Edward Cockayne; ele descreveu dois pacientes gravemente afetados por nanismo caquético (baixa estatura associada a dificuldades na alimentação devido à falta de apetite, levando à perda de peso e de massa muscular, e fadiga), atrofia da retina e surdez (Cockayne, 1936). Além disso, os pacientes apresentam retardo mental grave, microcefalia, anormalidades esqueléticas, problemas no crescimento, problemas dentários, fotossensibilidade cutânea, e aparência típica com olhos profundos e queixo proeminente, devido principalmente à perda do tecido adiposo subcutâneo e da órbita ocular (Nance e Berry, 1992).

Em geral os sintomas aparecem nos primeiros anos de vida, entretanto em alguns casos já se manifestam no nascimento; de acordo com a idade ao surgimento dos sintomas, os pacientes podem ser divididos em CS tipo I (início da infância, antes dos 2 anos), II (anterior ao tipo I, nascimento) e III (após o tipo I, 3-4 anos). Existe uma extensa variabilidade na presença assim como na severidade dos sintomas; em geral a maioria dos sintomas está presente em todos os pacientes, com variações na idade ao surgimento e na velicidade da progressão da doença, sendo que todos os pacientes apresentam uma piora progressiva dos sintomas. A expectativa de vida dos pacientes tipo I é de aproximadamente 16 anos, do tipo II entre 5 e 6 anos, e do tipo III de 30 anos (Laugel, 2013).

CS é causada por mutações nos genes *CSA/ERCC8* (35% dos casos) e *CSB/ERCC6* (65% dos casos)(Laugel et al, 2010); em geral mutações em *CSA* estão associadas aos fenópicos mais brandos (tipos I e III), enquanto as mutações em *CSB* levam à forma mais grave da doença (Jaarsma et al, 2013). Mutações nos genes CS também podem levar à uma síndrome mais grave, denominada síndrome cérebro-óculo-fácio-esquelética (COFS), assim como a uma síndrome muito branda conhecida como síndrome UV-sensível (UVSS). COFS é caracterizada por sintomas do tipo CS II, além de artrogripose (deficiências nas articulações e na musculatura), microcefalia, catarata e microftalmia; esses sintomas apresentam-se mesmo antes do nascimento, e levam a uma expectativa de vida extremamente curta. Os pacientes COFS apresentam mutações em *CSB* (Meira et al, 2000), *XPD* (Graham et al, 2001), *XPG* (Hamel et al, 1996) ou *ERCC1* (Jaspers et al, 2007). UVSS é caracterizada somente por fotossensibilidade, sem nenhum outro sintoma de CS, nem aumento na incidência de desenvolvimento de câncer; os pacientes UVSS podem ser mutações em *CSA* (Nardo et al, 2009), *CSB* (Horibata et al, 2004) ou *UVSSA* (Nakazawa et al 2012; Schwertman et al, 2012; Zhang et al, 2012).

Enquanto os problemas neurológicos apresentados pelos pacientes XP são causados por um processo de degeneração neuronal, a disfunção neurológica progressiva dos pacientes CS é resultante de um processo patológico diferente, ligado primariamente à desmielinização ou hipomielinização, que ocorre desde o início do desenvolvimento (Koob et al, 2010). Outras características da patologia neurológica de

CS é o tamanho extremamente pequeno do cérebro, soma de problemas no desenvolvimento assim como da atrofia do tecido cerebral (Weidenheim et al, 2009); depósitos de cálcio e outros minerais no cérebro; vasculopatias, como microvasculopatia (Hayashi et al, 2012), e presença de células anormais no cérebro, como células de Purkinje distróficas, astrócitos e neurônios multinucleados; ainda não se sabe se a presença dessas células é resultado da progressão da doença, ou se elas fazem parte do processo patológico (Brooks, 2013).

Assim como as células XP, as células CS são sensíveis ao tratamento com UV (Schmickel et al, 1977), posteriormente atribuída à deficiência na capacidade de recomeçar a síntese de RNA após danos gerados por UV (Lehmann et al, 1979), causada pela deficiência no TCR (Van Hoffen et al, 1993). As células CS apresentam deficiência no reparo de CPDs porém reparam normalmente os 6,4-PPs (Barrett et al, 1991), provavelmente pela maior distorção que os 6,4-PPs causa na dupla fita, levando ao rápido reconhecimento por XPC e reparo pela via de GGR antes que ocorra a parada na transcrição. Além da deficiência no reparo de CPDs, células CS também apresentam deficiência no reparo de lesões causadas por estresse oxidativo (Spivak e Hanawalt, 2006); a participação de CSA e CSB no reparo desse tipo de lesões será melhor discutida posteriormente. Apesar das deficiências em NER, os pacientes CS não apresentam lesões na pele ou aumento na incidência de tumores de pele, como ocorre nos casos de XP.

Além de fazer parte da via de TCR, as proteínas CSA e CSB também são importantes nos processos de regulação da transcrição, pela sua interação com a RNA pol II, que ocorrem na presença de danos genotóxicos, mas que também podem ser importantes na transcrição em geral (Cleaver et al, 2013); de fato, camundongos deficientes em CSB apresentam deficiências no processo de mielinização do cérebro devido à incapacidade dos oligodendrócitos de produzir ou manter níveis normais de produção de mielina (Revet et al, 2012). Além disso, recentemente foi descrita a presença de CSA e CSB na mitocôndria (Aamann et al, 2010; Kamenisch et al, 2010), onde essas proteínas parecem ser importantes no reparo do mtDNA, assim como na manutenção do estado redox das células (Pascucci et al, 2012). Dessa forma, ainda não há certeza sobre qual o mecanismo mais importante na patologia (principalmente

neurológica) de CS, se são as deficiências no reparo ou na transcrição (Brooks, 2013), ou um mecanismo conjunto (Jaarsma et al, 2011); além disso, no caso da deficiência de reparo, também existe controvérsia sobre qual seria o tipo de dano responsável pela patologia neurológica (Cleaver et al, 2013).

1.4.4 Tricotiodistrofia (TTD)

A tricotiodistrofia é uma doença rara, autossômica recessiva, descrita inicialmente no fim da década de 60 (Pollitt et al, 1968), cuja principal característica é a fragilidade de cabelos e pêlos, que ficam quebradiços por causa de uma grande diminuição no conteúdo da matriz protéica dos cabelos (principalmente cisteína, mas também metionina e possivelmente outros aminoácidos); as fibras de cabelos dos pacientes TTD, quando observadas em microscópio com luz polarizada, apresentam bandas claras e escuras alternadas (chamada de “rabo de tigre”), o que é um grande indicativo de diagnóstico de TTD. O termo tricotiodistrofia foi proposto por Price em 1979, para designar pacientes com cabelos quebradiços e deficientes em enxofre, associados a anomalias neuroectodérmicas. Outros sintomas são retardo mental, autismo, rosto característico com displasia cranial, anormalidades na pele, unhas e ossos, estatura reduzida, e diversos problemas oculares, imunológicos e de fertilidade (Itin et al, 2001).

Existe uma grande heterogeneidade tanto no tipo quanto na severidade dos sintomas: em casos mais graves há um retardo severo nas capacidades motoras e mentais, dificuldades na fala, e morte durante a infância (em média 6 anos) geralmente associada a infecções bacterianas (Stefanini et al, 2010); em alguns casos há anormalidades desde o nascimento, inclusive com complicações no parto. Os pacientes moderadamente afetados apresentam baixa estatura, coordenação motora reduzida, retardo mental mais leve e puberdade tardia, e geralmente sobrevivem até a adolescência; há casos em que os pacientes apresentam apenas sintomas nos cabelos, pele e unhas (Faghri et al, 2008). Os pacientes TTD, assim como os CS, apresentam desmielinização do sistema nervoso central (Itin et al, 2001).

40-50% dos pacientes TTD apresentam sensibilidade à luz solar, mas não há mudanças na pigmentação ou desenvolvimento de tumores malignos como ocorre nos

pacientes XP (Lehmann, 2001). Mutações em três genes são responsáveis pelo fenótipo TTD associado à fotossensibilidade: *XPB* (Weeda et al, 1997), *XPD* (Stefanini et al, 1993; Broughton et al, 1994) e *TTDA* (Giglia-Mari et al, 2004), todos componentes do complexo TFIIH, essencial para a transcrição basal assim como para o NER; dessa forma, assim como CS, a patologia de TTD está associada a deficiências na transcrição, e não só no reparo. Mutações em qualquer um dos três genes leva a uma sensibilidade ao tratamento com luz UVC (Nishiwaki et al, 2004) e diminuição de em média 70% nos níveis celulares de TFIIH (Botta et al, 2002).

Em geral, mutações em *TTDA* ou *XPB* levam a um fenótipo de brando a moderado, enquanto as mutações em *XPD* (a maioria) estão associadas aos fenótipos mais severos (Stefanini et al, 2010). Apesar da fotossensibilidade, a ausência de desenvolvimento de tumores (pelo menos de pele e associados à exposição solar) pode ser parcialmente explicada pela capacidade dessas células em repararem 6,4-PPs e parcialmente CPDs quando em crescimento exponencial (Riou et al, 2004); essa diferença pode estar ligada à deficiência dessas células no recrutamento de TFIIH e de outras proteínas de NER recrutadas pelo complexo especificamente para regiões contendo CPDs (Chiganças et al, 2008). Existem pacientes que não apresentam fotossensibilidade, e ainda não foram encontrados todos os genes responsáveis por essa forma da doença; aproximadamente 20% desses pacientes apresentam mutações no gene *TTDN1* (de função desconhecida), níveis normais de TFIIH e resposta normal à luz UV (Nakabayashi et al, 2005; Botta et al, 2007).

1.4.5 Mutações em *XPD/ERCC2*

O gene *XPD*/*ERCC2* (19q13) codifica para a helicase 5’-3’ dependente de ATP, uma proteína de 760 aminoácidos que é parte do complexo de reparo/transcrição TFIIH; além da atividade de helicase essencial para o NER, XPD também tem um papel na estabilização do complexo, através da interação com os dois subcomplexos de TFIIH (CAK e *core*). Também participa do reconhecimento da lesão (Yokoi et al, 2000), através de diferentes mudanças na conformação da proteína XPD (Buechner et al, 2014). Na transcrição, após o posicionamento do complexo de pré-iniciação (TFIIA, TFIIB, TFIID, TFIIE, TFIIF e na RNA polimerase II), TFIIH é responsável pela abertura da

dupla fita na região próxima ao promotor, através da atividade de helicase de XPB (Holstege et al, 1996), além de fosforilar o domínio C-terminal da RNA pol II através da atividade de quinase de CDK7 (Feaver et al, 1991); essa fosforilação é necessária para evitar o bloqueio do complexo no promotor e para o início da transcrição (Dvir et al, 1997).

XPD também pode ser encontrada associada à subunidade CAK sem a subunidade *core* do TFIIH (Reardon et al, 1996); a quinase CAK é necessária para a entrada da célula em mitose através da fosforilação do complexo CDK1/ciclinaB1 (Larochelle et al, 2007). Recentemente foi descrita a participação de XPD em um complexo independente de TFIIH, o complexo MMS19-XPD (composto pelas proteínas MMS19, XPD, MIP18, Ciao1 e ANT2), que se localiza no fuso mitótico e é importante para a correta segregação dos fusos (Ito et al, 2010).

As mutações no gene *XPD* estão associadas a manifestações clínicas diferentes, com grande diversidade nos sintomas, assim como na severidade: XP-D, TTD, XP-D/TTD, XP-D/CS e COFS (Lehmann, 2008). A tabela 1 mostra um resumo dos fenótipos encontrados nos pacientes XP, XP/CS e TTD com mutações em *XPD*. Apesar da grande diferença entre os fenótipos dos pacientes e da sensibilidade à UV, a complementação das células de pacientes XPD, TTD e XP-D/CS com o cDNA do gene *XPD* é capaz de restaurar a capacidade de reparo dos três fenótipos (Armelini et al, 2005). Estudos em camundongos XPD-nocaute mostraram que mutações levando à perda de função da proteína são letais embrionárias, o que indica que esse é um gene essencial (De Boer et al, 1998a). Assim, indivíduos com dois alelos nulos não são viáveis, e os pacientes XP-D possuem mutações que levam à produção de uma proteína alterada, porém parcialmente funcional (Taylor et al, 1997). A maioria dos pacientes com mutações em *XPD* são heterozigotos compostos, sendo que os dois alelos contribuem para o fenótipo desses pacientes, alterando conjuntamente a estabilidade do complexo TFIIH e a atividade de helicase da proteína XPD (Ueda et al, 2009).

Tabela 1: Manifestações clínicas dos pacientes com mutações no gene *XPD*.

	XP-D	XP-D/CS	TTD/XPD
Sensibilidade à luz solar	++	++	++
Aumento na pigmentação da pele	++	-	-
Câncer de pele	++	-	-
Ictiose	-	-	+
Cabelos, pêlos e unhas quebradiços	-	-	+
Redução progressiva das capacidades mentais	+	++	+
Degeneração neuronal	+	-	-
Calcificações no cérebro	-	+	+/-
Desmielinização	-	+	+/-
Ataxia	+/-	+	-
Degeneração da retina	-	+	-
Nanismo	+/-	++	++
Surdez	+	+	-
Perda de gordura subcutânea	-	+	-

+/-, alguns pacientes afetados

Existem modelos murinos de XP/CS e TTD com mutações em *XPD* (Andressoo et al 2006; De Boer et al, 1998b), que recapitulam alguns dos fenótipos dos pacientes, porém com algumas diferenças : o camundongo Xpd^{XPCS} apresenta alta incidência de câncer de pele induzido por luz UVB, expectativa de vida reduzida (talvez ligada ao desenvolvimento de tumores espontâneos), peso reduzido, aparência caquética e deficiências leves no comportamento e na movimentação; as anormalidades neurológicas desses camundongos são semelhantes aos modelos murinos de CS, $Csb^{m/m}$ e $Csa^{-/-}$. O camundongo Xpd^{TTD} apresenta pelos curtos, quebradiços e deficientes em cisteína, anormalidades na pele, perda de gordura subcutânea e níveis reduzidos de hemáceas, entretanto apresenta anormalidades neurológicas leves (Jaarsma et al, 2013). O camundongo $Xpd^{XPCS/TTD}$ mostra que há uma espécie de dominância de um alelo sobre outro que varia nos diferentes tecidos: o camundongo

apresenta diminuição da sensibilidade à luz UV e surgimento de tumores de pele, assim como diminuição dos sintomas típicos de TTD (Van de Ven et al, 2012).

Em 2008, a resolução das estruturas cristalográficas das proteínas ortólogas XPD homólogas às de três diferentes Arquéias (Figura 8b), *Thermoplasma acidophilum* (Wolski et al, 2008), *Sulfolobus acidocaldarius* (Fan et al, 2008) e *Sulfolobus tokodaii* (Liu et al, 2008) foi de grande importância para a elucidação do impacto das mutações típicas de XP, XP/CS ou TTD sobre a funcionalidade da proteína e na estabilidade do complexo TFIIH como um todo. As estruturas cristalizadas mostram que a proteína XPD contém dois domínios de helicase RecA-like, HD1 e HD2, separados por uma fissura contendo o domínio de ligação com ATP; um terceiro domínio composto por um *cluster* 4FeS; e um quarto domínio denominado "Arch"; os domínios 4FeS e Arch estão inseridos no HD1. A proteína forma uma espécie de roda com um buraco no meio, e tem uma estrutura muito semelhante à UvrB, o homólogo funcional de XPD em bactérias (Wolski et al, 2008). O domínio 4FeS é composto por seis α-hélices e quatro cisteínas coordenando os átomos de Fe; sua importância é demonstrada pela perda da atividade de helicase da proteína após a mutação de qualquer uma das cisteínas, e pela perda da estrutura da proteína quando o Fe é oxidado (Fan et al, 2008). O domínio Arch também é composto basicamente por α-hélices com um ângulo formado entre dois grupos de α-hélices, originando uma estrutura em forma de arco. Nenhum dos grupos obteve a estrutura da proteína ligada ao DNA, mas todos fizeram a mesma predição da posição do DNA, sendo uma simples fita passando entre os domínios HD2 e Arch, e depois entre o túnel formado pelos domínios Arch, 4FeS e HD1.

Mutações em *XPD* que levam ao fenótipo XP são encontradas geralmente nas faces dos domínios HD1 e HD2 que provavelmente interagem com o DNA, ou próximas ao domínio de ligação com ATP; essas mutações reduzem drasticamente a atividade de helicase da proteína, ao modificarem sítios catalíticos conservados ou regiões de ligação com DNA ou ATP, sem causar mudanças na estrutura do complexo TFIIH como um todo. As mutações do tipo XP/CS estão agrupadas próximo ao domínio de ligação com ATP, e provavelmente estão ligadas ao aumento ou diminuição da flexibilidade da proteína, afetando suas mudanças conformacionais, ou ao desacoplamento da hidrólise do ATP com deslocamento do DNA. Já as mutações do tipo TTD estão

distribuídas nos domínios HD1 e HD2, levando provavelmente a uma diminuição da capacidade de ligação com outras proteínas, o que poderia desestabilizar o complexo TFIIH, além de poder reduzir a atividade de helicase; existem também mutações que desestabilizam completamente a estrutura da proteína XPD, e consequentemente de TFIIH. Duas mutações do tipo TTD são as únicas descritas nos domínios 4FeS e Arch. Há também um agrupamento de mutações TTD na região que codifica para a porção C-terminal da proteína, onde há o sítio de interação com p44, levando à perda dessa interação e consequentemente a uma grande diminuição na atividade de helicase. Não foram descritas mutações patológicas na maioria da região codificante para o domínio Arch, o que pode indicar que esse domínio é mais tolerante a pequenas alterações estruturais (Lehmann, 2008).

A figura 8a mostra os domínios funcionais da proteína XPD e os locais das mutações XP, XP/CS e TTD já descritas, assim como a estrutura da proteína mostrando os quatro domínios e as posições das mutações (b).

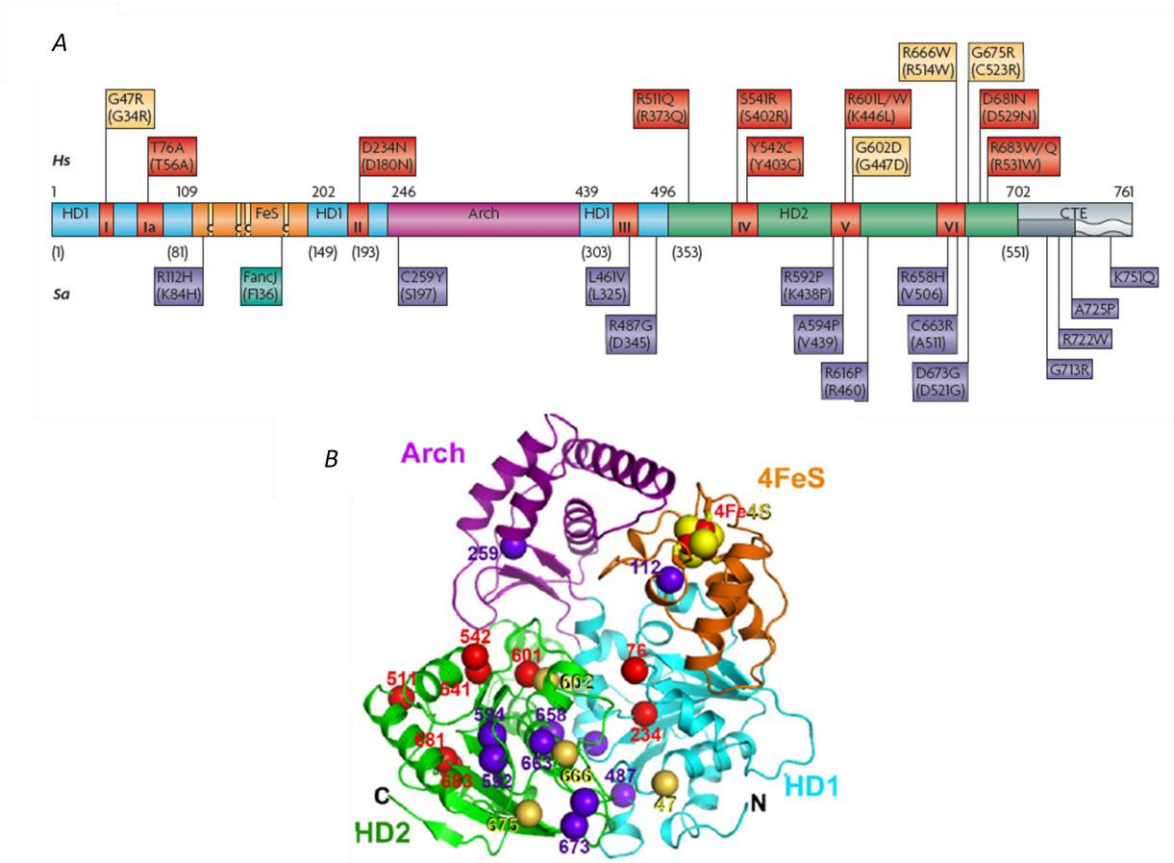


Figura 8: Domínios funcionais, estrutura e mutações da proteína XPD. A: Domínios funcionais da proteína XPD e os locais das mutações XP, XP/CS e TTD já descritas. São

mostrados os domínios HD1, HD2, 4FeS e Arch; os domínios em helicase estão em vermelho. Nas caixas aparecem as mutações dos tipos XP (vermelho), XP/CS (amarelo) e TTD (roxo); as mutações de *Homo sapiens* estão acima, e as correspondentes em *Sulfolobus acidocaldarius* estão abaixo entre parênteses. Adaptado de Cleaver et al, 2009.

B: Estrutura da proteína XPD. Os pontos representam as posições das mutações dos tipos XP (vermelho), XP/CS (amarelo) e TTD (roxo). Adaptado de Lehmann, 2008.

1.5 Xeroderma Pigmentosum Variante (XP-V)

Os pacientes XP variante (XP-V) representam aproximadamente 20% dos pacientes XP (Opletalova et al, 2014) e apresentam fenótipo clínico mais favorável do que os pacientes XP clássicos (XP-A a –G), que possuem deficiências em NER. Os portadores de XP-V não apresentam grande fotossensibilidade na infância, porém ela aumenta no início da idade adulta, quando começam a surgir as primeiras lesões malignas de pele. Além disso, esses pacientes não desenvolvem sintomas neurológicos (Tanioka et al, 2007). Em 1999, após a clonagem do cDNA do gene *XPV/POLH*, identificou-se seu produto gênico como sendo a DNA polimerase η (pol eta, XPV ou POLH), homólogo de Rad30 em leveduras, envolvida na TLS de fotoprodutos (Johnson et al, 1999; Masutani et al, 1999). A pol η é, até o momento, a única polimerase descrita cuja deficiência está associada a uma síndrome humana.

A importância da pol η é evidenciada pela maior incidência de tumores de pele nos pacientes XP-V, que, mesmo sendo menor do que nos outros grupos de pacientes XP, é maior do que a população em geral. Apesar da baixa fidelidade e processividade na replicação de DNA íntegro (Matsuda et al, 2000), pol η é especializada na síntese de DNA na presença de lesões causadas pela luz UV (Biertümpfel et al, 2010), uma vez que ela é capaz de adicionar os nucleotídeos corretos (A-A) opostos a CPDs formados por T-T (*cis-syn* dímeros de ditimina)(Masutani et al, 2000), que são as lesões mais comuns formadas após exposição à luz solar. Na ausência de pol η, outras polimerases TLS (ι e ξ) são recrutadas para fazer o *bypass* dos CPDs, entretanto, ao contrário do *bypass* feito pela pol η, esse é um processo mutagênico, sendo o responsável pelo aumento na incidência de tumores de pele dos pacientes XP-V (Waters et al, 2009).

Pol η também está ligada à TLS dos 6,4-PPs, entretanto, ao contrário das CPDs, que necessita somente de uma polimerase, o *bypass* dos fotoprodutos é feito por duas polimerases: η ou ι como insersoras (síntese do nucleotídeo frente à lesão) e ξ como extensora (continuação da síntese de DNA na lacuna), em um processo geralmente mutagênico (Prakash et al, 2005). Pol η também está implicada na TLS de outras lesões não relacionadas às fotolesões, como 8-oxoG (Haracksa et al, 2000a), O^6-MeG (Haracksa et al, 2000b), timina glicol (Kusumoto et al, 2002), adutos de cisplatina (Vaismann et al, 2000) e sítios AP (Choi et al, 2010). Outras funções não-canônicas de pol η estão ligadas ao reparo de lesões oxidadas em *cluster* (Zlatanou et al, 2011), à alguns mecanismos de recombinação homóloga (Kawamoto et al, 2005), e à replicação de DNA em regiões de estruturas não-canônicas (não-B) de DNA, como o G-quadruplex (estruturas secundárias formadas em regiões ricas em G), que ocorrem normalmente em algumas regiões do genoma e podem bloquear as pols replicativas (Bétous et al, 2009), e na replicação de sítios frágeis (Rey et al, 2009; Bergoglio et al, 2013).

1.5.1 O papel de pol η no processo de Hipermutação Somática (SHM)

A Hipermutação Somática (SHM, de *Somatic Hypermutation*) é um processo mutagênico específico que ocorre nos centros germinativos dos órgãos linfóides secundários, capaz de diversificar os genes das imunoglobulinas durante a resposta a determinado antígeno, através da seleção de células B possuindo receptores com maior afinidade pelo antígeno (Weill e Reynaud, 2008). Durante o processo de SHM são introduzidas (em sua maioria) mutações pontuais nos genes codificantes para as regiões variáveis das cadeias pesada (V_H) e leve (V_L) das imunoglobulinas, o que ocorre quando as células já passaram pelo processo de recombinação V(D)J, e após o estímulo das células B pelos linfócitos T (Longo e Lipsky, 2006). Esse processo é filogeneticamente conservado e foi observado desde os peixes cartilaginosos até os mamíferos (Diaz e Flajnik, 1998). As células B, que foram selecionadas por possuírem um receptor BCR (*B Cell Receptor*) com maior afinidade pelo antígeno após a SHM, podem se diferenciar em plasmócitos ou células B de memória, conferindo proteção a longo prazo contra o antígeno específico.

O processo de SHM é iniciado pela enzima AID (*activation-induced cytidine deaminase*), que catalisa a desaminação de citidinas em uracilas em regiões específicas das cadeias V_H e V_L dos genes (já rearranjados) das imunoglobulinas. As mutações se estendem em uma região de aproximadamente 2 kb, e ocorrem principalmente nos exons codificantes dos genes V(D)J e a juzante do intron J, em uma frequência 1 milhão de vezes maior que no restante do genoma, de uma mutação a cada 100 ou 1000 pares de bases (Saribasak e Gearhart, 2012). Há atualmente muitos estudos sobre os motivos que levam à maior atividade da AID nos genes das Igs em comparação ao restante do genoma, tanto nos níveis globais (H, κ e λ) quanto regionais (regiões V e *switch*, além de *hotspots* locais).

Dentre as diversas enzimas de reparo capazes de reparar lesões do tipo uracila nas células eucarióticas, demonstrou-se até agora a participação da glicosilase UNG e do complexo de reconhecimento da via MMR, MSH2-MSH6, durante o processo de SHM (Delbos et al, 2006). Após a excisão da uracila do par U:G pela UNG, o sítio abásico formado na frente da guanina é convertido em uma SSB pela enzima APE1; entretanto, se o par U:G for reconhecido pelo complexo MSH2-MSH6, o sítio abásico é formado pela enzima Exo1. Após a remoção da uracila pela UNG ou Exo1, há o recrutamento de polimerases de baixa fidelidade que irão sintetizar o novo fragmento de forma mutagênica. Na via UNG, os sítios abásicos ou regiões de DNA fita simples são resolvidos predominantemente pela polimerase Rev1, formando principalmente mutações em sítios G:C; na via MSH2-MSH6, a lacuna é preenchida pela pol η, formando mutações principalmente em sítios A:T (Reynaud et al, 2009).

As polimerases TLS foram consideradas candidatas a catalisar a geração de mutações nos sítios gerados pela AID pela baixa fidelidade na síntese de DNA íntegro (Goodman e Tippin, 2000); de fato, em 2001 foi feita a primeira descrição da pol η como responsável pela geração de mutações nos sítios A/T gerados durante o processo de SHM (Zeng et al, 2001). Esse estudo demonstrou que os genes variáveis das imunoglobulinas de pacientes XP-V apresentam uma grande diminuição das mutações nos sítios A/T (de aproximadamente 50% para menos de 10%, com um aumento concomitante nas mutações em sítios G/C), em comparação com a população em geral, apesar do número de mutações não sofrer alteração significativa.

O mesmo fenótipo foi encontrado em camundongos deficientes em pol η (Delbos et al, 2005), MSH2 (Phung et al, 1998), MSH6 (Wiesendanger et al, 2000) e Exo1 (Bardwell et al, 2004).

Através da descrição de um paciente XP-V, portador de uma mutação em uma região não-codificante do gene que levava à produção de uma proteína funcional porém em pequena quantidade, e apresentava uma proporção de mutações em sítios A:T intermediária entre os controles e os pacientes XP-V que não produzem nenhuma proteína funcional, demonstrou-se que a frequência de mutações nos sítios A/T está diretamente relacionada à quantidade da proteína pol η funcional; assim, o sequenciamento das regiões variáveis dos genes das imunoglobulinas pode ser usado como auxílio no diagnóstico de XP-V, assim como para o estudo da funcionalidade da proteína presente nas células dos pacientes (Faili et al, 2009).

1.6 Participação de NER no reparo de danos causados por estresse oxidativo

A interconexão entre vias de reparo tem sido assunto de grande interesse na comunidade científica há vários anos, e diversos grupos têm estudado a participação de NER ou de proteínas dessa via no reparo de danos causados por estresse oxidativo no DNA (Spivak e Hanawalt, 2006; Bohr et al, 2007; Parlanti et al, 2012; D'Errico et al, 2013; Khobta e Epe, 2013), principalmente pelo amplo espectro de lesões que são reconhecidas e reparadas por NER. Além dessa flexibilidade no reparo de substratos não relacionados, diversas manifestações clínicas dos pacientes portadores de síndromes com deficiências em NER, como os graves sintomas neurológicos presentes nos pacientes XP com comprometimento neurológico, CS, XP/CS e TTD, que não podem ser explicados pela exposição desses pacientes à irradiação com luz UV (Kraemer et al, 2007), são alguns dos motivos que levaram ao início desses questionamentos.

A explicação geralmente encontrada para os sintomas neurológicos desses pacientes está na deficiência no reparo de danos causados por fontes endógenas, principalmente as ERO, que seria ainda maior por causa dos altos níveis de metabolismo energético do tecido nervoso, além da sua composição rica em lipídeos,

o que geraria um estado de estresse oxidativo constante, com produção de produtos tóxicos da LPO (Cleaver et al, 2009). Entretanto, até o momento não se tem certeza sobre a fonte desses danos, nem sobre a identidade das lesões responsáveis pelo processo patológico.

A participação do NER no reparo de lesões causadas por estresse oxidativo, assim como a influência das deficiências do reparo dessas lesões na patologia neurológica dos pacientes com deficiências em NER, tem sido alvo de muitos estudos, assim como de muita controvérsia. Um dos motivos está baseado no modelo de reconhecimento do TCR, que ocorre quando são formadas lesões capazes de causar uma distorção na dupla fita suficiente para levar à parada da RNA pol II. Apesar de alguns estudos terem detectado uma parada parcial da RNA pol II frente a 8-oxoG, uma das bases oxidadas mais estudadas (Stevnsner et al, 2008), em geral aceita-se que essa lesão não represente um bloqueio significativo para a transcrição (Tornaletti et al, 2004; Kathe et al, 2004; Larsen et al, 2004), sendo portanto reparada por BER.

Entretanto, como mencionado anteriormente, existe uma classe de lesões oxidadas capaz de bloquear a RNA pol II e que é substrato de reparo por NER, como as ciclopurinas e outras lesões em tandem (Brooks, 2007), lesões oxidadas em *cluster* (Cadet et al, 2012), além dos diversos adutos formado pela LPO no DNA (Berquist e Wilson, 2012). Além disso, intermediários da via de BER, como por exemplo os sítios AP gerados pela ação das glicosilases após o reconhecimento da lesão, constituem um bloqueio para a transcrição (Kitsera et al, 2011), e seriam portanto substratos de TCR. Uma hipótese é que o acúmulo dessas lesões possa causar morte neuronal por bloquear a transcrição, o que, na ausência de reparo pela deficiência em NER, seria uma das causa da patologia neurológica que ocorre nesses pacientes (Brooks, 2007).

Além do reparo de lesões complexas formadas pelo estresse oxidativo pela via de NER, outra forma de participação de NER no reparo de lesões oxidadas é através do papel regulatório de algumas proteínas de NER sobre proteínas de BER. De fato, já foram descritas interações entre proteínas de NER e diversas glicosilases, como por exemplo XPG e NTH1 (Klungland et al, 1999a), XPC e OGG1 (D'Errico et al, 2006), CSB e NEIL1 (Muftuoglu et al, 2009) e NEIL2 (Aamann et al, 2014), entre outras; essas

interações são responsáveis pelo aumento da atividade dessas glicosilases, e consequentemente pelo aumento da capacidade das células em lidar com esse tipo de danos genotóxicos.

Dessa forma, existem diversos artigos que descreveram a participação de proteínas do NER no reparo de danos causados por estresse oxidativo no DNA, seja através da interação com proteínas de BER, seja através do reparo de lesões distorsivas/complexas, ou de intermediários de BER, pela via de NER. Células XPC se mostraram mais sensíveis ao tratamento com agentes oxidantes, como IR e bromato de potássio ($KBrO_3$)(D'Errico et al, 2006) e MB (Berra et al, 2013), assim como células XPA (Berra et al, 2013), CSA e CSB (De Waard et al, 2004; D'Errico et al, 2007; Nardo et al, 2009) e XP-G/CS (Soltys et al, 2013).

Assim, levando-se em conta os indícios da participação de proteínas de NER no reparo de lesões causadas por estresse oxidativo (como XPA, XPC, CSA e CSB), a hipótese deste trabalho é de que outras proteínas relacionadas ao NER também possam ter importância na proteção das células contra o estresse oxidativo. Portanto, um dos objetivos deste trabalho é estudar a participação da proteína XPD no reparo dessas lesões, através do estudo do comportamento de células com diferentes mutações nessa proteína (XP-D, XP-D/CS e TTD/XPD).

Outros objetivos deste trabalho estão ligados ao estudo da participação da DNA TLS polimerase η em suas diversas funções na célula: na resposta a estresse oxidativo, estudando o comportamento de células de pacientes XP-V, uma vez que essa polimerase está implicada na TLS de bases oxidadas, assim como no reparo de lesões oxidadas em *cluster*; no processo de SHM, como auxílio ao diagnóstico da síndrome XP-V assim como no estudo da funcionalidade das proteínas mutadas nos pacientes (estudo realizado em colaboração com o Laboratório de Células B e Plasticidade Genômica, Institut de Cancérologie Gustave Roussy, Villejuif, França, sob orientação dos doutores Said Aoufouchi e Alain Sarasin); e sua indução na presença de danos genotóxicos, principalmente fotoprodutos.

2. OBJETIVOS

2.1 Estudar a participação da proteína XPD na resposta celular ao estresse oxidativo induzido pelo tratamento com MB fotoativado, através da análise do comportamento de células deficientes em NER com mutações diferentes em *XPD*, pertencentes a pacientes com fenótipos XP-D, XP-D/CS e TTD/XPD. Os objetivos específicos estão listados a seguir:

- Verificar a sobrevivência de fibroblastos humanos transformados e primários de fenótipos XP-D, XP/CS e TTD/XPD após a geração de estresse oxidativo induzido pelo tratamento com MB+luz e bromato de potássio ($KBrO_3$), através de ensaios de sobrevivência celular. Além disso, verificar se a expressão da proteína XPD é capaz de reverter o fenótipo de sensibilidade com ensaios de complementação.
- Estudar o padrão de danos no DNA, a cinética de reparo, as alterações no ciclo celular e da população em apoptose, assim como estudo dos mecanismos de morte celular e da cinética de sinalização em resposta a danos ao DNA, frente ao estresse oxidativo.
- Análise da capacidade das células deficientes de reparar danos causados por MB+luz em DNA plasmidial, assim como do comportamento das células frente a ausência de expressão de proteínas relacionadas ao BER (DNA polimerase β e OGG1).

2.2 Estudar a participação da polimerase η em suas diferentes funções na célula:

- Verificar sua participação na TLS ou reparo dos danos induzidos pelo tratamento com MB+luz, através de ensaios de sobrevivência, análise do ciclo, da população em apoptose e da sinalização em resposta aos danos através de citometria, utilizando fibroblastos de pacientes XP-V.
- Determinação da funcionalidade da proteína presente nas células de pacientes XP-V através do sequenciamento da região variável das imunoglobulinas.
- Estudo da indução da proteína frente a estresse genotóxico causado por luz UVC, e seu possível papel no fenótipo celular após danos genotóxicos repetidos.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Linhagens celulares

As células utilizadas neste projeto são fibroblastos humanos primários e transformados, obtidos a partir de biópsias de pele de pacientes, em região livre de tumor e não exposta à luz solar. As linhagens transformadas de genótipos MRC5, XP-D, XP-D/CS, TTD/XPD e XP-V, foram transformadas com a oncoproteína *Large T* do vírus SV-40 e cedidas pelo Dr. Alain Sarasin (Institut Gustave Roussy, Villejuif, França). Estas linhagens são descritas a seguir:

- MRC5-SV: fibroblasto de tecido pulmonar, originado de biópsia de um feto masculino de 14 semanas em 1966
- XP6BE-SV (XP-D): linhagem de fibroblasto de pele obtida a partir de biópsia de uma paciente de 20 anos, com alta fotossensibilidade, diversos tumores malignos na pele e neurodegeneração desde o início da infância (Robbins et al, 1974). A linhagem XP6BE foi transformada em 1986 por Protić-Sabjić et al. Essas células são heterozigotas compostas por um alelo com uma transversão C→T no nucleotídeo 2047, resultando na substituição do códon Arg-683 para Trp (R683W), e uma deleção de 78 nucleotídeos no exon 3, resultando na deleção dos aminoácidos 36 a 61 (del36→61) no segundo alelo do gene *XPD*, provavelmente nulo (Takayama et al, 1995)
- XPCS2-SV (XP-D/CS): linhagem de fibroblasto de pele obtida a partir de biópsia de um paciente com alta fotossensibilidade e sintomas neurológicos severos, aos 5 anos de idade (Broughton et al, 1995). A linhagem XPCS2 apresenta somente um alelo funcional do gene *XPD*, que carrega uma substituição G→A no nucleotídeo 1805, resultando na mudança do aminoácido glicina para aspartato no códon 602 (G602D) na proteína (Takayama et al, 1995)
- AS66Las/TTD2VI (TTD/XPD): linhagem de fibroblasto de pele obtida a partir de biópsia de uma paciente de 4 anos de idade, com sintomas típidos de TTD: retardo mental, baixo peso e estatura, ictiose, e cabelos e pêlos curtos e quebradiços (Sarasin et al, 1992). Essa linhagem foi transformada em 1995 por

Eveno et al, e possui uma substituição de arginina para prolina em homozigose no códon 592 (R592P)(Nishiwaki et al, 2004)

- XP30RO-SV (XP-V): linhagem estabelecida a partir de uma biópsia de pele de um paciente de 30 anos, transformada em 1999 por Cleaver et al. Essa linhagem possui uma deleção em homozigose próxima à extremidade 5' do gene *POLH* (del343-355), causando um *frameshift* e levando à síntese de uma proteína truncada, de aproximadamente 42 aminoácidos (Masutani et al, 1999)
- XP189VI (XP-C): linhagem de fibroblastos primários estabelecida a partir de biópsia de uma paciente do norte de África, portando em homozigose a mutação em *frameshift* c.1643_1644delTG (p.Val548AlafsX25) no gene *XPC*, o que leva à produção de uma proteína truncada (Soufir et al, 2010)
- FHN: linhagem de fibroblastos primários estabelecida a partir de biópsia de pele realizada no Hospital das Clínicas (FM-USP) de um paciente sem sintomas de XP.

As células de pacientes XP-V brasileiros utilizadas neste projeto foram estabelecidas no laboratório pelas Dras. Daniela Soltys (IQ, USP) e Veridiana Munford (ICB II, USP). As linhagens foram estabelecidas a partir de biópsias de pele não exposta à luz solar, enviadas ao laboratório pela dermatologista dos pacientes, para confirmação do fenótipo da síndrome XP, determinação do grupo de complementação e posteriores estudos funcionais com as células. Essas células foram transformadas com as oncoproteínas E6 e E7 do vírus HPV pela Dra. Veridiana Munford com vetores cedidos pelo Dr. Enrique Boccardo (ICB II, USP). As mutações dos pacientes XP-V brasileiros serão descritas posteriormente.

Nos ensaios com células transformadas por SV-40 a linhagem utilizada como controle é a MRC5-SV, e para as células transformadas por E6/E7 utiliza-se a linhagem de fibroblastos normais AS405 transformada por E6/E7 no laboratório. Nos ensaios com células primárias, o controle é a linhagem de fibroblastos normais FHN.

As células são cultivadas em meio DMEM (*Dulbecco´s Modified Eagle Medium*) *High Glucose* (LGC Biotecnologia, Cotia, Brasil) complementado com 10% (transformadas) ou 15% (primárias) de soro fetal bovino (SFB)(Cultilab, Campinas,

Brasil) e 1% de solução de antibiótico/antimicótico (0.1 mg/ml penicilina, 0.1 mg/ml estreptomicina e 0.25 mg/ml fungizona)(Life Technologies, EUA), a 37°C em atmosfera úmida com 5% de CO_2.

3.2 Tratamentos com agentes oxidantes: Azul de Metileno (MB) e Bromato de Potássio ($KBrO_3$)

O tratamento com MB baseia-se na fotossensibilização do MB por luz visível (comprimentos de onda maiores que 400 nm), que gera ERO (principalmente oxigênio singlete)(Epe et al, 1993). Para observar os efeitos do estresse oxidativo nas células em estudo, as células previamente plaqueadas em pré-confluência (aproximadamente 16 horas antes do tratamento, 80-90% confluência) foram lavadas com PBS, e o meio DMEM substituído pelo meio MEM-*alpha* transparente (Gibco, EUA) com 5% SFB, acrescido ou não de diferentes concentrações de MB (4 e 8 μM em H_2O). As placas foram incubadas por 90 minutos (período no qual ocorre a entrada do MB no núcleo da célula) a 37°C, e após esse período fotossensibilizadas em um negatoscópio que emite luz visível por 40 minutos (5,09 J/cm2)(Berra et al, 2013). Após a fotossensibilização, as células foram lavadas com PBS e mantidas em meio de cultura completo (DMEM + 10% SFB) na estufa até o final do experimento. As células controle "escuro" são submetidas ao mesmo tratamento, mas não são expostas à luz.

O $KBrO_3$ também é um oxidante que induz majoritariamente a formação de 8-oxodG, em um mecanismo dependente de compostos de enxofre, como glutationa ou cisteína, que reduzem $KBrO_3$ (na forma do ânion bromato, BrO_3^-) a BrO_2, capaz de abstrair um elétron da guanina, formando radicais catiônicos que, após reação com uma molécula de H_2O, levam à formação de 8-oxodG (Ballmaier e Epe, 2006; Kawanishi e Murata, 2006). O tratamento com $KBrO_3$ (Sigma-Aldrich, EUA)(5, 10 ou 20 mM em meio) foi realizado por duas horas a 37°C; após esse período o meio contendo bromato foi retirado e as células mantidas em meio de cultura completo (DMEM + 10% SFB) na estufa até o final do experimento (D'Errico et al, 2006).

3.3 Tratamentos com inibidores: cafeína, 3-Aminobenzamida (3-Ab) e pifitrina-α

Nos tratamentos com agentes genotóxicos (UVC) na presença de cafeína, as células foram mantidas em meio DMEM completo com 1 mM de cafeína (Sigma-Aldrich) por 30 minutos antes do tratamento. Após o tratamento as células foram mantidas em meio completo com cafeína até o final do experimento.

A benzamida 3-Ab ($C_7H_8N_2O$) é utilizada como inibidor da enzima PARP. Sua estrutura é muito semelhante à do NAD^+, assim sua atividade como inibidor se dá por competição com NAD^+ pela ligação à PARP, essencial para o funcionamento da enzima (Purnell e Whish, 1980). 3-Ab (Sigma-Aldrich)(2 mM em DMSO) foi adicionada ao meio por 30 minutos antes do tratamento com o agente genotóxico, e as células foram mantidas em meio completo com 3-Ab até o final do experimento.

A pifitrina-α é utilizada como inibidor reversível de p53, inibindo diversas das suas funções nas células como processos de transcrição e apoptose. A pifitrina-α (Sigma-Aldrich)(20 μM em DMSO) foi adicionada ao meio por 30 minutos antes do tratamento com o agente genotóxico, e as células foram mantidas em meio completo na presença do composto até o final do experimento.

3.4 Irradiação com luz UVC

Para os tratamentos com irradiação com luz UVC, as células previamente plaqueadas foram lavadas com PBS e posicionadas sob uma lâmpada germicida que emite principalmente luz UVC (254 nm), sem as tampas plásticas das placas. O tempo de irradiação de cada experimento foi determinada com um dosímetro (VLX 3.W, Vilber Lourmat, France) com filtro para o comprimento de onda correspondente, de acordo com a dose de energia desejada para cada experimento ou linhagem celular. Após a irradiação em PBS foi adicionado DMEM completo, e as células mantidas na estufa até o final do experimento. As células do grupo controle foram submetidas ao mesmo procedimento, excetuando-se a irradiação.

3.5 Sobrevivência clonogênica

Através deste ensaio pode-se verificar a capacidade de formação de colônias de células após o tratamento com agentes genotóxicos. Para este experimento foram plaqueadas entre mil e 3.000 células por placa de 60 mm de diâmetro, dependendo da eficiência de plaqueamento de cada linhagem transformada. Após o tratamento com MB, as células foram incubadas por sete a dez dias (dependendo da velocidade de crescimento de cada linhagem) a 37°C (trocando-se o meio a cada três dias). Após esse período as células foram lavadas com PBS, fixadas com 10% formaldeído por 10 minutos e coradas com 1% cristal violeta por 5 minutos, para a contagem das colônias. Ao final do experimento as placas dos controles continham em média entre 200 e 300 colônias; para a contagem foram consideradas apenas as colônias com mais de 15 células. A análise quantitativa foi determinada através da comparação da porcentagem de sobrevivência entre as células tratadas e não tratadas com MB.

3.6 Ensaios de viabilidade com XTT

Este ensaio baseia-se na capacidade de células intactas de metabolizar o sal incolor tretazolium (XTT) nas mitocôndrias, e transformá-lo em formazan, resultando em uma coloração alaranjada (*Cell Proliferation Kit®*, Roche, Suíça). 72 horas após o tratamento com o agente genotóxico foi adicionado o XTT na concentração final de 0.12 mg/ml, e o sobrenadante recolhido após 90-120 minutos a 37°C. A leitura da absorbância foi feita no espectrofotômetro (*GloMax Multi Detection System*, Promega, EUA), nos comprimentos de onda 492 nm (formazan) e 650 nm ("fundo"). Os valores obtidos a 650 nm foram subtraídos dos obtidos a 492 nm, e com base nestes valores foi calculada a porcentagem de sobrevivência celular.

3.7 Ensaios de fluorescência para detecção de apoptose/necrose

Esse ensaio baseia-se na capacidade diferencial de entrada dos diferentes corantes (DAF, que cora o citoplasma; Hoechst, um corante supravital intercalante da dupla-fita; e o PI, que cora somente as células com a membrana já permeabilizada) fluorescentes de acordo com a permeabilidade das membranas celulares, o que permite a análise do tipo de morte celular (apoptose ou necrose) de acordo com a

fluorescência dos corantes e da morfologia das células. Após os tratamentos e nos tempos desejados as células foram coletadas, centrifugadas, e os precipitados celulares ressuspendidos em quantidades iguais dos corantes. 10 µl da mistura foram aplicados em lâminas e visualizados em microscópio de fluorescência Carl Zeiss (Alemanha); para as análises foram contadas 500 células por amostra.

3.8 Ensaios de complementação

A complementação das células com mutações em *XPD* foi realizada através da transfecção de um plasmídeo contendo a sequência do gene *XPD/ERCC2* em IRES com a proteína GFP (pShuttle ERCC2-IRES-GFP), construído anteriormente no laboratório pela Dra. Melissa Guava Armelini (Armelini et al, 2005)(Figura 9). Esse plasmídeo foi transfectado nas células previamente plaqueadas (em pré-confluência) em placas de 96 poços com o agente de transfecção Lipofectamina 2000 (Life Technologies) em meio sem soro durante duas horas (ao final das duas horas adicionou-se meio 20% SFB para a parada da transfecção). Não foi observada grande toxicidade da lipofectamina, e as taxas de transfecção foram de aproximadamente 80-90% (visualização da proteína GFP no microscópio de fluorescência). Os tratamentos com agentes genotóxicos foram realizados 48 horas após as transfecções.

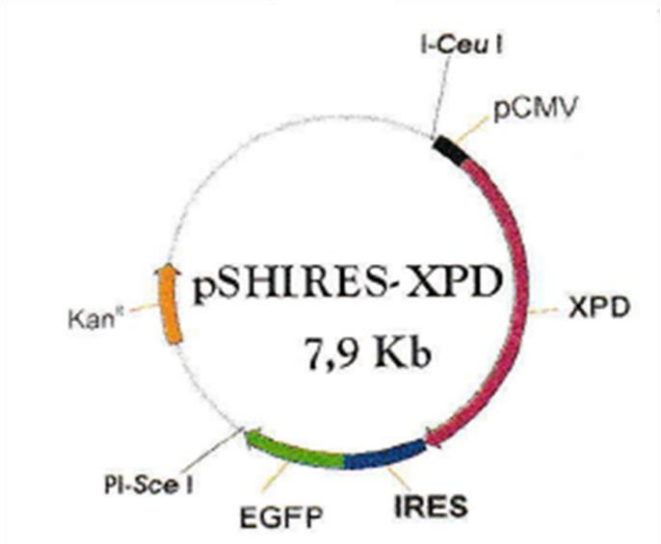


Figura 9: Plasmídeo pSHIRES-XPD utilizado nos ensaios de complementação.

3.9 Ensaios de *Host Cell Reactivation* (HCR)

O ensaio de HCR consiste na análise da capacidade de uma célula de reparar os danos causados por algum agente genotóxico ao DNA plasmidial contendo um gene repórter. A capacidade de reparo é medida pela expressão do gene repórter, que é reduzida se a célula apresentar deficiência na capacidade de reparar os danos do plasmídeo. Para os ensaios de HCR, as células previamente plaqueadas em placas de 96 poços (aproximadamente 95%) foram transfectadas com plasmídeos pShuttle contendo genes de diferentes luciferases, de vagalume e *Renilla* (pShuttle/Luc, utilizado como repórter, e pShuttle/Renilla, utilizado como normalizador da transfecção), utilizando a Lipofectamina 2000 (Life Technologies) como agente de transfecção, previamente tratados com UVC e MB e fotossensibilizados por diferentes períodos. A leitura da atividade das luciferases foi realizada 48 horas após a transfecção, com meio sem *phenol red* e sem soro, adicionado do substrato da luciferase (*Dual-Glo Luciferase Assay*, Promega) e do *quencher Stop and Glo* antes da leitura da atividade da Luc/*Renilla*, no luminômetro (*GloMax Multi Detection System*, Promega)(Soltys et al, 2013).

3.10 Extração de proteínas e Western Blot (WB)

A extração das amostras protéicas foi realizada com tampão RIPA (10 mM Tris-Cl pH 7.4, 5 mM EDTA, 150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 1% desoxicolato de sódio, 0.1% SDS) por amostra, adicionado de coquetel de inibidor de proteases (Merck Millipore, Alemanha) e PMSF (concentração final: 1 mM) ou benzonase (Millipore). As amostras foram homogeneizadas com o tampão e incubadas por 20 minutos no gelo. Após a incubação, as amostras foram centrifugadas (16000 g por 20 minutos a 4°C) e os sobrenadantes transferidos para novos tubos, armazenados a -20°C. A quantificação das amostras foi feita pelo método colorimétrico de BCA (*Pierce™ BCA Protein Assay Kit*, Thermo Scientific, EUA), com leitura a 562 nm após 30 minutos de incubação a 37°C.

Os experimentos de WB foram realizadas em géis de SDS-PAGE, em condições desnaturantes. As concentrações dos géis foram de 4% Empacotamento (625 µl Tris 1

M pH = 6.8, 665 µl Acrilamida/Bisacrilamida 30%, 25 µl SDS 20%, 100 µl APS 10%, 1.5 µl Temed e 3.6 ml água dd) e 10% Separação (2.5 ml Tris 1.5 M pH = 8.8, 4 ml Acrilamida/Bisacrilamida 30%, 50 µl SDS 20%, 200 µl APS 10%, 3 µl Temed e 3.3 ml água dd). Foram aplicados de 30-50 µg de proteína de cada amostra, desnaturados a 95°C por 3 minutos, juntamente com o Tampão de Amostra 4X (0.065 M Tris pH = 6.8, 10% glicerol, 2% SDS, 2% β-mercaptoetanol, 0.002% azul de bromofenol). A eletroforese foi realizada sob uma voltagem de 100 V, com Tampão de Corrida 1X (Tampão de Corrida 10X: 192 mM Glicina, 250 mM Tris, 1% SDS). A transferência foi realizada em membrana de nitrocelulose (Trans-Blot Transfer Medium, BioRad, EUA), previamente equilibrada por 3 minutos em Tampão de Transferência (800-900 ml Tampão de Corrida 1X, 10%-20% metanol, água dd QSP 1 L) antes da transferência, realizada por 90 minutos a 65 V.

Após a transferência as membranas foram coradas com Ponceau S (0.1 g Ponceau em 100 ml Ácido acético 10%), e lavadas com água. O bloqueio foi realizado com TBS 0.1% Tween 20 (TBS 1X: 50 mM Tris-HCl pH = 7.4, 150 mM NaCl)(TBS-T) acrescido de 5% leite (Molico) por uma hora, sob agitação, à temperatura ambiente. As incubações com os anticorpos primários (diluídos na solução de bloqueio) foram realizadas por aproximadamente 12 horas a 4°C. Foram feitas 3 lavagens de 10 minutos cada com TBS-T, sob agitação. Os anticorpos secundários foram incubados por uma hora à temperatura ambiente, sob agitação. As membranas foram novamente lavadas com TBS-T (3 lavagens de 10 minutos cada) e reveladas por 1 minuto com substrato quimioluminescente para peroxidase (*Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrate*, Millipore). A visualização foi realizada no aparelho *ImageQuant 300* (GE Healthcare, EUA).

Os anticorpos utilizados foram: anti-XPV (mouse mAb to DNA polη B-7, SC-17770, Santa Cruz Biotechnology, EUA, diluição 1:100); anti-p53 (mouse mAb to p53, AHO0152, Life Technologies, diluição 1:500); anti-OGG1 (goat pAb OGG1/2 L-19, SC-12075, Santa Cruz Biotechnology, diluição 1:500). Normalizadores anti-β-tubulina (Rabbit mAb to β-tubulin, H-235 SC-9104, Santa Cruz Biotechnology, diluição 1:1000) ou anti-GAPDH (Mouse pAb to GAPDH, 6C5 SC-32233, Santa Cruz Biotechnology,

diluição 1:1000); secundários anti-mouse IgG-, anti-goat IgG e anti-rabbit IgG-HRP (Sigma, diluição 1:5000).

3.11 Marcações para citometria: PI, PI + γ-H2AX, PI + Caspase 3 ativada, PI + BrdU

Para a análise de ciclo celular e da população em apoptose após os tratamentos com agentes genotóxicos, as células foram coletadas com tripsina e centrifugadas por 3 minutos a 500 g; o precipitado celular foi lavado com PBS, as células foram novamente centrifugadas, e os precipitados fixados com etanol 70% e mantidos a -20°C por pelo menos 24 horas. As coletas para análise de ciclo foram realizadas 24 horas após o tratamento, e para a população em apoptose, 48 ou 72 horas após o tratamento. Após a fixação, as células foram centrifugadas, lavadas com PBS e coradas com PI, um intercalante fluorescente de DNA sem preferência por sequência (solução de uso: 1% RNAse A 200 mg/ml, 4% solução PI 500 μg/ml, 0.1% Triton X-100 em H_2O) por 30 minutos a 37°C ou 1 hora a temperatura ambiente, sob agitação. Após esse período as células foram centrifugadas, lavadas com PBS, ressuspendidas em PBS filtrado e passadas no citômetro de fluxo *Guava EasyCyte* (Merck Millipore).

Para a dupla marcação de PI com γ-H2AX (marcador de danos no DNA) ou caspase 3 ativada (marcador de morte celular por apoptose), as células foram coletadas e fixadas com paraformaldeído 1% em PBS por 15 minutos no gelo, antes da fixação com etanol 70%. Após a fixação as células foram centrifugadas, lavadas com PBS-T BSA (0,2% Triton X-100, 1% BSA), centrifugadas novamente e bloqueadas/permeabilizadas por 5 minutos em PBS-T BSA. Após o bloqueio as células foram centrifugadas e os precipitados ressuspendidos em 50 μl de anticorpo primário anti-γ-H2AX (ser-139 mouse mAb, clone JBW301, Upstate/Millipore) ou anti-caspase 3 ativada conjugado com FITC (rabbit 559341 BD Pharmingen, EUA) 1:500 em PBS-T BSA, incubados por 1 hora a temperatura ambiente, sob agitação. Na marcação para γ-H2AX, após a incubação as células foram lavadas duas vezes e incubadas com 50 μl de anticorpo secundário anti-mouse FITC (Sigma), 1:200 em PBS-T BSA por 1 hora a temperatura ambiente, sob agitação. Após a incubação com o anticorpo secundário as células foram novamente lavadas duas vezes com PBS-T BSA, e a marcação com PI realizada com descrito acima.

Para a dupla marcação de PI com BrdU (5-bromo-2'-desoxiuridina, um análogo da timidina utilizado na marcação de células em replicação), as células receberam um pulso de 10 μM de BrdU em meio de cultura completo por 20 minutos antes da coleta e da fixação com etanol 75%, a -20°C por no mínimo 24 horas. No dia seguinte, as células foram centrifugadas e os precipitados celulares permeabilizados com 1 ml de solução de pepsina (Sigma-Aldrich)(14 μM em HCL 1,5% em H_2O) por 20 minutos a 37°C, centrifugados, ressuspensos em 1,5 ml de HCL 2M e incubados por 20 minutos a temperatura ambiente. Após a permeabilização, as células foram lavadas e ressuspendidas em 500 μl de tampão de hibridização (0,5% SFB, 0,5% Tween 20, 20 mM HEPES, em PBS). Após uma nova lavagem as células foram incubadas com anticorpo primário anti-BrdU (mouse mAb, Dako M0744, Dinamarca), 1:100 em tampão de hibridização por 1 hora a temperatura ambiente, lavadas com PBS e incubadas com anticorpo secundário anti-mouse FITC (Sigma), 1:200 em tampão de hibridização por 45 minutos a temperatura ambiente. As células foram novamente lavadas com PBS e a marcação do PI realizada com descrito acima (Quinet et al, 2014).

3.12 *DNA Fiber Assay*

Para a análise da síntese de DNA após danos genotóxicos que causam a parada na forquilha de replicação, as células foram plaqueadas e após aproximadamente 16 horas receberam um pulso de 20 μM de CldU (5-cloro-2'-desoxiuridina, análogo da timidina) em meio completo por 20 minutos e lavadas 2 vezes com PBS antes do tratamento com o agente genotóxico (no caso, UVC). Após a irradiação, as células foram incubadas com 200 μM de Idu (5-iodo-2'-desoxiuridina, outro análogo da timidina) em meio completo por 1 hora, e lavadas 2 vezes com PBS. Após os pulsos as células foram coletadas com tripsina, centrifugadas, ressuspendidas em PBS e contadas. Após a contagem aproximadamente 5000 células foram colocadas na parte superior de uma lâmina, a gota foi ressuspendida em 15 μl de tampão de lise (0.5% SDS, 200 mM Tris-HCl pH 7.4, 50 mM EDTA) e a lâmina inclinada de forma que a gota de células + tampão de lise escorra em uma velocidade constante por aproximadamente 30 segundos, do começo até o fim da lâmina. Após secar por aproximadamente 10 minutos as lâminas foram fixadas em metanol: ácido acético

(3:1) por 5 minutos, secas novamente por 10 minutos e mantidas em etanol 70% a 4°C até o dia seguinte. Após esse período as lâminas foram novamente fixadas com metanol puro por 5 minutos, lavadas 3 vezes com PBS por 5 minutos, incubadas por 1 hora com HCl 2.5 N, lavadas novamente 3 vezes com PBS por 5 minutos, e bloqueadas por 15 minutos com BSA 5% a 37°C.

Após o bloqueio as lâminas foram lavadas com PBS, incubadas com 100 μl de anticorpo primário anti-BrdU (mouse mAb, 555627, BD Biosciences) 1:40 em PBS 0.5% BSA por 1 hora no escuro em câmara úmida, para marcação do IdU. As lâminas foram então lavadas 3 vezes por 5 minutos com PBS 0.05% Tween e uma vez com PBS, incubadas com 100 μl de anticorpo secundário anti-mouse Alexa Fluor 594 (goat anti-mouse IgG, A-11005, Life Technologies) 1:200 em PBS 0.5% BSA por 1 hora no escuro em câmara úmida, e novamente lavadas com PBS 0.05% Tween e PBS. Para a detecção do CldU as lâminas foram incubadas com 100 μl de anticorpo primário anti-BrdU (rat mAb clone BU1/75, AbD Serotec, EUA) 1:40 em PBS 0.5% BSA por 1 hora no escuro em câmara úmida, lavadas com PBS 0.05% Tween e PBS, incubadas com 100 μl de anticorpo secundário anti-rat FITC (goat anti-rat IgG, ab6840, Abcam, Inglaterra) 1:200 em PBS 0.5% BSA por 1 hora no escuro em câmara úmida, e lavadas 3 vezes com PBS 0.05% Tween por 5 minutos e duas vezes com PBS por 5 minutos. No final do protocolo, as lâminas foram montadas com solução de montagem (F6057, Sigma), e mantidas a -20°C até serem fotografadas (Quinet et al, 2014).

A visualização e as fotos foram realizadas em microscópio de fluorescência Carl Zeiss, e a contagem das fibras para determinação da razão CldU:IdU foi realizada com o *software Zeiss LSM Image Browser*; foram contadas no mínimo 75 fibras por lâmina, em 2 experimentos independentes.

3.13 Silenciamento por siRNA

O silenciamento de duas proteínas da via de BER, a glicosilase OGG1 e a polimerase pol β, nas células deficientes em NER, foi realizado através de RNA de interferência (siRNA) com os reagentes *MISSION® esiRNA human* POLB (EHU160321) e OGG1 (EHU095411) esiRNA 1 (Sigma-Aldrich). Para o silenciamento de pol η nos ensaios de indução com as células primárias, foi utilizado o *MISSION® esiRNA human*

POLH (EHU004141) esiRNA1. As células foram plaqueadas em pré-confluência aproximadamente 16 horas antes do silenciamento, realizado com Oligofectamina (Life Technologies) para as células transformadas e Lipofectamina (Life Technologies) para as células primárias, por 5 horas em meio sem soro (ao final adicionou-se meio 20% para a parada da transfecção). No dia seguinte foi realizado um novo silenciamento, e ao final das 5 horas as células foram plaqueadas para os experimentos seguintes, aproximadamente 16 horas antes dos tratamentos genotóxicos. As coletas para extração de proteína/RNA para análise da eficácia do silenciamento foram realizadas no momento do plaqueamento.

3.14 PCR Tempo Real (*Real Time PCR*)

Para a análise da expressão gênica após o silenciamento com siRNA, aproximadamente 500.000 células foram coletadas após o segundo silenciamento, concomitantemente ao plaqueamento. O RNA total foi extraído com o kit *PureLink® RNA Mini Kit* (Life Techonologies), segundo as instruções do fabricante. Após a extração, as amostras foram tratadas com DNase (*RQ1 RNase-Free DNase*, Promega) e a síntese do cDNA (transcriptase reversa) foi realizada com o kit *High Capacity cDNA Reverse Transcription* (Applied Biosystems, EUA) utilizando Oligo(dT), segundo as instruções dos fabricantes. As reações de PCR Tempo Real foram realizadas com o kit *SYBR® Green*, utilizando uma concentração final de 0.8 μM de cada *primer*, 10-20 ng de cDNA e *SYBR Green Master Mix 2X* em um volume final de 12.5 μl. As reações foram realizadas no aparelho *7500 Real Time PCR System* (Applied Biosystems), com a ciclagem padrão (2 minutos a 50°C, 10 minutos a 95°C, 40 ciclos de desnaturação a 95°C por 15 segundos e extensão de 1 minuto a 60°C; ao final da reação foi adicionada a etapa extra de 15 segundos a 95°C, 30 segundos a 60°C e 15 segundos a 95°C, para análise das curvas de dissociação). As reações foram realizadas em triplicatas, com um controle negativo (sem cDNA) para cada par de *primers*. As análises foram realizadas segundo a equação proposta por Pfaffl (PFAFFL, 2001), utilizando o gene *GAPDH* como normalizador. Uma tabela com as sequências dos primers utilizados encontra-se no anexo 2.

3.15 Ensaio de Cometa alcalino (*Single Cell Gel Eletrophoresis*)

O ensaio de Cometa alcalino é um ensaio de boa sensibilidade para detecção de quebras e sítios álcali-lábeis (por exemplo sítios AP), que são convertidos em quebras em pH alcalino (pH > 13). Para a realização deste ensaio, 100.000 células foram plaqueadas em placas de 35 mm de diâmetro, 16 horas antes do tratamento genotóxico (MB+luz). Após o tratamento, foram realizadas coletas nos tempos 0, 2 e 24 horas, para a realização de uma cinética de reparo. Para a coleta, as células foram centrifugadas, ressuspendidas em 20 μl de PBS e 180 μl de agarose *Low-Melting Point* 0.5%. Essas células foram delicadamente plaqueadas em duas lâminas de microscopia previamente recobertas com uma camada de agarose 1.5%, já gelificada, cobertas com lamínulas e mantidas a 4°C por no mínimo 10 minutos, para a polimerização da agarose. Após esse período as lamínulas foram retiradas e as lâminas incubadas por aproximadamente 16 horas a 4°C em solução de lise (2.5 M NaCl, 100 mM EDTA, 10 mM Tris pH 9.5 – ajustado com NaOH; na hora da utilização foram acrescentados 1% Triton X-100 e 10% DMSO). Após a lise, as lâminas foram mantidas por 25 minutos na cuba de eletroforese (BioRad) para a desnaturação do DNA em tampão de eletroforese (2mM EDTA, 300 mM NaOH pH > 13) antes da corrida. A eletroforese foi realizada por 25 minutos a 25 V e 300 mA. Após a eletroforese, as lâminas foram neutralizadas 3 vezes de 5 minutos cada com tampão de neutralização (0.4 M Tris pH 7.5), fixadas por no mínimo 30 minutos com etanol 100% gelado (estoque -20°C). A visualização foi feita com a coloração por Brometo de Etídeo; as lâminas foram cobertas com lamínulas e observadas em microscópio de fluorescência com filtro de excitação verde (515-560 nm)(Berra et al, 2013). A contagem dos cometas foi realizada com o *software Komet™ 6* (Andor Technology, EUA); foram analisados aleatoriamente 100 cometas por lâmina.

3.16 Análises estatísticas

Os resultados foram apresentados em gráficos representando a média com erro padrão de pelo menos três experimentos independentes. A significância estatística foi determinada através da utilização de ensaios 2-way ANOVA e post hoc Tukey, com o *software GraphPad Prism 5.0* (*GraphPad Software*, San Diego, CA, USA). Diferenças foram consideradas estatisticamente significativas com $p \leq 0,05$.

3.17 Análise do perfil de Hipermutação Somática de pacientes XP-V

3.17.1 Pacientes: As amostras utilizadas neste projeto são provenientes de pacientes encaminhados ao Instituto de Cancerologia Gustave Roussy (Institut de Cancérologie Gustave Roussy), situado em Villejuif, na França, com a suspeita de XP-V. Neste estudo estão incluídos 5 novos pacientes XP-V que fazem parte da cohorte publicada recentemente por Opletalova et al (2014), além de 7 controles de idades diferentes. O protocolo de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética do IGR. A metodologia foi realizada com descrito em Faili e colaboradores (2009).

3.17.2 Isolamento de células B de memória: Os linfócitos B foram isolados a partir de 3-10 ml de sangue periférico extraídos dos pacientes e dos controles em tubos com heparina, após a separação por densidade através de centrifugação com gradiente de ficol. Para a separação, as amostras de sangue foram diluídas 2-4 vezes em tampão (PBS pH 7,2 2 mM EDTA) e delicadamente adicionadas a tubos cônicos (15 ml) contendo 5 ml de ficol (Ficoll-Paque^{TM} ρ=1,077 g/ml, GE Healthcare). Os tubos foram centrifugados a 400 g por 30 minutos, em uma centrífuga sem freio. Após a centrifugação e formação do gradiente, a camada de células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) fica na região central do tubo, entre o ficol e o plasma, como mostra o esquema na figura 8. A camada superior foi cuidadosamente retirada para a coleta da camada contendo as PBMCs, que foram transferidas para novos tubos e lavadas duas vezes com tampão PBS/EDTA para retirada das plaquetas e do ficol.

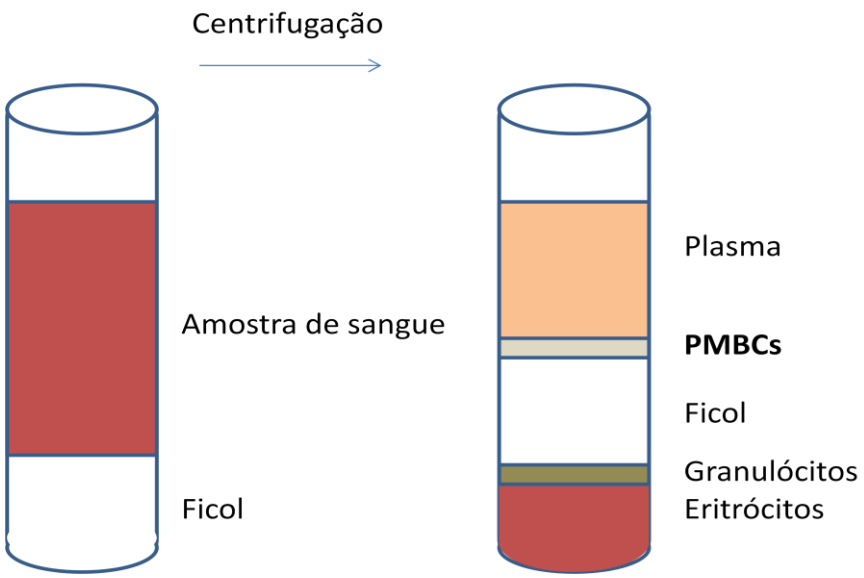


Figura 10: Esquema da separação das PBMCs por gradiente de ficol após centrifugação.

Após a separação das PBMCs e a determinação do número de células, as amostras foram ressuspendidas em tampão (PBS pH 7.2, 0.5% BSA, 2 mM EDTA) e marcadas por 15 minutos a 4°C com esferas magnéticas anti-CD27 (*CD27 Microbeads*, Miltenyi Biotec, Alemanha), para enriquecimento em células B de memória. Após a marcação, as amostras foram aplicadas em colunas magnéticas MACS MS ou LS (Miltenyi Biotec); as células $CD27^+$ retidas na coluna magnética foram eluídas após lavagens e coleta das células não aderidas à coluna ($CD27^-$).

3.17.3 PCR, clonagem e sequenciamento: Após a separação das células B de memória, o DNA foi extraído em PBS/Proteinase K (1 hora a 56°C sob agitação e 10 minutos a 95°C para inativação da proteinase K). Para a determinação do padrão de mutações da região variável dos genes das imunoglobulinas, um set de 6 pares de *primers* foi utilizado para amplificar diversas regiões intrônicas (FR3-JH4-5) dos genes V_H (as sequências encontram-se no anexo 2), em proporções correspondentes à encontradas nas populações humanas. A reação de PCR foi realizada com uma polimerase de alta fidelidade para evitar a inclusão de mutações causadas pela enzima durante os ciclos de amplificação na análise (*Phusion*, Qiagen, Holanda). A reação foi realizada com 5000-15000 células (ciclagem: 98°C por 2 minutos, 40 ciclos de desnaturação a 98°C por 10 segundos, *annealing* de 60°C por 20 segundos e extensão de 20 segundos a 72°C, e extensão final de 10 minutos a 72°C). Foram realizadas 4-5 reações de PCR

para cada amostra, que foram aplicadas em gel de agarose 1,5% para purificação da banda correspondente ao amplicon desejado (450 bp) com o kit *NucleoSpin® Gel and PCR Clean-Up* (Macherey-Nagel, Alemanha), segundo as instruções do fabricante. As sequências amplificadas e purificadas foram clonadas com o kit *TOPO® TA Cloning® Kit with PCR®4 Blunt TOPO®* (Life Technologies), e transformadas por choque térmico em bactérias *E. coli* quimiocompetentes (*One Shot® TOP10 Chemically Competent E. coli*, Life Technologies). As bactérias contendo o inserto (determinadas por PCR) foram enviadas para sequenciamento pela empresa GATC Biotech (Konstanz, Alemanha), em placas de 96 poços contendo meio LB ágar acrescido do antibiótico de seleção (kanamicina).

3.17.4 Análise das mutações: As mutações foram identificadas utilizando as sequências alinhadas com uma sequência consenso de 450 bp com o programa *Codon Code Aligner* (disponível para *download* público em http://www.codoncode.com/aligner/), e a análise comparativa das sequências para determinação do conteúdo de mutações em AT:CG foi realizada com o programa *SHM Tool* (http://scb.aecom.yu.edu/cgi-bin/p1). Foram analisadas no mínimo 200 mutações por paciente/controle.

4. RESULTADOS

4.1 Resposta das células com diferentes mutações em *XPD/ERCC2* ao estresse oxidativo

4.1.1 Sensibilidade das células XP-D, XP-D/CS e TTD/XPD ao estresse oxidativo

Para estudar o comportamento das células com diferentes mutações no gene *XPD* em resposta ao estresse oxidativo induzido pelo tratamento com MB fotoativado, foram realizados diferentes experimentos capazes de acessar a viabilidade e/ou sobrevivência das células frente ao estresse oxidativo: XTT e sobrevivência clonogênica.

Os resultados indicam que as células com mutações no gene *XPD* apresentam uma maior sensibilidade ao estresse oxidativo induzido pelo tratamento com MB e luz visível, quando comparadas com os fibroblastos normais (MRC5), como mostra a figura 11. Os dados obtidos a partir de ambas as técnicas indicam que a linhagem mais sensível ao tratamento oxidante é a TTD. Como já descrito, o MB não apresenta toxicidade no escuro, indicando que a morte das células não se deve à presença do composto nas células, mas sim ao estresse oxidativo gerado pela sua fotoativação.

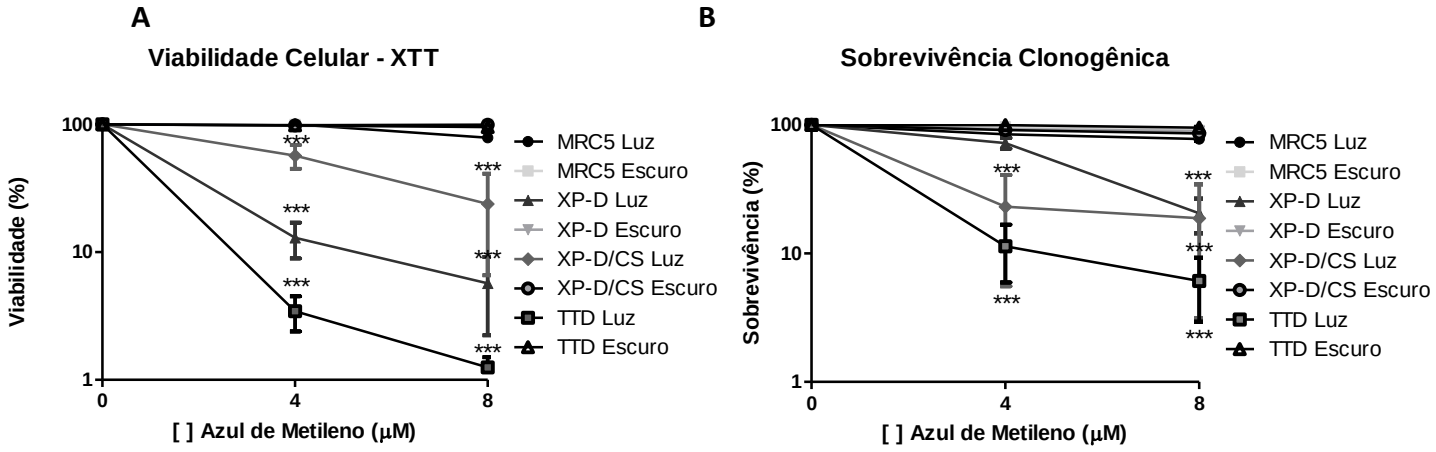


Figura 11: Sensibilidade de células com mutações em *XPD* após tratamento com Azul de Metileno fotoativado, determinado por XTT (A) e sobrevivência clonogênica (B). Os gráficos mostram a média com erro padrão de 3 experimentos independentes, realizados em triplicatas. MRC5: fibroblastos normais. XP-D: XP6BE-SV. XP-D/CS: XPCS2-SV. TTD/XPD: TTD2VI. ***: $p < 0.001$ 2-way ANOVA com Tukey´s Multiple Comparison Test.

Para nos certificarmos que a sensibilidade das células mutadas em *XPD* determinada pelos ensaios de viabilidade celular e sobrevivência clonogênica não era um artefato derivado da transformação dessas linhagens por SV40, o mesmo tratamento com MB foi realizado em linhagens primárias dos fibroblastos originais, para ensaios de viabilidade celular (XTT). Como mostra a figura 12, as células primárias deficientes em *XPD* também apresentam uma diminuição na viabilidade celular frente ao tratamento com MB + luz, mostrando que esse fenótipo não se deve simplesmente à transformação. Entretanto, a sensibilidade das células primárias é menor que a das transformadas; é possível que a presença dos mecanismos de *checkpoint* nas células primárias (ligados principalmente à parada em fase G1 acionada pela proteína p53), inexistentes nas células transformadas por SV40 ajude as células a resistir ao tratamento.

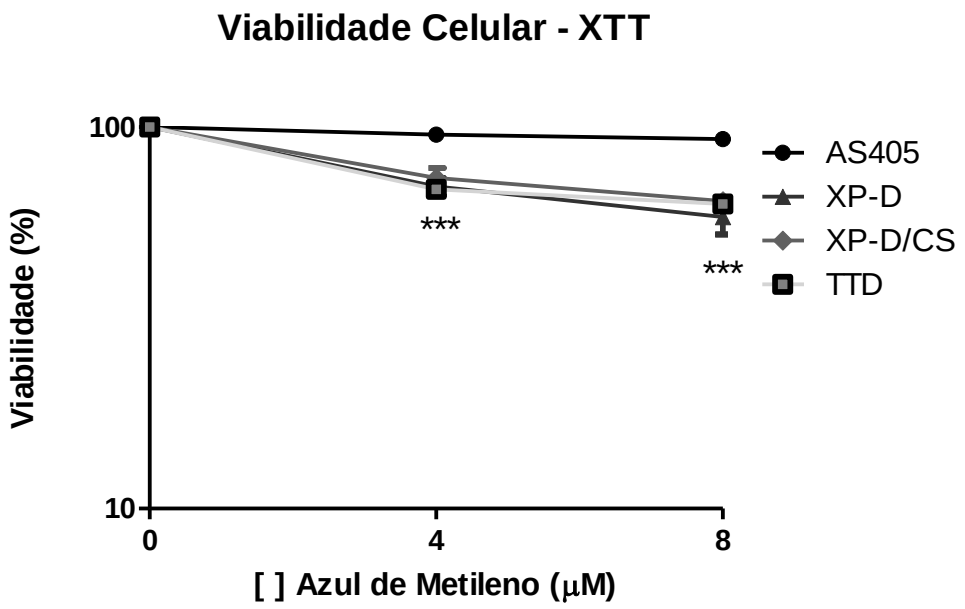


Figura 12: Sensibilidade das células primárias com mutações em *XPD* após tratamento com Azul de Metileno fotoativado, através de ensaios de XTT. O gráfico mostra a média com erro padrão de 3 experimentos independentes, realizados em triplicatas. AS405: fibroblastos normais. ***: $p < 0.001$ 2-way ANOVA com Tukey´s Multiple Comparison Test.

Para o estudo da sensibilidade das células XP-D ao tratamento com outro agente oxidante, ensaios de viabilidade celular foram realizados após o tratamento com bromato de potássio ($KBrO_3$), um agente que é também capaz de gerar bases

oxidadas como a 8-oxodG, porém através de mecanismos diferentes do MB fotoativado. Como mostra a figura 13, o tratamento com $KBrO_3$ também leva a uma redução da viabilidade celular, maior em células XP-D em relação às células controle, semelhante ao que ocorre após o tratamento com MB + luz, mostrando que esse fenótipo não é exclusivo ao tratamento com MB fotoativado, mas provavelmente uma resposta comum a agentes oxidantes em geral. Mais uma vez as células provenientes do paciente TTD apresentam uma sensibilidade maior ao tratamento.

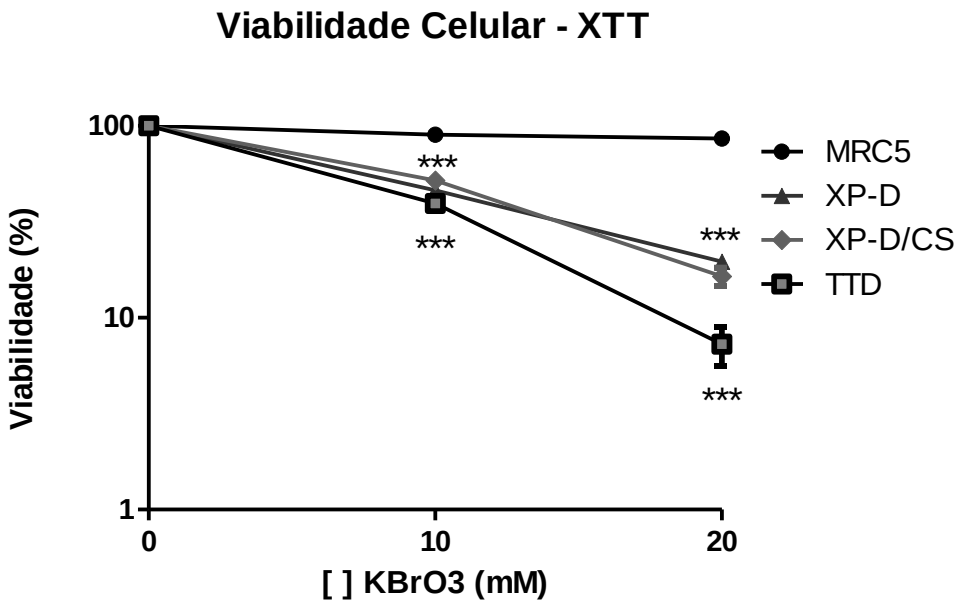


Figura 13: Sensibilidade das células com mutações em *XPD* ao tratamento com bromato de potássio ($KBrO_3$), através de ensaios de XTT. O gráfico mostra a média com erro padrão de 3 experimentos independentes, realizados em triplicatas. ***: $p < 0.001$ 2-way ANOVA com Tukey´s Multiple Comparison Test.

4.1.2 Complementação das deficiências em reparo das células mutadas com o cDNA do gene *XPD/ERCC2*

Ensaios de complementação foram realizados para determinar se a redução da viabilidade observada nas células com diferentes mutações em *XPD* frente ao tratamento com MB + luz, em comparação aos fibroblastos normais, assim como as diferenças de sensibilidade entre as diferentes linhagens mutadas, eram devidas à presença das diferentes proteínas mutadas ou simplesmente às diferenças no *background* genético dos diferentes pacientes. As células complementadas através da transfecção de plasmídeos contendo a sequência gênica do *XPD* foram tratadas com

MB + luz 48 horas após a transfecção; como controle as células também foram testadas para a sensibilidade à irradiação com luz UVC.

As figuras 14A e B mostram que a transfecção de plasmídeos de expressão com o gene *XPD/ERCC2* complementam a deficiência das 3 linhagens deficientes nesse gene frente à UVC, mostrando que as diferenças observadas se devem de fato às mutações nesse gene, que é essencial no reparo dos danos causados nessas células tanto pelo estresse oxidativo quanto pela luz UVC (Figura 14B). É interessante observar que as células de fenótipo TTD com mutações em *XPD* (TTD/XPD) são as menos sensíveis ao tratamento com UVC, porém são as mais sensíveis ao estresse oxidativo causado tanto pelo tratamento com MB + luz quanto com $KBrO_3$. Quanto à sensibilidade à MB fotoativado também verificamos complementação, com redução da sensibilidade (Figura 14A).

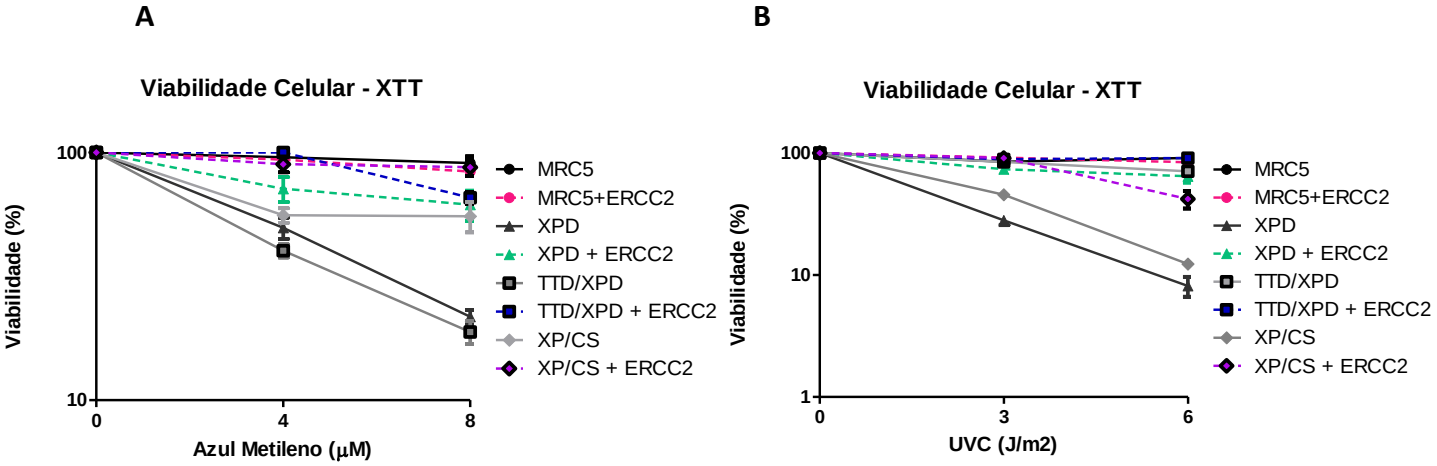


Figura 14: Complementação da deficiência em reparo de danos genotóxicos causados por Azul de Metileno fotoativado (A) e luz UVC (B) em células com diferentes mutações em *XPD* pelo cDNA do gene *XPD/ERCC2*. O gráfico mostra a média com erro padrão de 3 experimentos independentes, realizados em triplicatas.

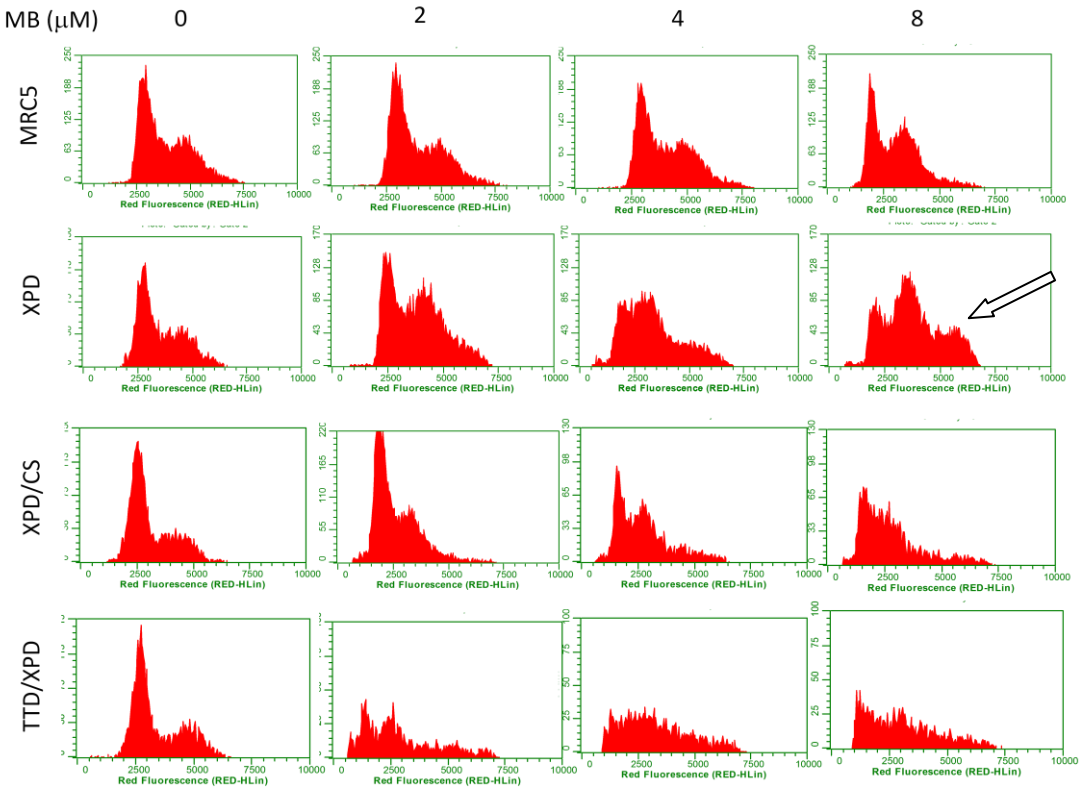
4.1.3 Alterações no ciclo celular após estresse oxidativo

A marcação do conteúdo de DNA com PI foi utilizado para a análise do ciclo celular das células mutadas em *XPD* frente ao tratamento com agentes oxidantes. Essa marcação permite a análise do ciclo celular através da incorporação do PI no DNA das células: as células em fase G1 apresentam uma quantidade de PI incorporada

correspondente ao conteúdo 2n de DNA; as células em fase G2/M, que já duplicaram seu genoma mas ainda não passaram pela citocinese, apresentam quantidade de PI correspondente a 4n (o dobro da fase G1), e as células em fase S apresentam incorporação intermediária de PI. A figura 15A mostra o perfil do ciclo celular das células 48 horas após o tratamento com MB fotoativado; na figura 15B encontram-se as quantificações das frequências de populações em fases G1, S e G2/M. A análise das populações em Sub-G1 será apresentada posteriormente.

Pode-se observar que as células com mutações em *XPD* apresentam um aumento da proporção de células em G2/M após tratamento com MB fotoativado, indicativo de uma deficiência dessas células no reparo dos danos causados por estresse oxidativo levando ao bloqueio no ciclo celular, provavelmente devido à permanência de lesões não reparadas no genoma, mesmo após 48 horas do tratamento. Esse bloqueio não ocorre nos fibroblastos normais. É interessante o aumento da população poliplóide após o tratamento, principalmente nas células XP-D (indicado com uma seta na figura). As células TTD/XPD apresentam as maiores alterações no ciclo, condizente com a maior sensibilidade apresentada por essas células em resposta ao tratamento oxidante.

A



B

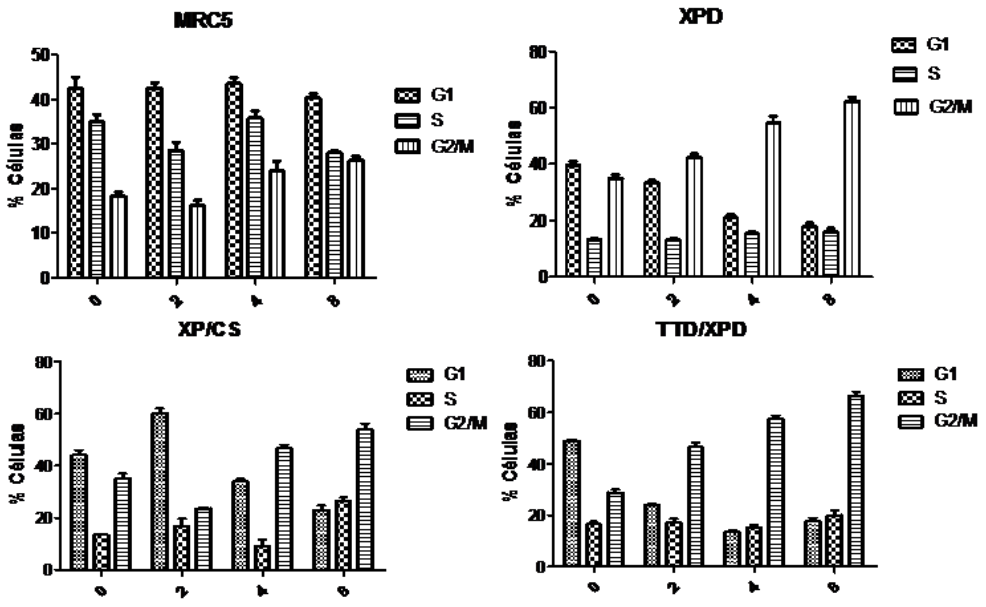


Figura 15: Células com mutações em *XPD* apresentam um bloqueio em G2/M 48 horas após tratamento com Azul de Metileno fotoativado. A: Análise do ciclo a partir da incorporação de PI. O eixo x corresponde à quantidade de DNA e o eixo y ao número de células. O pico a 2500 no eixo x (fluorescência do vermelho, PI) corresponde às células em G1, o pico a 5000 às células em G2, e as fluorescências intermediárias à população em S. B: Os gráficos representam as médias de 3 experimentos realizados em triplicatas.

Foram realizados ensaios semelhantes para estudo do ciclo celular nas células primárias com mutações em *XPD*, e verificou-se que, assim como ocorre com as células transformadas, as células primárias também apresentam alterações no ciclo celular diferentes dos fibroblastos normais após estresse oxidativo. A parada no ciclo, semelhante ao que ocorre com as células transformadas, ocorre principalmente em G2, de forma muito mais pronunciada do que nos fibroblastos normais. Além disso, o tratamento com MB + luz causa danos que as células não são capazes de reparar e levam a alterações no ciclo que se mantêm mesmo após 48 horas do tratamento, enquanto após esse período os fibroblastos normais já foram capazes de recuperar completamente o perfil do ciclo celular, como mostra a figura 16.

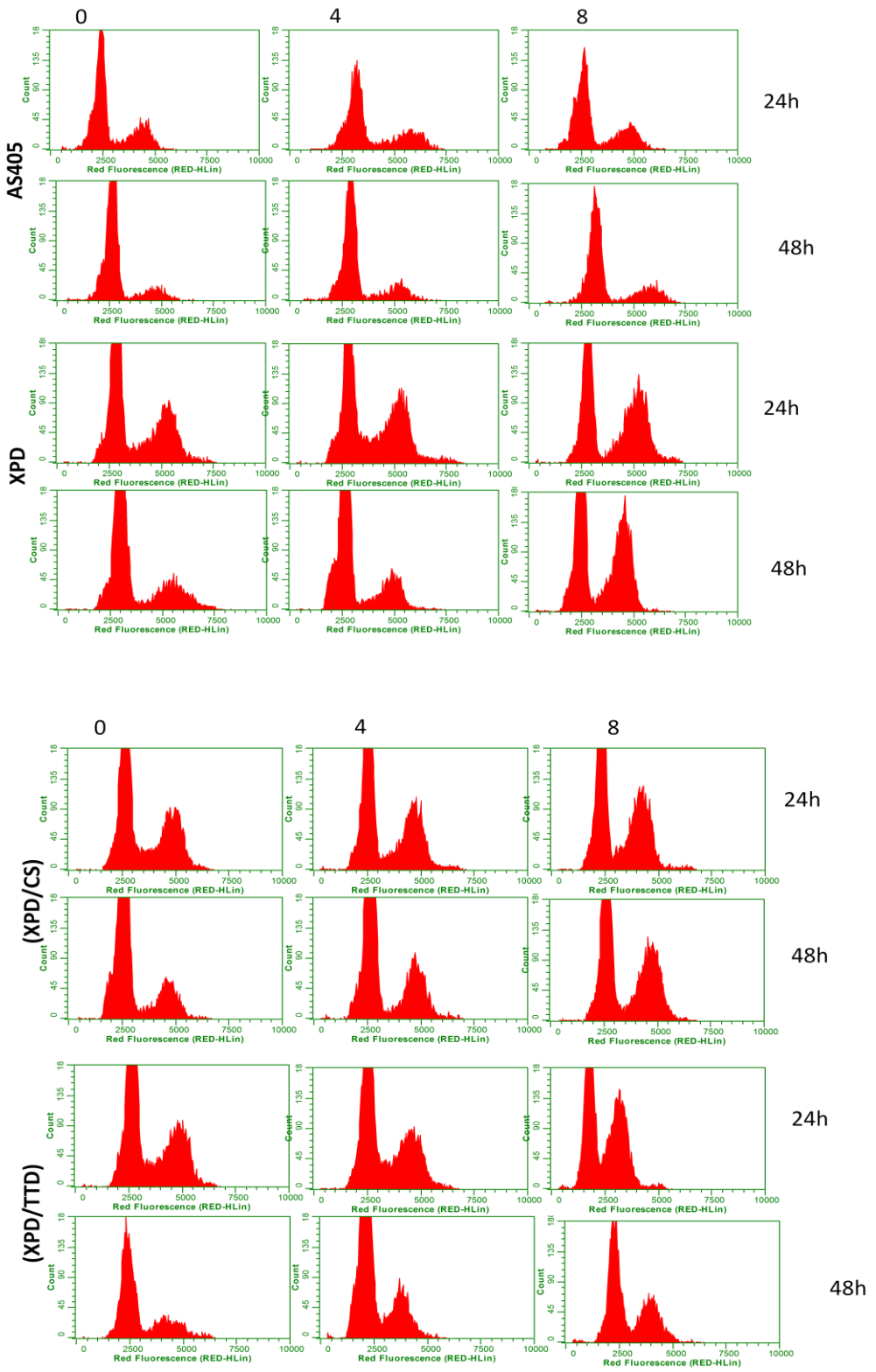
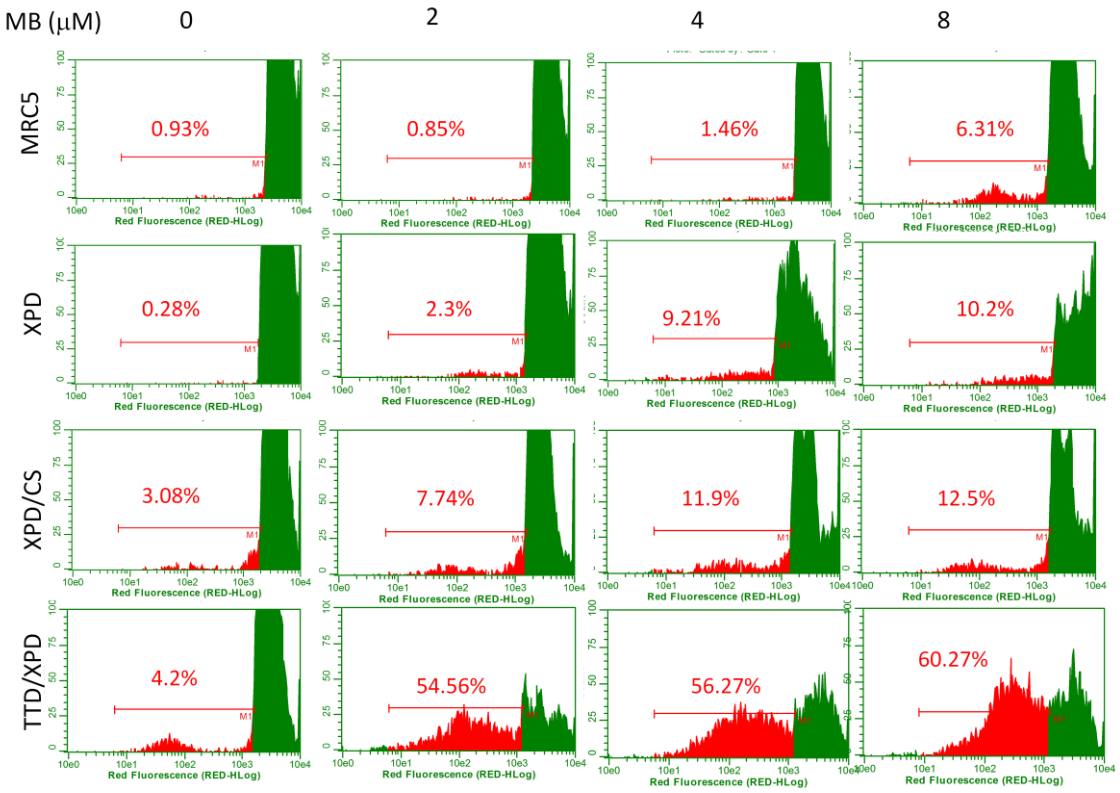


Figura 16: Células primárias com diferentes mutações em *XPD* apresentam bloqueio em G2/M 48 horas após tratamento com Azul de Metileno fotoativado. O gráfico mostra figuras representativas de 3 experimentos independentes, realizados em triplicatas.

4.1.4 Análise dos mecanismos de morte em resposta a danos no DNA

A marcação do conteúdo de DNA com PI também serve para o estudo das células em apoptose, que corresponde às populações com quantidade de DNA menor que o da célula em fase G1 (Sub-G1), o que sugere a fragmentação do DNA que ocorre durante o processo de apoptose. A figura 17 mostra um grande aumento da população em Sub-G1 nas células mutadas em *XPD* 72 horas após o tratamento com MB + luz, o que concorda com os resultados anteriores que mostraram a grande sensibilidade dessas células a esse tratamento.

A



B

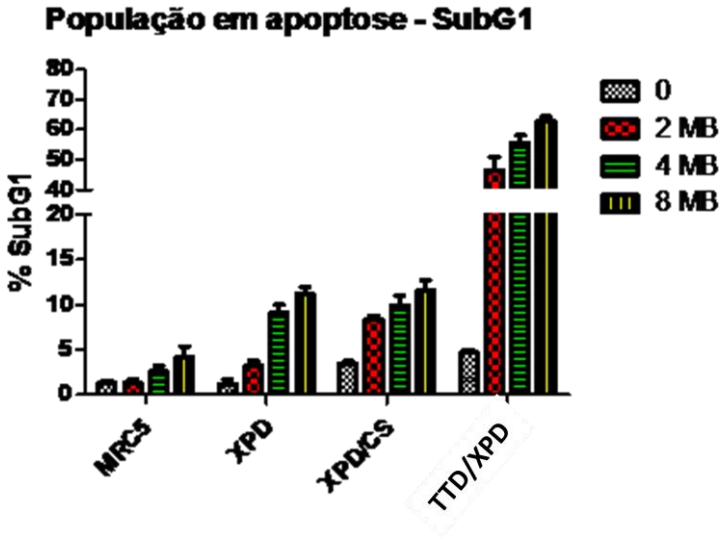


Figura 17: Aumento da população em apoptose (Sub-G1) em resposta ao tratamento com MB + luz nas células com mutações em *XPD*. A: Histogramas representativos das células expostas a concentrações crescentes de Azul de Metileno fotoativado. M1 representa a população em apoptose (Sub-G1). B: O gráfico mostra a média com erro padrão de 3 experimentos independentes, realizados em triplicatas.

O aumento da população apoptótica também foi observado após o tratamento com $KBrO_3$, como mostra a figura 18, novamente mostrando que a proteína XPD é importante para a sobrevivência celular frente ao estresse oxidativo gerado por outros tratamentos oxidantes. É interessante notar que as células TTD apresentam a maior sensibilidade frente a ambos os tratamentos oxidantes.

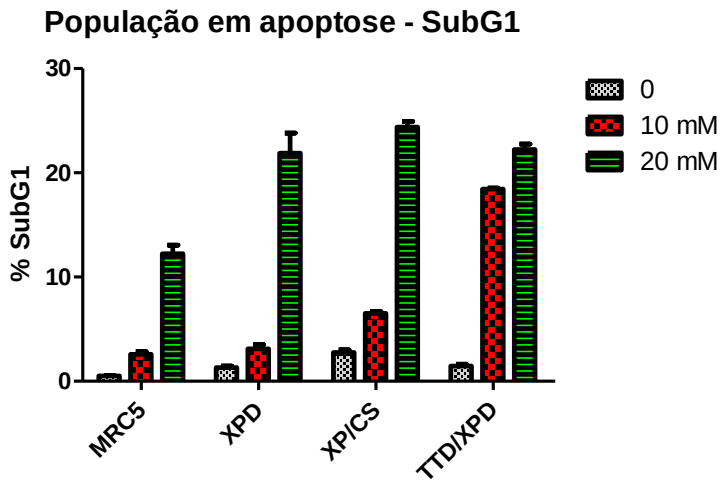


Figura 18: Aumento da população em apoptose (Sub-G1) em resposta ao tratamento com concentrações crescentes de $KBrO_3$ nas células com mutações em *XPD*. O gráfico

mostra a média com erro padrão de 3 experimentos independentes, realizados em triplicatas.

Uma outra forma de analisar a indução de morte por apoptose é a marcação para caspase 3 ativada, através do uso de anticorpo fluorescente, em citometria. A caspase 3, juntamente com as caspase 6 e 7, é uma caspase efetora, cuja ativação por caspases iniciadoras leva à uma série irreversível de reações na célula, como a clivagem de diversos alvos indispensáveis para o metabolismo da célula, por exemplo as proteínas do citoesqueleto e o material genético, levando à morte celular. A figura 19 mostra a marcação por citometria de caspase 3 ativada dos fibroblastos normais e com mutações em *XPD*, 72 horas após o tratamento com concentrações crescentes de MB fotoativado; pode-se observar que a maior parte das células deficientes apresenta ativação de caspase 3 após o tratamento, o que acontece apenas em pequena proporção nos fibroblastos normais. Esses resultados vão de acordo com os obtidos a partir da detecção da população em Sub-G1, indicando que de fato as células deficientes em XPD são extremamente sensíveis ao estresse oxidativo, e que esse tratamento leva à morte destas células por apoptose.

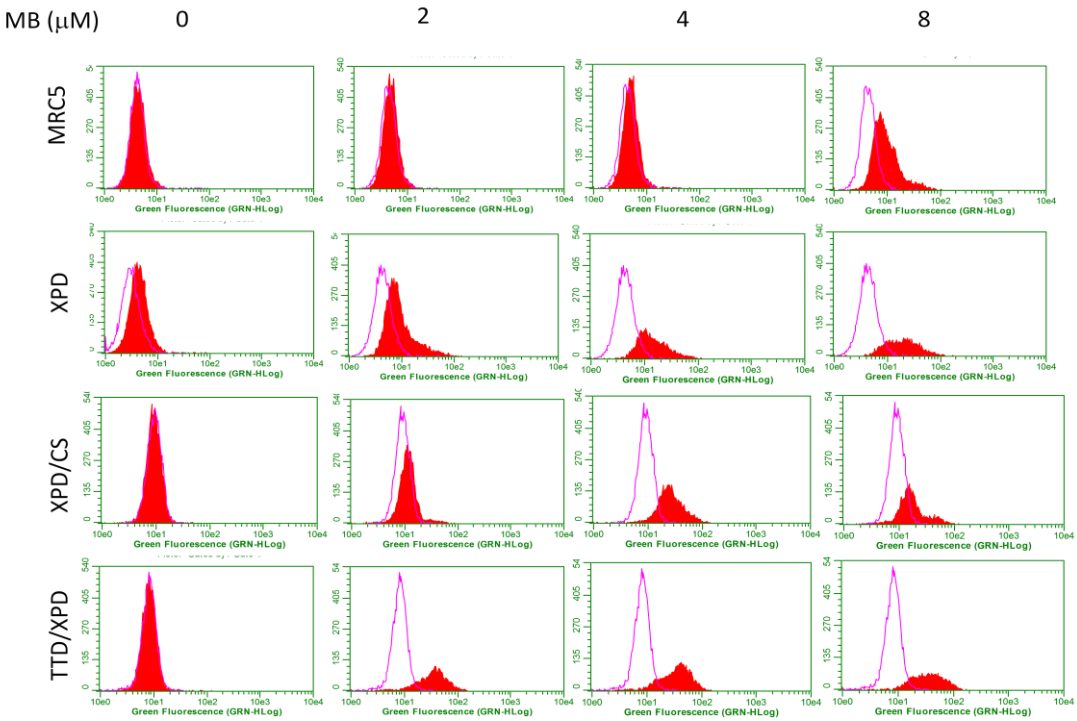
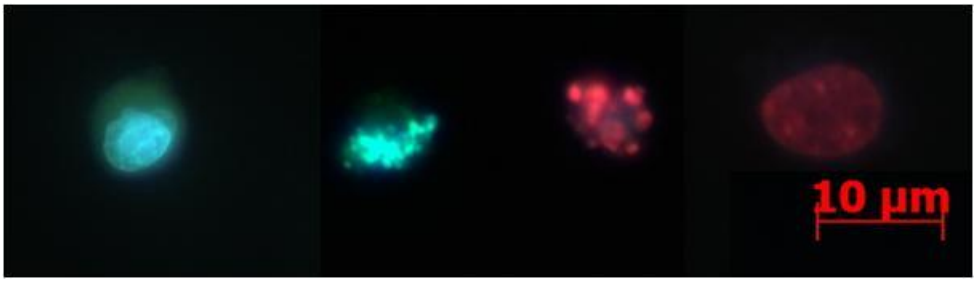


Figura 19: Ativação de caspase 3 após tratamento com concentrações crescentes de MB fotoativado nas células com mutações em *XPD*. No eixo x encontra-se a marcação da caspase 3 ativada, indicada pela fluorescência do verde (FITC); no eixo y está o número de células. A população em vermelho representa as células após cada

tratamento, em comparação com o controle, representado em cada gráfico pela linha roxa. São mostradas figuras representativas de 3 experimentos independentes, realizados em triplicatas.

A marcação simultânea com os 3 corantes fluorescentes DAF, PI e Hoechst permite a determinação do tipo de morte celular de acordo com a coloração e morfologia das células visualizadas no microscópio de fluorescência, através da capacidade diferencial dos dois corantes nucleares para a entrada das células: o Hoechst é um corante supravital, que entra livremente das células vivas (ou em apoptose inicial), enquanto o PI só penetra nas células cuja membrana já perdeu a integridade (células em apoptose tardia ou necróticas). A figura 20 mostra exemplos dessas marcações (A) assim como os resultados desses experimentos (B); pode-se observar uma grande quantidade de células que apresentam morte por necrose nas células XP-D/CS e TTD/XPD quando comparadas com as células XP-D; esses resultados podem indicar que o mecanismo de resposta das células XP-D/CS e TTD/XPD ao estresse oxidativo é diferente do das células XP-D, que por sua vez é mais semelhante aos fibroblastos normais, mostrando um predomínio de morte por apoptose, enquanto as células XP-D/CS e TTD/XPD apresentam primariamente uma morte semelhante à necrose, porém posteriormente parece haver uma coexistência de mais de um mecanismo, uma vez que há sinais morfológicos de necrose, e ao mesmo tempo ativação de caspase 3 e aumento da população de células em Sub-G1, que correspondem a sinais associados à apoptose (Figura 19).

A



Normal **Apoptose inicial e tardia** **Necrose**

B

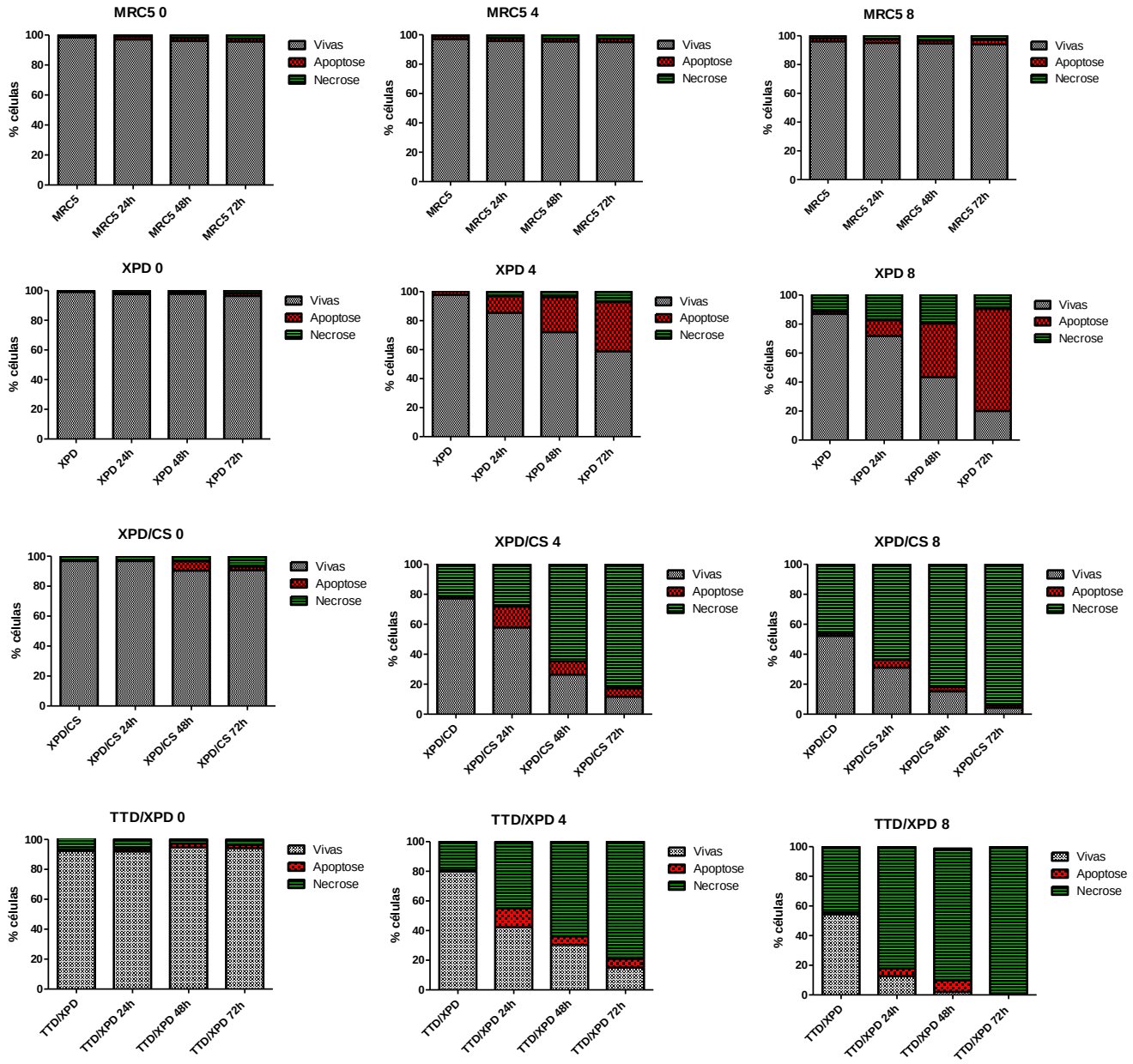


Figura 20: Análise do tipo de morte celular em resposta ao tratamento com MB fotoativado através de corantes fluorescentes (DAF, PI e Hoechst). A: exemplos das características morfológicas e das colorações de células normais, em apoptose inicial, em apoptose tardia e em necrose. B: Proporção das populações celulares após tratamento com MB fotoativado.

4.1.5 Análise da sinalização em resposta a danos no DNA

A fosforilação da histona H2AX na serina 139 (γ-H2AX) pelas quinases da família PI3K (ATM, ATR ou DNA-PKcs) foi durante muitos anos utilizada como marcador da

presença de DSBs no DNA, como observado após o tratamento com IR, por exemplo. Entretanto, atualmente aceita-se que essa fosforilação ocorra em resposta à presença de diversos tipos de danos no DNA, além das DSBs; essa sinalização é importante para o recrutamento de proteínas ligadas à parada no ciclo celular, ao reparo de DNA e à apoptose. Ensaios para detecção de γ-H2AX após o tratamento com MB + luz mostram que, nas células normais, o pico da marcação ocorre 4 horas após o tratamento, e que 24 horas já não há mais uma grande quantidade de células positivas para a marcação. Entretanto, nas células deficientes em *XPD*, a quantidade de células positivas continua alta mesmo 48 horas após o tratamento, indicando que ainda há a presença de danos no genoma das células deficientes (a diminuição da marcação de γ-H2AX nas células XP-D/TTD pode estar relacionada à população de células que já estão entrando em apoptose/necrose 48 horas após o tratamento)(figura 21).

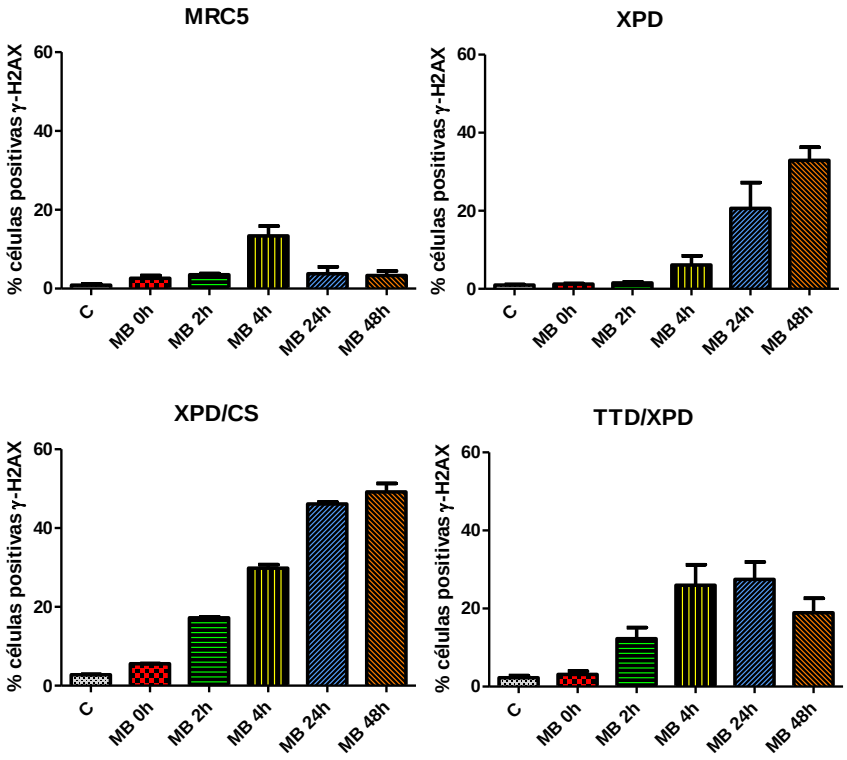


Figura 21: Presença de danos no DNA (γ-H2AX) após tratamento com MB fotoativado nas células deficientes em XPD. O gráfico mostra a média com erro padrão de 3 experimentos independentes, realizados em triplicatas.

4.1.6 Resposta das células deficientes em NER ao estresse oxidativo após modulação da via de BER

PARP1 é uma proteína nuclear que tem afinidade por regiões de SSBs e DSBs, e é ativada na presença de diversos tipos de danos; de fato, sua ativação é necessária para o reparo de SSBs por BER através do recrutamento da proteína XRCC1, além de participar da via de HR através do recrutamento de ATR e do complexo MRE1 na presença de DSBs. Assim, para analisar possíveis interações das vias de BER e NER no reparo das lesões causadas por estresse oxidativo nas células deficientes em NER, foi utilizado o inibidor de PARP 3-Aminobenzamida (3-Ab).

Como mostra a figura 22, a inibição de PARP foi capaz de causar um aumento da sensibilidade ao tratamento principalmente nas células MRC5, apesar da sensibilidade aumentar moderadamente nas outras linhagens. A linhagem normal MRC5, que apresenta sensibilidade ao tratamento com MB+luz apenas na presença desse inibidor, pode indicar que, nas células proficientes em NER, PARP participa da via de reparo de lesões que depende de NER. Na ausência de XPD (e provavelmente de NER), a resistência ao tratamento parece ser independente da ação de PARP.

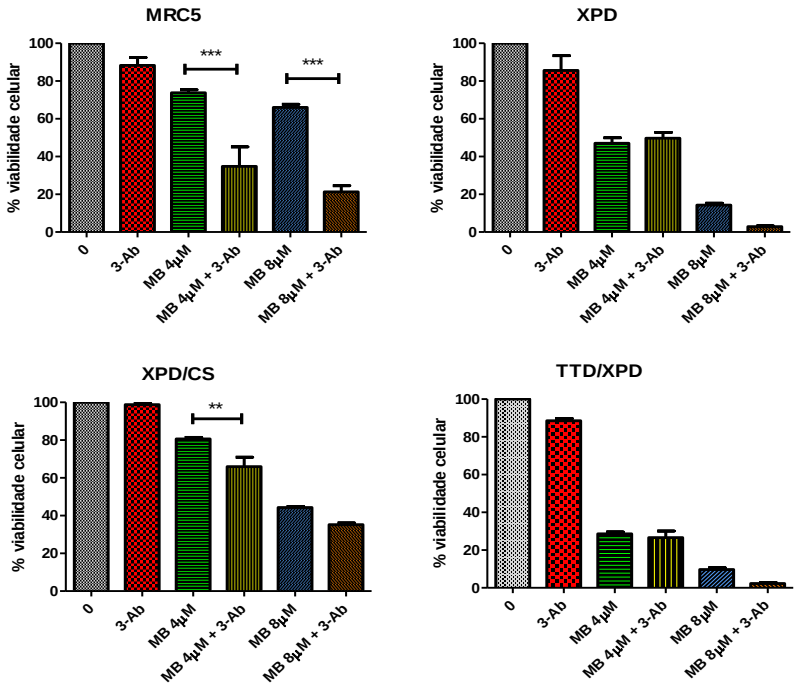
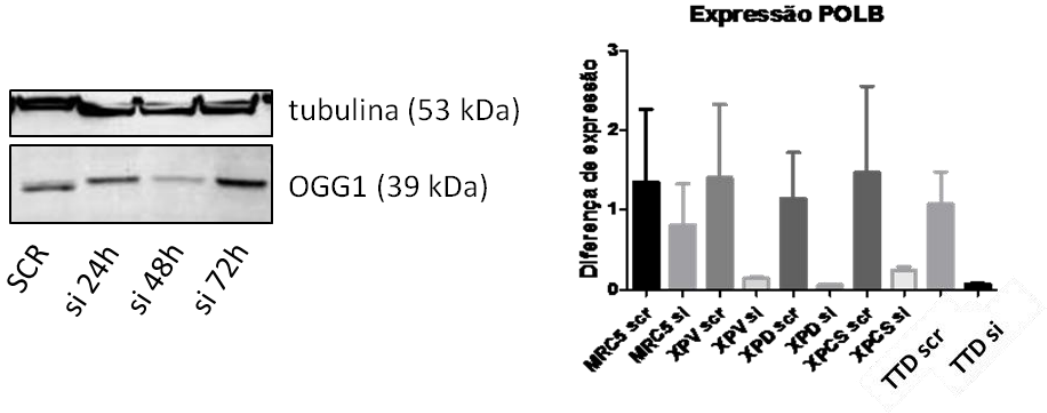


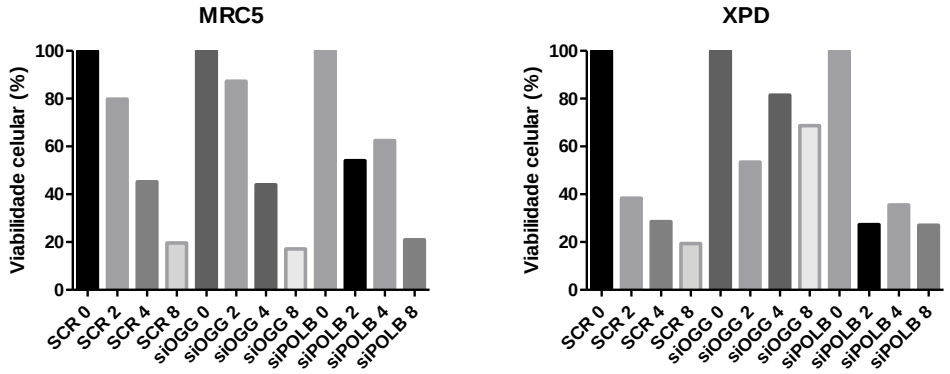
Figura 22: Ação do inibidor de PARP (3-Ab) na viabilidade de células tratadas com MB fotoativado. O ensaio de XTT foi realizado 48 horas após o tratamento. O gráfico mostra a média com erro padrão de 3 experimentos independentes, realizados em triplicatas. MRC5: fibroblastos normais. **: $p < 0.01$ e ***: $p < 0.001$ 2-way ANOVA com Tukey´s Multiple Comparison Test.

Outra forma de modular a via de BER é através do uso de RNA de interferência (siRNA) para diminuir a expressão de genes dessa via, no caso a glicosilase OGG1 e a DNA polimerase pol β. A figura 23A mostra a eficiência do silenciamento gênico de POLB através de PCR em Tempo Real, assim como o efeito do siOGG1 na expressão proteica através de WB; pode-se perceber que a expressão da proteína OGG1 é diminuída 48 horas após o silenciamento, e é revertida aos níveis normais 72 horas após o tratamento com o siRNA. Apesar de preliminares, os dados apresentados na figura 23B mostram que não houve grande diferença na viabilidade das células após o tratamento com MB fotoativado, em células silenciadas para esses genes, com exceção das células XP-D, que apresentaram viabilidade aumentada na presença do siOGG1, em relação ao siSCR (controle); esses resultados podem indicar que as células XP-D apresentam uma deficiência no reparo de intermediários da via de BER gerados pela ação de glicosilases (no caso o sítio AP), o que seria amenizado na ausência de OGG1.

A



B



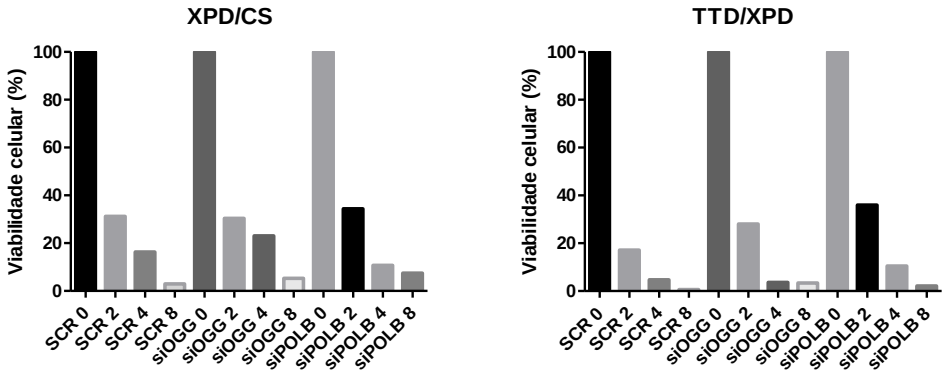


Figura 23: Efeito do silenciamento da expressão de OGG1 e pol β na sobrevivência das células deficientes em XPD após tratamento com concentrações crescentes (0, 2, 4 e 8 μM) de MB fotoativado. A: Diminuição da expressão do mRNA de *POLB* e da expressão proteica de OGG1 após tratamento com siRNA. B: A diminuição da expressão das proteínas OGG1 e pol β não altera a vaibilidade celular nas células deficientes em XPD após tratamento com MB fotoativado. O XTT foi realizado 48 horas após o segundo silenciamento. O gráfico em A mostra a média com erro padrão de 3 experimentos independentes, em triplicatas.

4.1.7 Diferenças na capacidade de reparo de danos genotóxicos em DNA plasmidial entre as células com mutações em *XPD*: Ensaios de *Host Cell Reactivation* (HCR)

Para estudar o papel dos danos ao DNA na sensibilidade das células mutadas em *XPD* ao tratamento com MB + luz foram realizados ensaios de HCR. Esse ensaio permite a análise do papel do reparo nuclear aos danos ao DNA sem a interferência dos danos ao DNA mitocondrial e à membrana celular, que ocorrem durante tratamentos oxidantes, e que podem interferir nos resultados de viabilidade realizados quando o tratamento é realizado nas células inteiras. Além da capacidade de reparo, esse ensaio permite também verificar a capacidade de reiniciar a transcrição após o dano genotóxico.

A figura 24 mostra os resultados desses experimentos, e pode-se observar uma diminuição da capacidade de reparo do DNA plasmidial em todas as células mutadas em *XPD* quando comparada à capacidade de reparo dos fibroblastos normais. Esses resultados sugerem que de fato a presença de danos não reparados no DNA nuclear dessas células é responsável em grande parte pela sensibilidade dessas células ao estresse oxidativo. Além disso, as células XP-D/CS e TTD/XPD apresentam menor

capacidade de reparo que as XP-D. Esses resultados podem indicar uma correlação entre a deficiência de reparo de DNA e/ou retomada da síntese de RNA e a severidade do fenótipo dos pacientes, uma vez que os pacientes XP-D/CS e TTD/XPD apresentam os fenótipos mais severos (se comparados aos pacientes XP-D), assim como as menores taxas de reparo/retomada da transcrição após danos gerados por estresse oxidativo ao DNA plasmidial.

Como controle foram realizados HCRs com plasmídeos tratados com UVC (figura 24B), que mostram resultados concordantes com os ensaios de complementação. Nesse caso é curioso verificar que células XP-D e XP-D/CS, cujos pacientes apresentam fenótipos com fotossensibilidade, apresentam menor capacidade de reparo de lesões causadas pela luz UV.

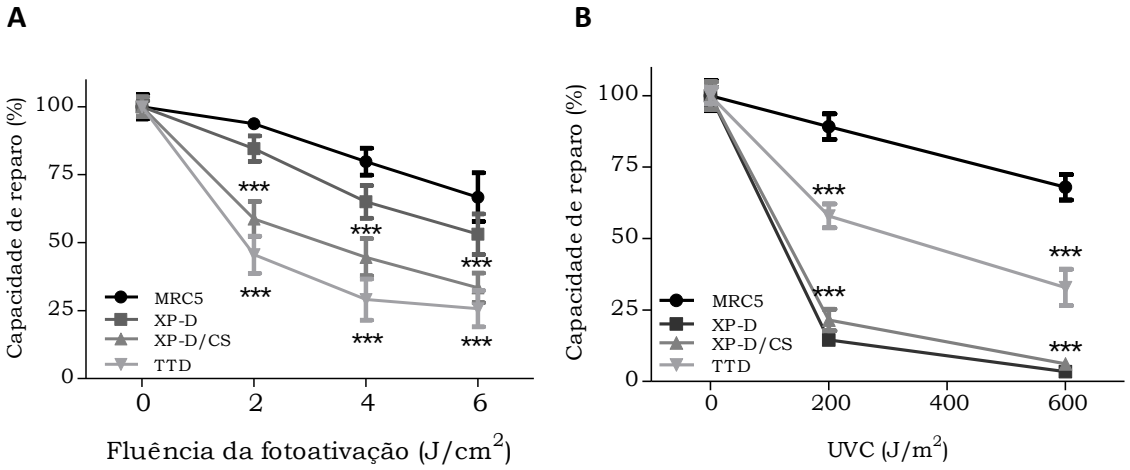


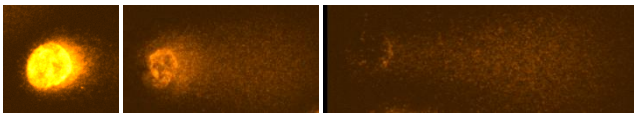
Figura 24: Diminuição da capacidade de reparo de danos genotóxicos causados em DNA plasmidial tratado com A: MB fotoativado e B: luz UVC nas células com diferentes mutações em *XPD*. O HCR foi realizado 48 horas após a transfecção. O gráfico mostra a média com erro padrão de 3 experimentos independentes, realizados em triplicatas. MRC5: fibroblastos normais. ***: $p < 0.001$ 1-way ANOVA com Tukey´s Multiple Comparison Test.

4.1.8 Diferenças na capacidade de reparo de quebras geradas pelo tratamento com MB fotoativado

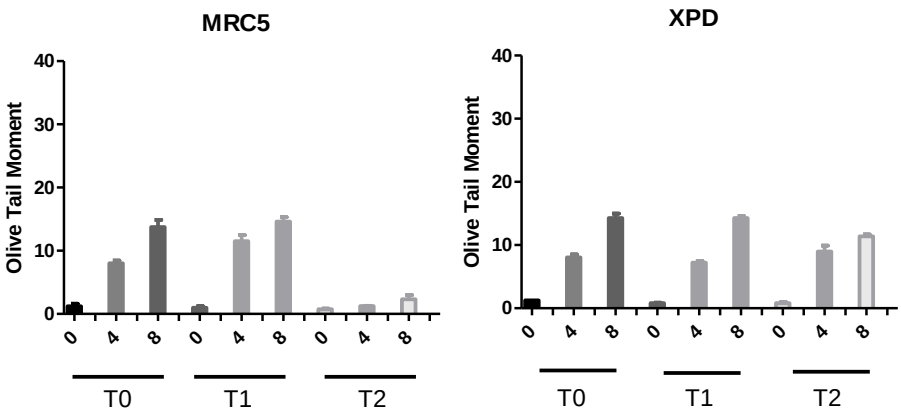
Para analisar a capacidade de reparo das células com diferentes mutações em XPD no reparo de quebras causadas pelo tratamento com MB fotoativado, foram

realizados ensaios de Cometa alcalino, que detecta simples quebras assim como sítios álcali-lábeis (tais como sítios AP) formados durante o tratamento pelo pH alcalino durante a eletroforese. Os gráficos da figura 25 mostram que células selvagens e células XP-D/CS, apesar de apresentarem mais quebras desde o início da cinética (no caso das XP-D/CS), foram capazes de reparar as quebras causadas pelo tratamento com diferentes concentrações de MB fotoativado 24 horas após o tratamento, de maneira semelhante à que ocorre nos fibroblastos selvagens. Curiosamente, as células XP-D mostraram-se completamente deficientes no reparo dessas quebras. As células TTD/XPD, de forma surpreendente, apresentam um grande número de quebras mesmo na ausência de tratamento, um indicativo que o genoma dessas células pode estar em constante estresse. Apesar disso, o número de quebras aumenta com o tratamento e volta aos níveis iniciais após 24 horas, mostrando que as células TTD/XPD, assim com as XP-D/CS e MRC5 e ao contrário das células XP-D, conseguem de alguma forma lidar com essas lesões. É interessante notar que nas células XP-D/CS ocorre um aumento no número de quebras 2 horas após o tratamento, na maior concentração de MB fotoativado.

A



B



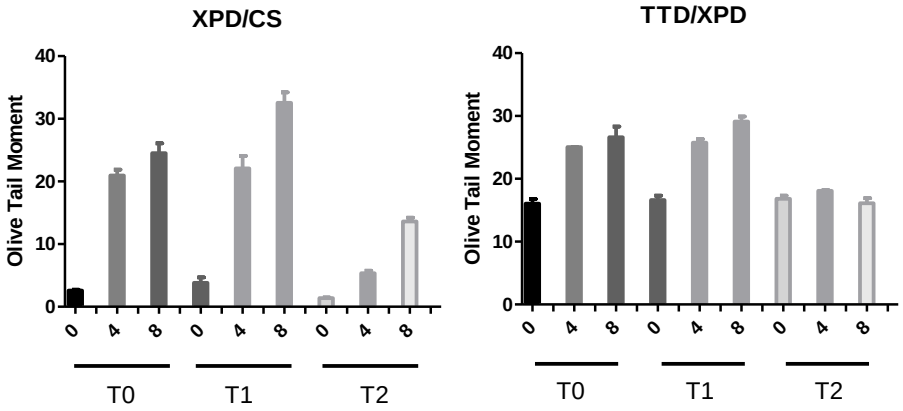


Figura 25: Cinética de reparo de quebras causadas pelo tratamento com concentrações crescentes (0, 4 e 8 μM) de MB fotoativado em células selvagens e com mutações em XPD. A: exemplos dos núcleos observados após a eletroforese em condições alcalinas das células tratadas com MB fotoativado. B: os danos foram expressos levando em conta o Olive Tail Moment, a partir da fórmula: % DNA da cauda x comprimento do Momento da cauda (medido do dentro do núcleo do cometa até o centro da cauda). T1 = 2 horas e T2 = 24 horas após tratamento. O gráfico mostra a média com erro padrão de 2 experimentos independentes; em cada experimento foram contados 100 núcleos por condição.

4.2 Resposta das células com diferentes mutações em *POLH* ao estresse oxidativo

4.2.1 Linhagens de fibroblastos de pacientes XP-V brasileiros utilizadas neste estudo

Paciente XP05SP

A linhagem das células do paciente XP05SP foi estabelecida a partir de uma biópsia de pele não-exposta à luz solar, encaminhada ao laboratório pela dermatologista, para confirmação do diagnóstico clínico da síndrome XP. Os sintomas brandos de pigmentação da pele, assim como a ausência de sintomas neurológicos, levantaram a suspeita do paciente pertencer ao grupo XP-V. O paciente, entretanto, já apresentou um melanoma no rosto, em uma idade precoce para a média dos pacientes XP-V, o que pode estar relacionado à grande exposição à luz solar do paciente.

Após o estabelecimento da linhagem, foram realizados experimentos de viabilidade celular (XTT) para determinar a sensibilidade das células à irradiação UVC, na presença ou não de cafeína. Sabe-se que as células XP-V apresentam sensibilidade

moderada à UVC, e que essa sensibilidade é muito aumentada na presença da cafeína. Como mostra a figura 26, as células do paciente, quando na presença de cafeína, apresentam uma sensibilidade maior do que os fibroblastos normais, porém menor do que os fibroblastos XP-C.

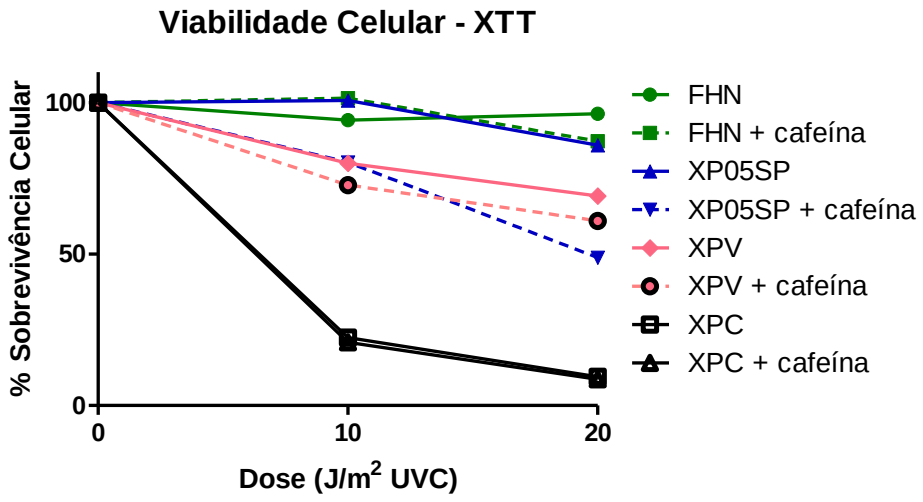


Figura 26: Sensibilidade das células primárias do paciente XP05SP ao tratamento com UVC na presença de cafeína, determinado por XTT. FHN: fibroblastos humanos normais. XP-V: AS865. XP-C: AS189.

Experimentos de Western Blotting indicaram a ausência completa da proteína DNA polimerase η no paciente XP05SP, como mostra a figura 27, dado que foi tomado como fundamental para o diagnóstico da mutação genética neste paciente.

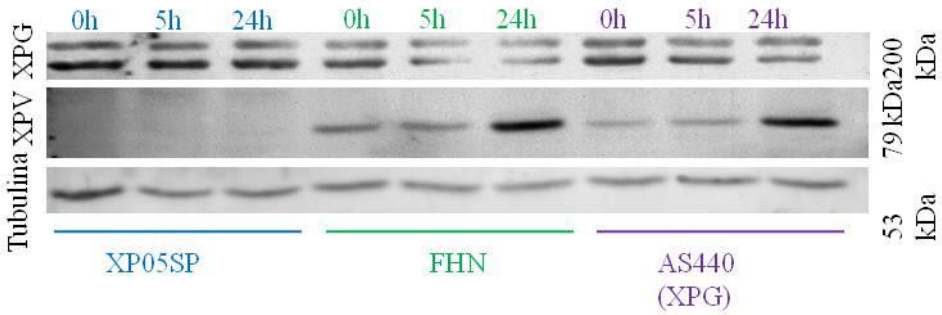


Figura 27: Expressão da proteína DNA polimerase η (XPV) em fibroblastos primários após irradiação com luz UVC. As extrações foram realizadas 0 (T0), 5 (T1) e 24 (T2) horas após o tratamento. Doses de UVC: FHN – 0 e 40 J/m^2; XP05SP – 0 e 20 J/m^2; AS440 (XP-G) – 0 e 7 J/m^2

Para a confirmação do grupo de complementação do paciente XP05SP, experimentos de Unscheduled DNA Synthesis (UDS) foram realizados em nosso laboratório em colaboração com o laboratório do doutor Alain Sarasin (Institut Gustave Roussy, Villejuif, França). Esse experimento consiste na análise da capacidade das células de sintetizarem DNA após irradiação com luz UV; as células são plaqueadas em lamínulas de vidro, pré-incubadas em meio contendo timidina tritiada, tratadas com o agente genotóxico (no caso, luz UVC) e novamente incubadas com meio + timidina tritiada. No fim do tratamento as lamínulas são fixadas e expostas a uma emulsão autorradiográfica, que é revelada e em média 7 dias após a montagem das lâminas. Os fragmentos de DNA sintetizados após o tratamento são visualizados como pequenos grânulos no núcleo das células. As células XP deficientes em NER apresentam em média menos de 10 grânulos por núcleo, uma vez que não são capazes de sintetizar DNA após a irradiação com luz UVC; as células XP-V, assim como as normais, apresentam mais de 70 grânulos, pois são capazes de reconhecer e reparar os danos causados pela luz UVC. Os resultados obtidos no laboratório do Dr Alain Sarasin mostram que as células XP05SP apresentam número de grânulos semelhante aos fibroblastos normais, em mais uma indicação que o paciente XP05SP seja portador da síndrome XP-V.

O sequenciamento do genoma desse paciente pela Dra Veridiana Munford e pela também aluna de doutorado do laboratório Ligia Pereira Castro mostraram que de fato esse paciente possui uma substituição de G para A em homozigose em um sítio de splicing próximo ao início do exon 11 no gene *POLH*, o que levaria à codificação de uma proteína não-funcional ou com baixíssima estabilidade.

Pacientes da comunidade de Araras (Goiás)

Nosso laboratório recebeu em 2009 amostras de diversos pacientes XP pertencentes à comunidade de Araras (município de Faina), no interior do estado de Goiás. São pacientes provenientes de duas grandes famílias relacionadas, com grande heterogeneidade entre a severidade dos sintomas e variação na idade dos afetados (incluindo alguns pacientes muito longevos, incomum em pacientes XP), porém com nenhuma anormalidade neurológica.

Experimentos realizados no laboratório pela Dra Veridiana Munford mostraram um aumento na sensibilidade das células desses pacientes à UVC na presença de cafeína, e os ensaios de UDS realizados no laboratório do Dr Alain Sarasin mostraram que o número de grânulos nucleares após irradiação com luz UVC eram semelhantes aos fibroblastos normais. Assim, com a suspeita desses pacientes também serem portadores da síndrome XP-V, realizou-se um WB para a proteína pol η. Como mostra a figura 28, alguns membros da comunidade diagnosticados como XP (GO06, GO03 e GO04) não apresentam a proteína pol η (os afetados estão sinalizados com a seta). Os pais do paciente GO06 (GO01 e GO05) apresentam também redução nos níveis de proteína, condizente com sua condição de heterozigotos. As pacientes GO03 e GO04 são duas irmãs, com sintomas clínicos claros de XP.

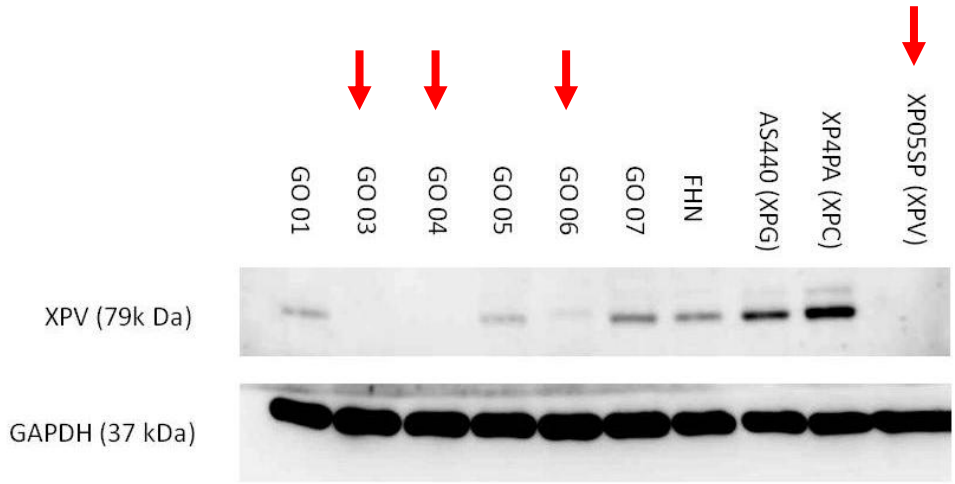


Figura 28: Expressão da proteína DNA polimerase η (XPV) em fibroblastos primários dos pacientes de Araras. ↓: afetados

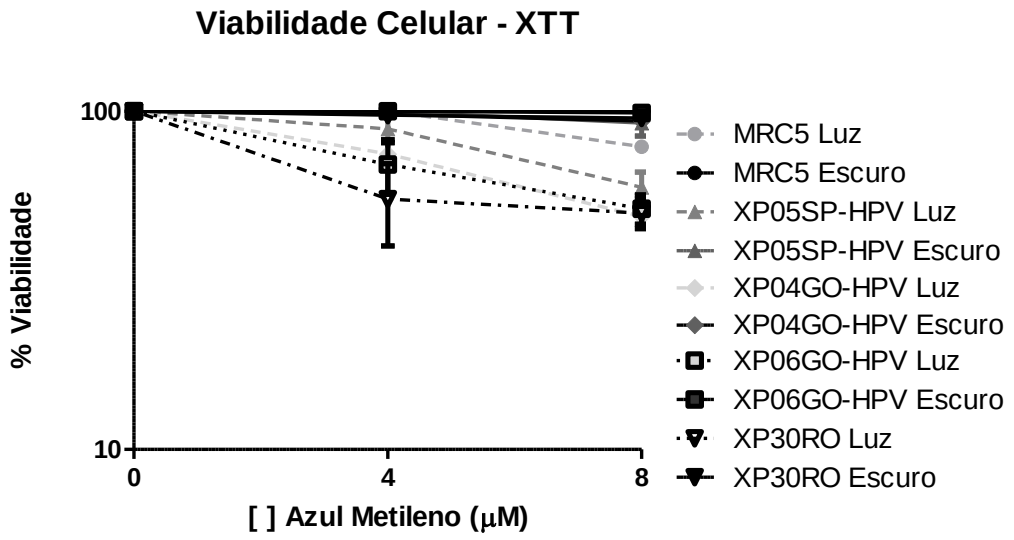
Surpreendentemente, o sequenciamento do genoma desses pacientes mostrou a presença de duas mutações no gene *POLH* nessa comunidade: uma mutação pontual em sítio de splicing no exon 6, e uma mutação pontual levando à formação de um códon de parada no exon 8; ambas produziriam proteínas truncadas. Assim, nessa comunidade existem pacientes homozigotos para a mutação do exon 6, homozigotos para a mutação do exon 8, e hetorizogotos compostos. Após a confirmação do diagnóstico, as linhagens celulares passaram a ser chamadas de XP03GO (GO03), XP04GO (GO04) e XP06GO (GO06). A genotipagem dos membros da comunidade para

a construção da árvore genealógica das famílias foi realizada pela aluna Ligia Pereira Castro.

4.2.2 Sensibilidade das células XP-V ao estresse oxidativo

As linhagens primárias de fibroblastos obtidas a partir das biópsias desses pacientes foram transformadas com as oncoproteínas E6 e E7 de HPV. Para estudar o comportamento das células XP-V frente ao estresse oxidativo induzido pelo tratamento com MB e luz visível, foram realizados experimentos de sobrevivência clonogênica e XTT com os fibroblastos transformados desses pacientes. Os dados apresentados na figura 29 demonstram que as células dos pacientes XP05SP, XP04GO e XP06GO (que não apresentam ou apresentam muito pouca proteína pol η no WB), assim como a linhagem XP30RO, se mostraram mais sensíveis ao tratamento com MB + luz do que os fibroblastos normais (MRC5), principalmente em relação à sua capacidade de formar colônias. Essa sensibilidade, entretanto, é menor do que a das células com mutações em *XPD*, como esperado.

A



B

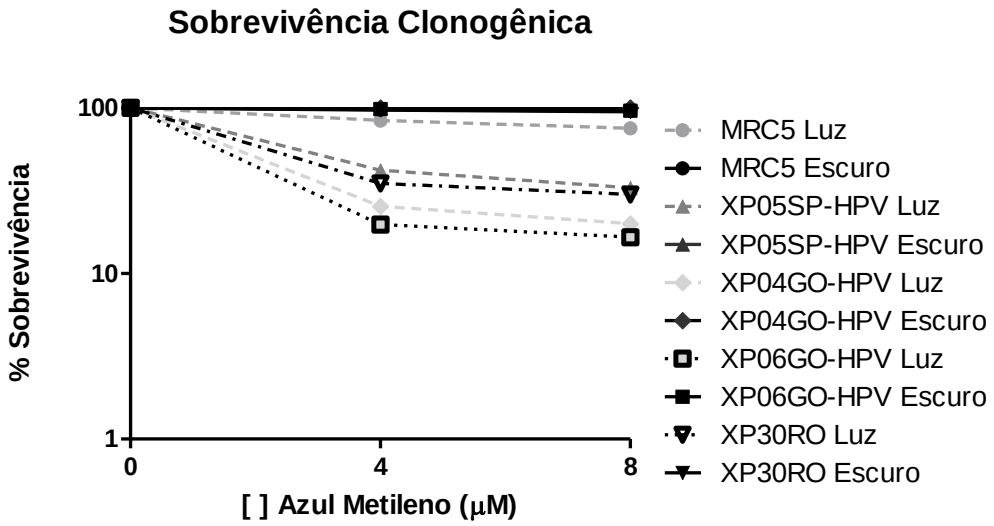


Figura 29: Sensibilidade de células com mutações em *POLH* após tratamento com Azul de Metileno fotoativado, determinado por XTT (A) e sobrevivência clonogênica (B). XP05SP, XP04GO e XP06GO: pacientes XP-V brasileiros. XP30RO: XP-V.

Ensaios com células XP-V primárias também mostraram sensibilidade ao tratamento com MB + luz (figura 30), embora menos do que as transformadas, e ao tratamento com $KBrO_3$ (figura 31), de forma semelhante porém menos acentuada do que o observado nas células com mutações em *XPD*.

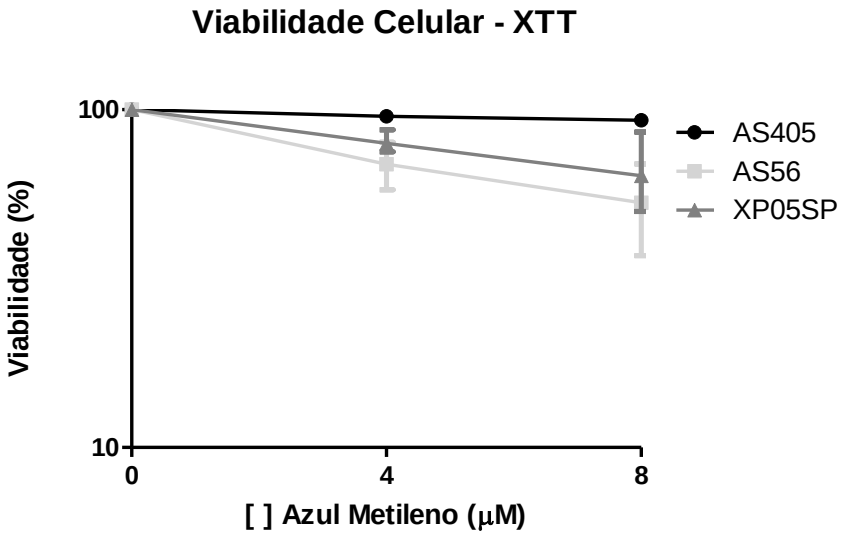


Figura 30: Sensibilidade das células primárias com mutações em *POLH* ao tratamento com Azul de Metileno fotoativado, determinado por XTT. O gráfico mostra a média com erro padrão de 3 experimentos independentes, realizados em triplicatas. AS405: fibroblastos normais. AS56 e XP05SP: XP-V.

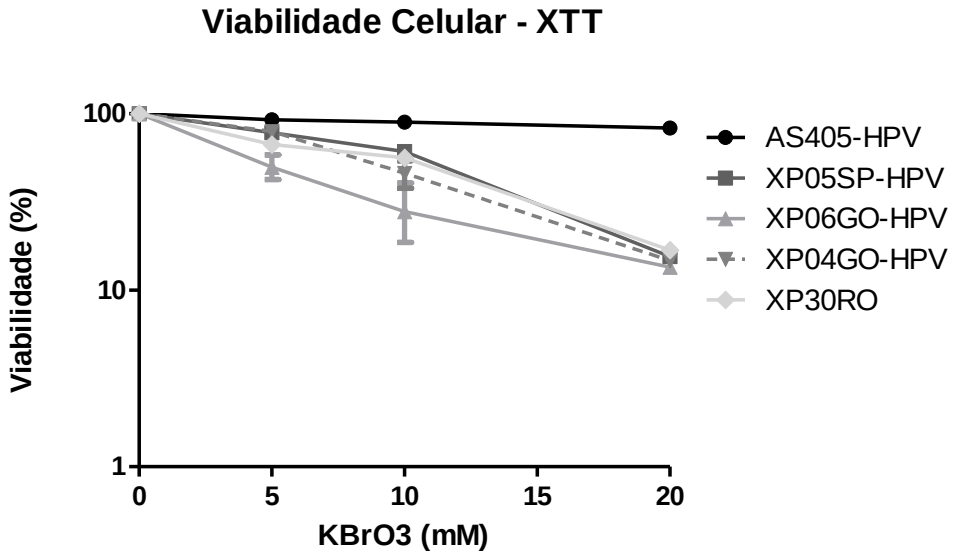


Figura 31: Sensibilidade das células com mutações em *POLH* ao tratamento com bromato de potássio ($KBrO_3$), determinado por XTT. O gráfico mostra a média com erro padrão de 3 experimentos independentes, realizados em triplicatas.

4.2.3 Alterações no ciclo celular após estresse oxidativo

A marcação com PI também foi realizada nas células XP-V, para determinação das alterações no ciclo celular após tratamento com MB fotoativado. De forma semelhante ao observado nas células com mutações em *XPD,* as células XP-V apresentam um bloqueio no ciclo celular que permanece mesmo após 48 horas do tratamento, diferente dos fibroblastos normais. É interessante notar que, mesmo as linhagens possuindo mutações truncantes, o comportamento delas frente ao estresse oxidativo é um pouco diferente: de forma geral todas as linhagens apresentam um bloqueio em fase S/G2, entretanto esse bloqueio é variável em intensidade principalmente nas concentrações mais baixas de MB, como mostra a figura 32.

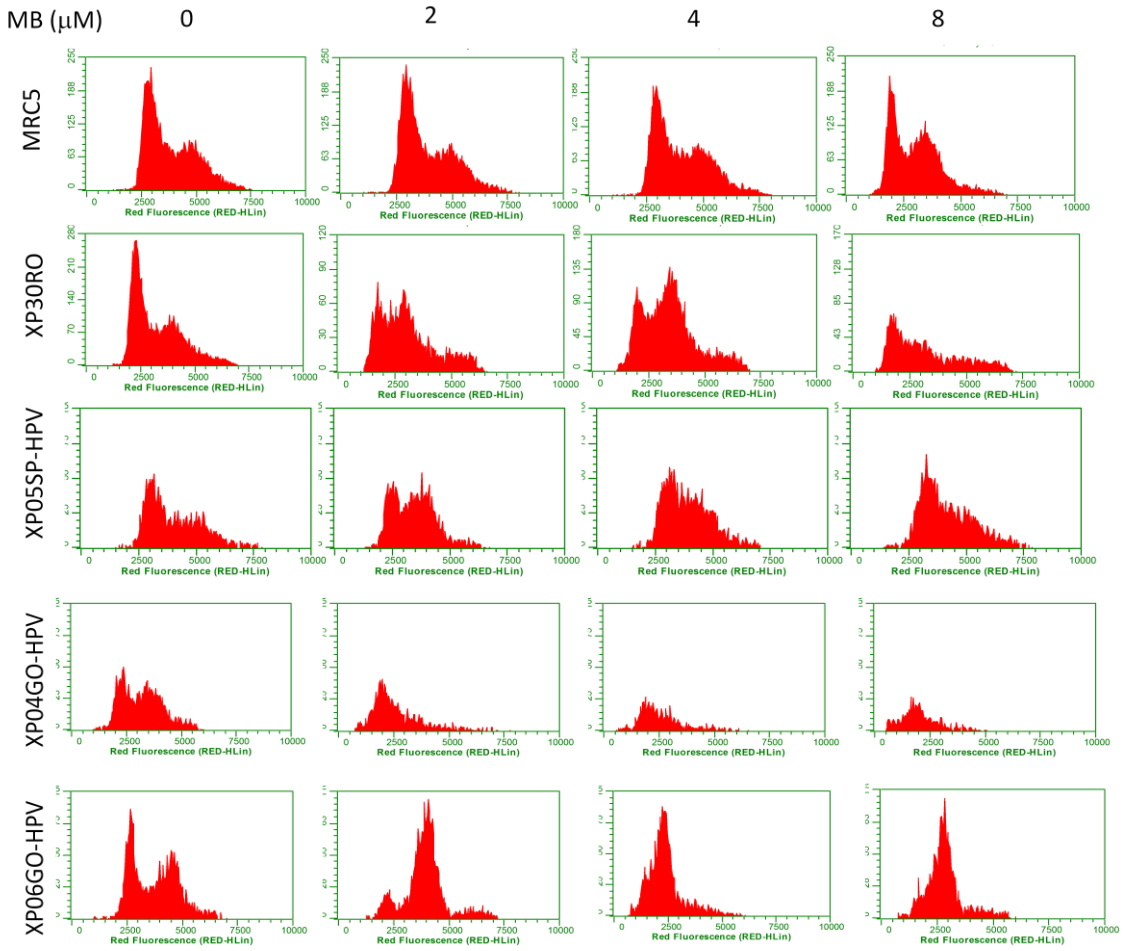


Figura 32: Diferentes linhagens de células XP-V apresentam um bloqueio no ciclo celular 48 horas após tratamento com Azul de Metileno fotoativado. Análise do ciclo a partir da incorporação de PI.

Da mesma forma que as células transformadas, as células primárias também apresentam um bloqueio no ciclo celular 48 horas após o tratamento com MB fotoativado, que é diferente entre as linhagens: enquanto a linhagem proveniente do paciente XP04GO apresenta um forte bloqueio na fase G1, as linhagens dos pacientes XP05SP e XP06GO apresentam um bloqueio muito menos acentuado, mais semelhante aos fibroblastos normais (Figura 33).

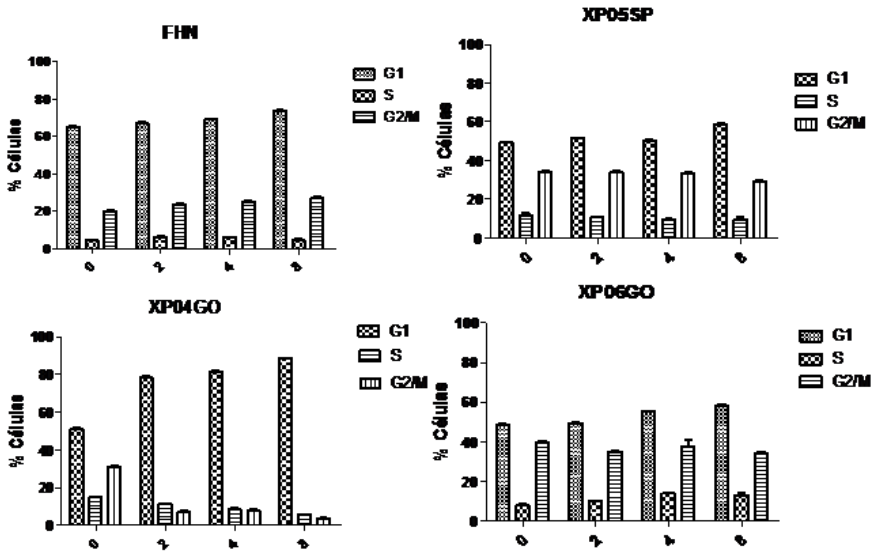


Figura 33: As células primárias com mutações em *POLH* apresentam diferenças no bloqueio do ciclo celular, após tratamento com Azul de Metileno fotoativado. Análise do ciclo a partir da incorporação de PI. O gráfico mostra a média com erro padrão de 3 experimentos independentes, realizados em triplicatas.

De acordo com as alterações no ciclo celular, as células XP-V apresentam uma permanência da sinalização da presença de danos no genoma, que é semelhante entre 4 e 24 horas porém aumenta significativamente entre 24 e 48 horas após o tratamento com MB fotoativado, em mais uma indicação da permanência de lesões não-reparadas no genoma (Figura 34).

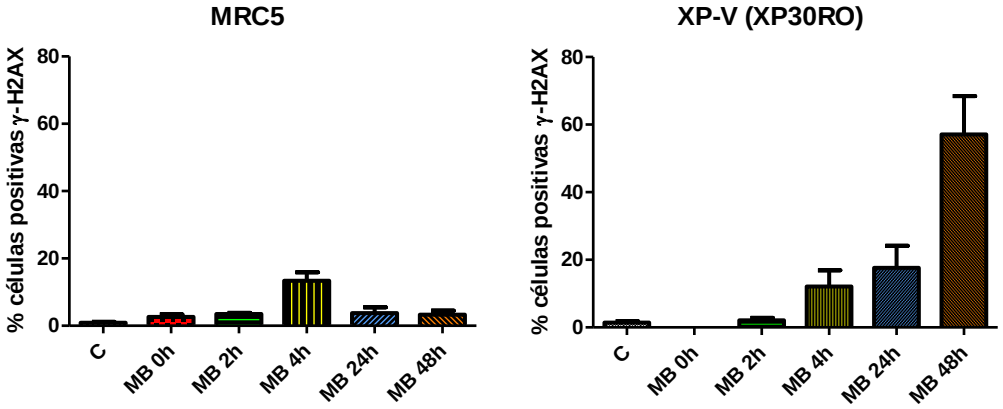


Figura 34: Presença de danos no DNA (γ-H2AX) após tratamento com MB fotoativado nas células deficientes na DNA polimerase η. O gráfico mostra a média com erro padrão de 3 experimentos independentes, realizados em triplicatas.

4.2.4 Análise da população em apoptose após estresse oxidativo

De acordo com os resultados de sensibilidade, as células XP-V apresentam um aumento na população em Sub-G1 após tratamento com MB fotoativado (Figura 35), que é maior do que a dos fibroblastos normais, e menor do que a encontrada nas células com mutações em *XPD*; é interessante notar que as células do paciente XP06GO, apesar de se mostrarem mais sensíveis pelo experimento de sobrevivência clonogênica, apresentam as menores quantidades de células em apoptose. Entretanto, é importante lembrar que essas diferenças entre as diferentes linhagens podem ocorrer não somente em função das possíveis diferenças na expressão e/ou atividade da proteína pol η, mas também de todo o background genético de cada linhagem; é necessária a realização de ensaios de complementação para que se possa afirmar a validade desses resultados.

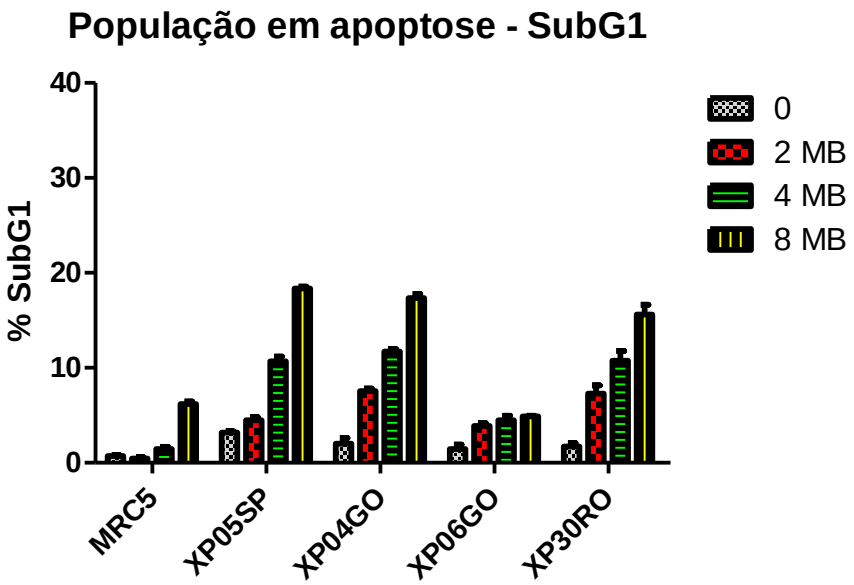


Figura 35: Aumento da população em apoptose (Sub-G1) após tratamento com MB fotoativado nas células deficientes na DNA polimerase η. O gráfico mostra a média com erro padrão de 3 experimentos independentes, realizados em triplicatas.

Experimentos de citometria para caspase 3 ativada também mostraram uma grande parte da população de células XP-V positivas para essa marcação 72 horas após tratamento com MB fotoativado (Figura 36), indicando, juntamente com os resultados da população em Sub-G1, que essas células provavelmente morrem por apoptose. É interessante notar, ao contrário do que ocorre com os fibroblastos normais ou mesmo

com as células deficientes em *XPD*, que há o surgimento de duas populações distintas dentre as células positivas para caspase 3 ativada; mais experimentos são necessários para investigar a relevância biológica desse achado, assim como se ele se repete nas outras linhagens XP-V .

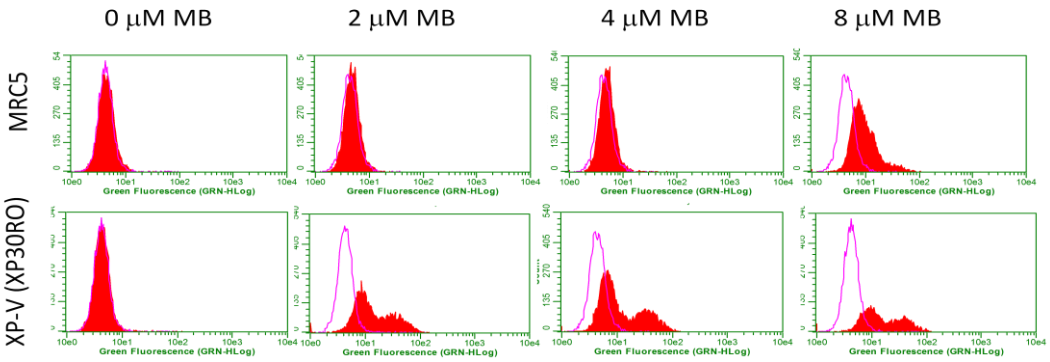


Figura 36: Ativação de caspase 3 72 horas após tratamento com concentrações crescentes de MB fotoativado nas células XP-V. No eixo x encontra-se a marcação da caspase 3 ativada, indicada pela fluorescência do verde (FITC); no eixo y está o número de células. A população em vermelho representa as células após cada tratamento, em comparação com o controle, representado em cada gráfico pela linha roxa. São mostradas figuras representativas de 3 experimentos independentes, realizados em triplicatas.

4.2.5 Capacidade de reparo de quebras geradas pelo tratamento com MB fotoativado

Ensaios de cometa alcalino foram realizados para uma das linhagens XP-V, e os resultados mostram que essa linhagem não apresenta deficiências no reparo de quebras geradas por esse tipo de estresse oxidativo, mostrando uma cinética de reparo similar aos fibroblastos normais (Figura 37).

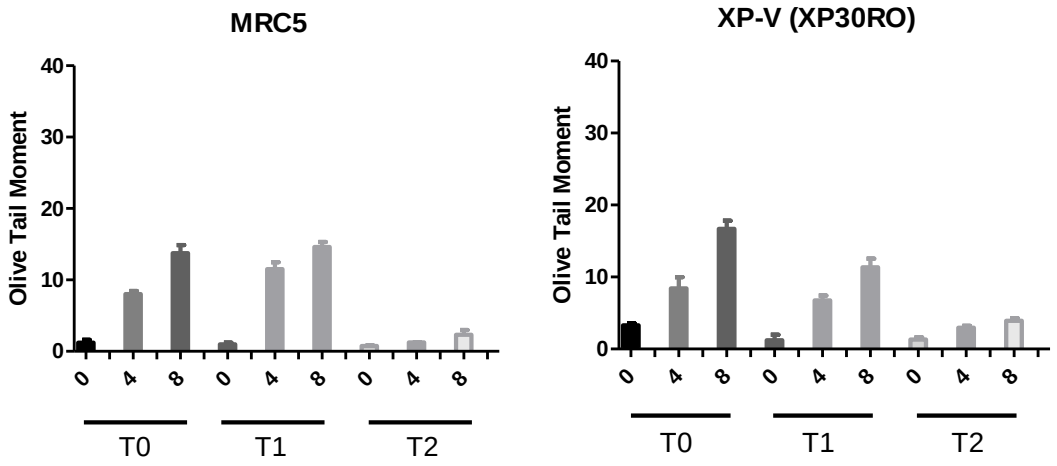


Figura 37: Cinética de reparo de quebras causadas pelo tratamento com concentrações crescentes (0, 4 e 8 μM) de MB fotoativado em células selvagens e XP-V. Os danos foram expressos levando em conta o Olive Tail Moment, a partir da fórmula: % DNA da cauda x comprimento do Momento da cauda (medido do dentro do núcleo do cometa até o centro da cauda). T1 = 2 horas e T2 = 24 horas após tratamento. O gráfico mostra a média com erro padrão de 2 experimentos independentes; em cada experimento foram contados 100 núcleos por condição.

4.3 Indução da proteína DNA polimerase η após danos genotóxicos

4.3.1 Cinética de indução e dependência de p53

A figura 27 também mostra uma indução na proteína DNA polimerase η após o tratamento com UVC, nos fibroblastos normais e deficientes em NER (XP-G), 24 horas após o tratamento. Resultados semelhantes foram obtidos de forma independente pelo doutorando Guilherme Franscisco, do laboratório do doutor Roger Chammas (FM-USP): foi observada uma indução da proteína pol η em linhagem de melanoma (SK-Mel 37), 24 horas após tratamento com UVC (20 e 40 J/m^2), UVB (120 J/m^2) e cisplatina (12,5 μM). Além disso, a mesma indução não foi observada na linhagem mutada em p53 (SK-Mel 28). Esses resultados não eram esperados e ainda não haviam sido descritos; a coincidência da indução após tratamentos genotóxicos “semelhantes”, assim como da cinética da indução, chamaram nossa atenção e assim decidimos realizar mais experimentos para investigar essa indução.

Para verificar uma possível participação da proteína p53 na indução de pol η, foram irradiados com doses equitóxicas de UVC fibroblastos normais e deficientes em NER (XP-C) transformados por SV40. As amostras proteicas foram coletadas 0, 5 e 24 horas após o tratamento. Como mostra a figura 38, não houve uma indução da proteína pol η após o tratamento com luz UVC nos fibroblastos transformados, como parece ocorrer nos fibroblastos primários.

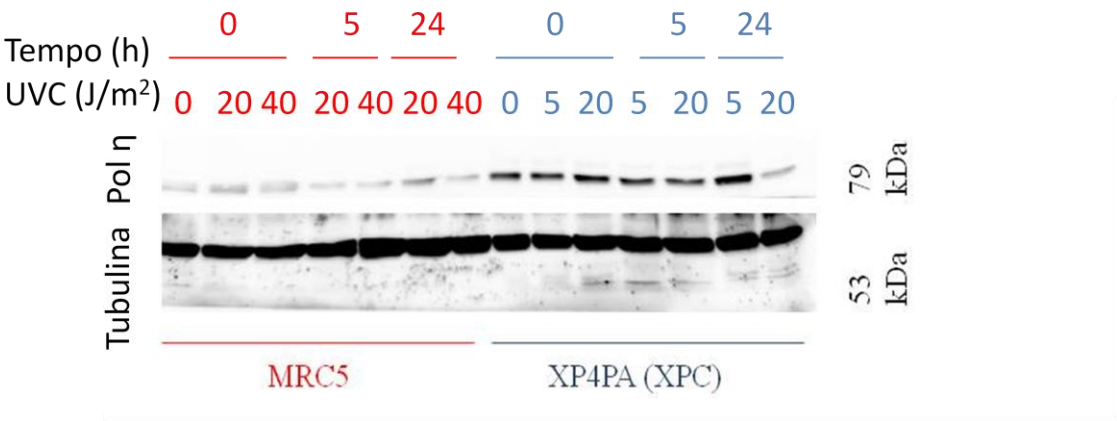


Figura 38: Expressão da proteína DNA polimerase η em fibroblastos transformados por SV40 após irradiação com luz UVC. As células foram irradiadas nas doses indicadas e cultivadas de 0 a 24 horas antes da extração protéica, para realização desse WB.

A adição do inibidor de p53 pifitrina-α foi capaz de inibir a indução de pol η em fibroblastos primários como mostra a figura 39, em mais uma indicação da dependência de p53 para que ocorra essa indução. Além disso, experimentos realizados pelo aluno Guilherme Francisco mostraram que a expressão de um plasmídeo contendo a sequência do gene *TP53* foi capaz de restabelecer a indução de pol η após tratamentos genotóxicos.

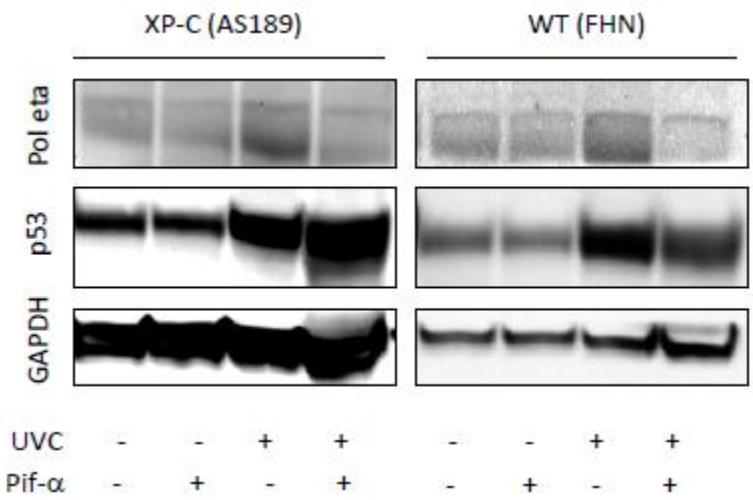


Figura 39: Inibição da indução da proteína pol η após irradiação com luz UVC em fibroblastos primários pelo tratamento com inibidor de p53 (pifitrina-α). Doses de UVC: 0 e 40 J/m^2 para FHN e 0 e 6 J/m^2 para AS189 (XP-C).

4.3.2 Pré-dose de UVC induz diferenças na distribuição do ciclo celular e diminuição da população em apoptose após doses elevadas de UVC

Para estudar possíveis efeitos fenotípicos dessa indução de pol η nas células XP-C, foram realizados experimentos utilizando doses altas de UVC, 24 horas após irradiação das células com as doses mais baixas nas quais já havia sido detectada a indução da proteína pol η por WB (no caso 6 J/m^2). Os resultados desses experimentos são mostrados na figura 40, onde pode-se verificar uma diferença nos perfis de ciclo celular entre as células XP-C que receberam as doses "de indução" antes de receber as doses grandes, quando comparadas com as células que receberam somente as doses altas: as últimas mostram uma forte parada do ciclo em fase G1, enquanto as células pré-irradiadas apresentam uma parada em fase S/G2 (Figura 40B). Além disso, análises da população em Sub-G1 mostram que as células pré-irradiadas apresentam menos células em apoptose do que as não previamente irradiadas (Figura 40C), mostrando que a indução de pol η é capaz de aumentar a resistência das células XP-C ao estresse genotóxico causado pela irradiação com luz UVC.

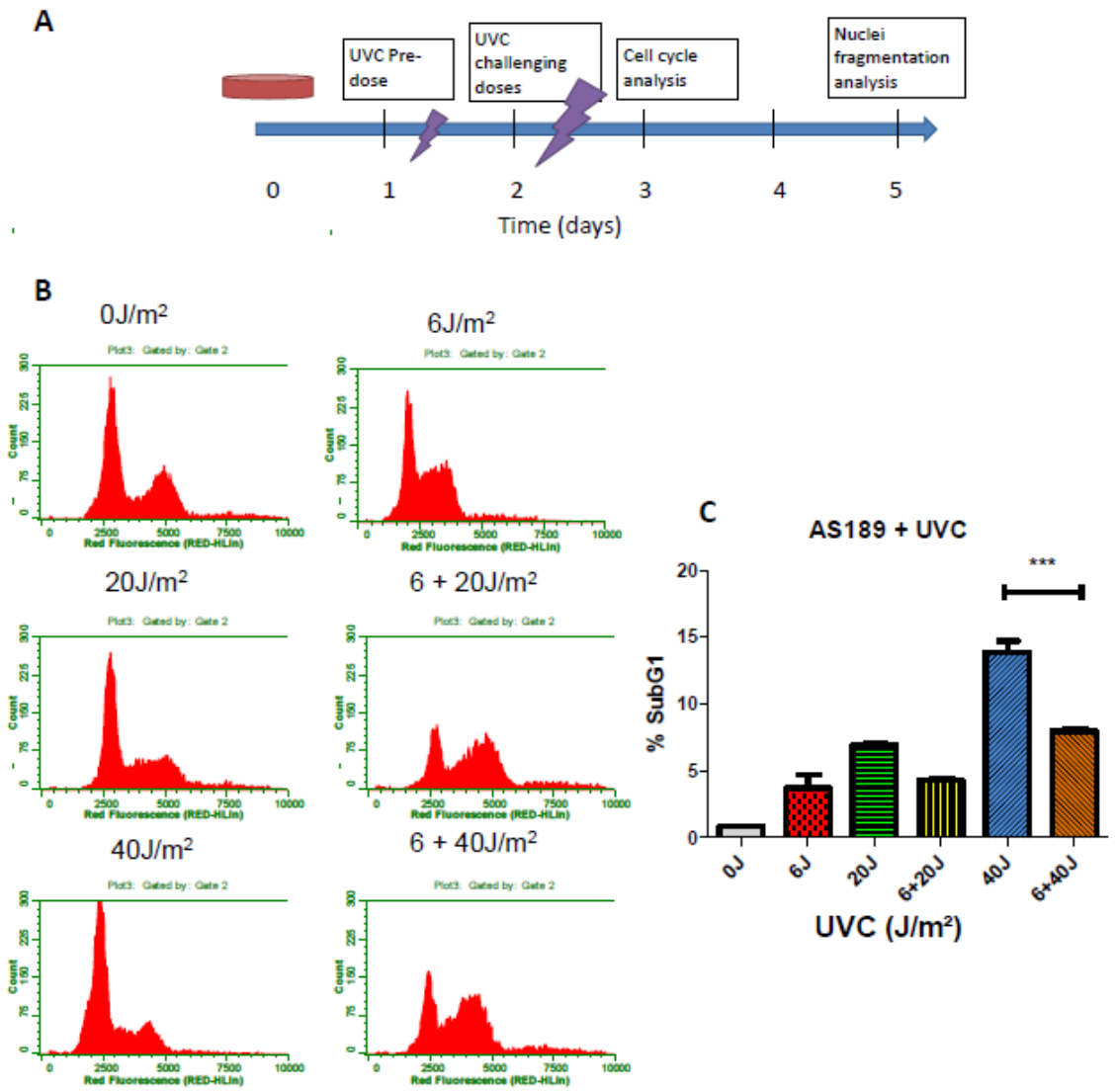


Figura 40: Pré-dose de UVC induz diferenças na distribuição do ciclo celular e diminuição da população em apoptose após doses altas de UVC em fibroblastos primários XP-C. Os fibroblastos primários foram irradiados como mostrado em A (pré-dose de UVC: 6 J/m^2). 24 e 72 horas após a irradiação as células foram fixadas e coradas com PI para análise do ciclo celular (B) e da população em Sub-G1 (C). O gráfico C mostra a média com erro padrão de 3 experimentos independentes, realizados em triplicatas. ***: $p < 0.001$ 2-way ANOVA com Tukey´s Multiple Comparison Test.

4.3.3 Pré-dose de UVC induz aumento da capacidade de replicação de DNA

Ensaios de citometria com marcação de BrdU (pulso realizado por 20 minutos após a dose alta de UVC) também mostraram que as células pré-irradiadas são capazes

de incorporar uma maior quantidade de DNA do que as células não-irradiadas, como mostra a maior população de células em S nos grupos pré-irradiados 24 horas após a dose alta (em destaque na figura 41); uma irradiação com 46 J/m^2 (correspondente à soma da dose de indução e da segunda dose) foi realizada como controle. Esses resultados podem indicar que a indução de pol η está permitindo às células continuar a replicação ao realizar a TLS através dos danos causados pela UVC, evitando a parada das forquilhas de replicação, que poderiam levar à apoptose.

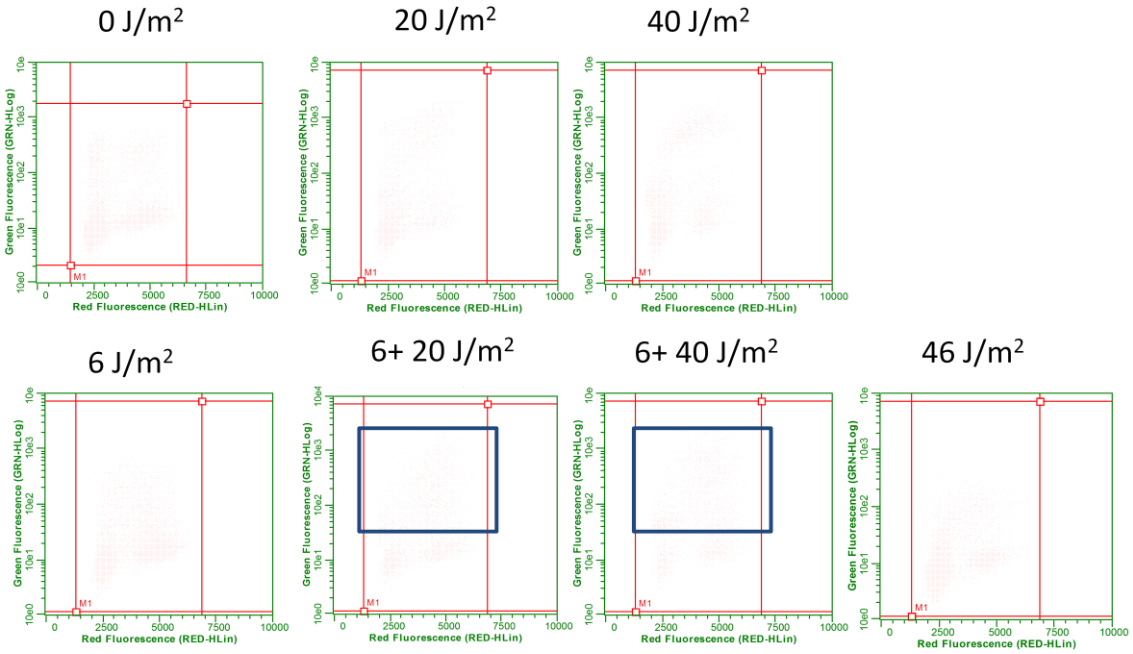


Figura 41: Pré-dose de UVC leva ao aumento da população em S 24 horas após doses altas de UVC em fibroblastos primários XP-C. Os fibroblastos primários foram irradiados como mostrado na figura 38A (pré-dose de UVC: 6 J/m^2). O pulso de BrdU foi realizado por 20 minutos após a segunda dose de irradiação, e 24 horas após a segunda irradiação as células foram fixadas e coradas com PI e BrdU para análise da síntese de DNA através da incorporação do BrdU. No eixo x está a fluorescência do vermelho e corresponde à incorporação de PI (quantidade de DNA das células) e no y a fluorescência do BrdU (marcado em verde com FITC), correspondente à população de células que está incorporando DNA no momento do pulso.

Para melhor estudar o mecanismo de ação da pré-dose de UVC na forquilha de replicação, foram realizados ensaios de *DNA fiber assay*, que é capaz de identificar a elongação da cadeira filha de DNA em células antes e após o dano genotóxico que causa uma parada na forquilha de replicação (o dano genotóxico – no caso UVC – encontra-se indicado com um raio na figura 42A). Esses ensaios mostraram que tanto

fibroblastos primários normais quanto deficientes em GG-NER (XP-C) que receberam a pré-dose foram capazes de reativar a forquilha de replicação e replicar cadeias de DNA maiores após doses altas de UVC do que as células que não foram previamente irradiadas, como mostra o aumento da razão CldU/IdU, mais próximo dos controles não-irradiados (0.33), tanto nos fibroblastos normais (Figura 42B) como nos fibroblastos XP-C (C). A figura mostra também gráficos representando somente o comprimento da fita de DNA sintetizada após o dano genotóxico (IdU *track lenght*), nos quais é ainda mais evidente que as células pré-irradiadas foram capazes de sintetizar cadeias maiores após o dano do que as células que receberam somente as doses mais altas.

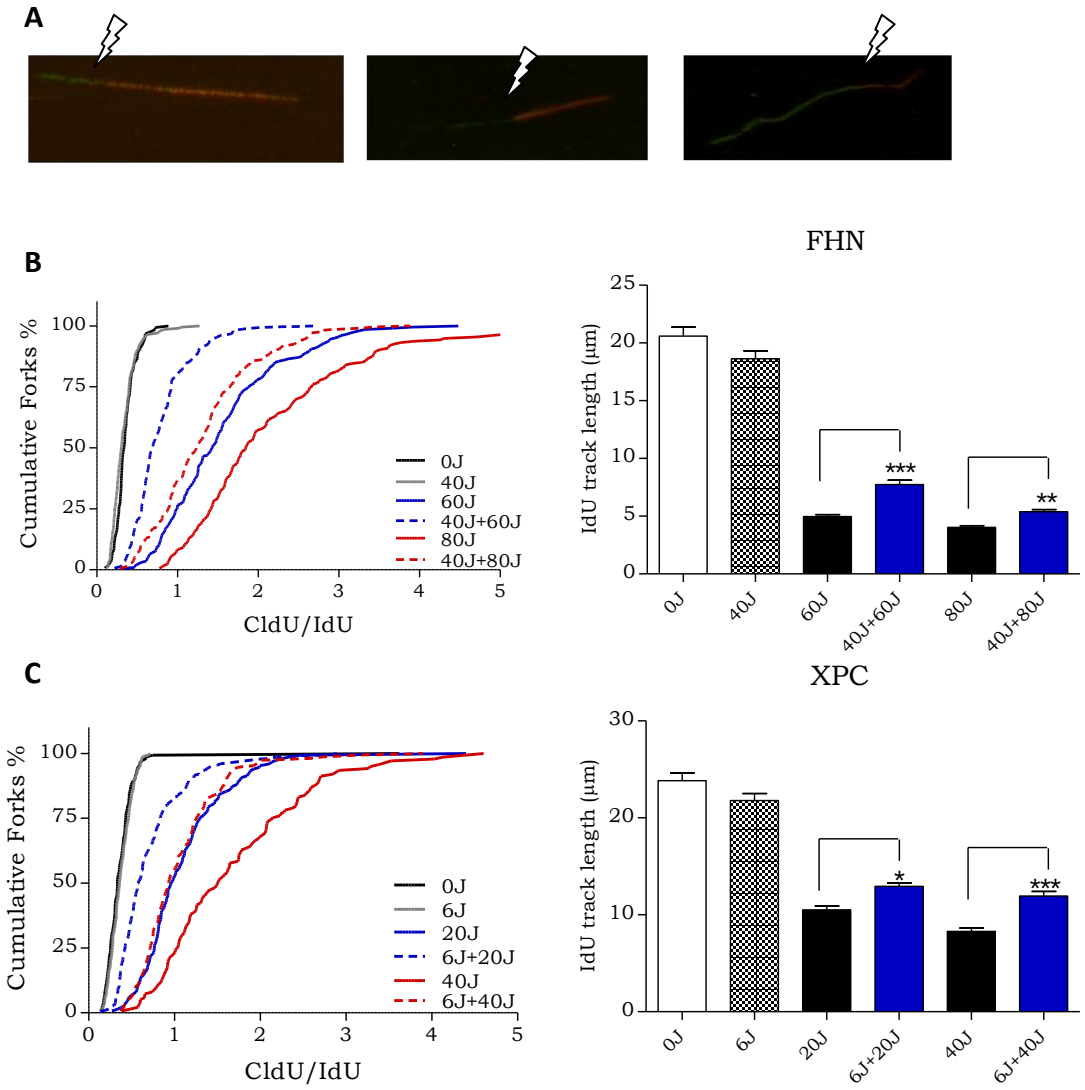


Figura 42: Pré-dose de UVC leva ao aumento da capacidade de sintetizar cadeias maiores de DNA após doses altas de UVC em fibroblastos primários normais e deficientes em GG-NER (XP-C). Os fibroblastos primários foram irradiados como mostrado na figura 38A (pré-dose de UVC: 40 J/m^2 para FHN e 6 J/m^2 para XP-C). A:

Exemplos de fibras com diferentes quantidades de DNA sintetizados após o dano genotóxico (raio). Quantificações das razões CldU/IdU e do comprimento da fita de DNA que incorporou IdU (IdU *track lenght*) nos fibroblastos normais FHN (B) e deficientes em GG-NER (C). O pulso de CldU foi realizado por 20 minutos antes da irradiação com as doses altas de UVC, e o de IdU por 1 hora após essas doses. Foram contadas no mínimo 75 fibras por cada condição, em 2 experimentos diferentes.

De fato, as células que receberam a pré-dose mostraram-se mais aptas a resolver a parada na forquilha de replicação, continuando a replicação do seu DNA, o que concorda com os dados de ciclo, incorporação de BrdU e sobrevivência celular, uma vez que as forquilhas de replicação paradas podem colapsar formando quebras no DNA, que são lesões tóxicas.

4.3.4 DNA polimerase η é essencial para o aumento da sobrevivência celular induzido pela pré-dose de UVC

Para nos certificarmos do papel da indução da DNA polimerase η no fenótipo observado nos experimentos de apoptose, foram realizados experimentos semelhantes na presença de um RNA de interferência para esse gene (siPOLH); os resultados são apresentados na figura 43. Podemos observar que a expressão/indução dessa proteína é essencial para o aumento da sobrevivência induzido pela pré-dose de UVC, tendo um papel importante na resposta dessas células a longo prazo, provavelmente permitindo a TLS e impedindo o colapso das forquilhas de replicação que posteriormente levariam as células à apoptose, uma vez que a quantidade de células em apoptose é a mesma entre as células que receberam a pré-dose e as que não receberam na ausência de pol η, ou seja, a morte celular volta aos níveis sem pré-dose.

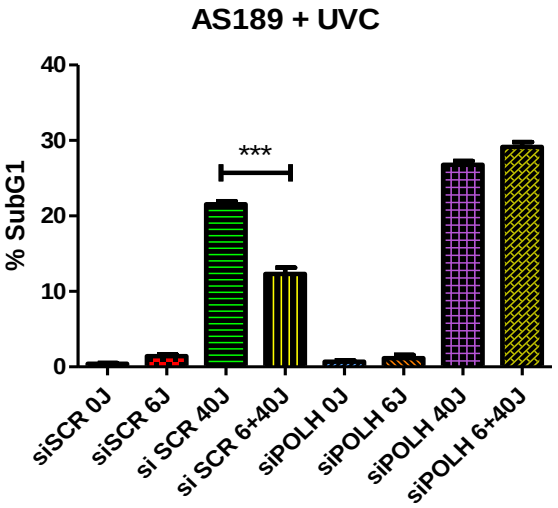


Figura 43: Efeitos do silenciamento do gene *POLH* sobre fibroblastos primários XP-C após doses repetidas de UVC. Os fibroblastos primários foram irradiados como mostrado na figura 38A (pré-dose de UVC: 6 J/m^2), após silenciamento com siRNA. 72 horas após a irradiação as células foram fixadas e coradas com PI para análise da população em Sub-G1. O gráfico mostra a média com erro padrão de 3 experimentos independentes, realizados em triplicatas. ***: $p < 0.001$ 2-way ANOVA com Tukey´s Multiple Comparison Test.

4.4 Determinação da funcionalidade da proteína DNA polimerase η nas células de pacientes XP-V através do sequenciamento dos genes variáveis das imunoglobulinas

4.4.1 Confirmação do diagnóstico da síndrome XP-V com base no perfil das mutações dos genes variáveis das imunoglobulinas

Os resultados descritos a seguir foram obtidos em colaboração com o laboratório do Dr. Said Aofouchi, sob co-orientação do Dr. Alain Sarasin, durante período de doutorado-sanduíche no Laboratório de Células B e Plasticidade Genômica, Institut de Cancérologie Gustave Roussy, Villejuif, na França. O objetivo inicial do estágio era de aprender essa técnica que permite não só uma confirmação do diagnóstico da síndrome de XP-V (ou mesmo do diagnóstico quando não há a possibilidade da realização de ensaios funcionais com fibroblastos, ou do sequenciamento do gene *POLH* inteiro), mas também da determinação da funcionalidade da proteína pol η presente nas células dos pacientes XP-V.

Vale lembrar que os pacientes XP-V apresentam uma diminuição de mutaçãoes em sítios A/T de aproximadamente 50% (percentual médio da população) para menos de 10%, com um aumento concomitante nas mutações em sítios G/C (sinal da atividade de pol κ, apesar do número de mutações não sofrer alteração significativa, e que a frequência de mutações nos sítios A/T está diretamente relacionada à quantidade da proteína pol η funcional, uma vez que pacientes XP-V que possuem uma pequena quantidade de pol η funcional apresentam uma taxa de mutações em A/T intermediária entre os XP-Vs sem nenhuma proteína e o restante da população. Assim, foi sugerido que o sequenciamento das regiões variáveis dos genes das imunoglobulinas poderia ser usado como auxílio no diagnóstico de XP-V, assim como para o estudo da funcionalidade da proteína presente nas células dos pacientes. Dessa forma, nesse projeto buscava-se inicialmente a validação da possibilidade de realização do diagnóstico da síndrome XP-V com base na análise das mutações em sítios A:T dos genes variáveis das imunoglobulinas, partindo-se da hipótese inicial de que há uma correlação direta entre o nível da polimerase ativa com a quantidade de mutações em sítios A/T nesses genes.

A tabela 2 reúne as informações dos pacientes estudados neste projeto. O sequenciamento do gene *POLH*, assim como a análise das proteínas por Western Blotting, também foram realizados como controle para a validação dessa técnica como diagnóstico desses pacientes.

Tabela 2: Idade, tipo de mutação e padrão de Hipermutação Somática dos pacientes estudados neste projeto

Paciente	**Idade**	**Mutação†**	**Proporção mutações AT:GC (%)**	**Frequência de mutações***	**Presença de inserções/deleções**
AS968	32	c.672delA (p.Lys224AsnfsX5)	5,3 : 94,7	1,91	-
AS966	84	In frame V37 deletion	25,7 : 74,3	5,07	++
AS967	72	In frame V37 deletion	26,3 : 73,7	3,98	++
AS965	23	Codon stop	3,3 : 96,7	1,77	-
AS961	42	c.437dupA	6,6 : 93,4	2,66	+
Média população			50 : 50	1 - 2	-

† mutação encontrada no gene POLH em homozigos

* por 100 bp

Os experimentos comprovaram que os pacientes que possuem mutações que permitem a produção da proteína pol η, mesmo que em quantidades residuais (AS966 e AS967), exibem uma quantidade de mutações em sítios A/T superior (de 15 a 25%) aos pacientes que possuem mutações que levam à ausência completa da proteína (AS961, AS965 e AS968). A figura 44 mostra um WB para a proteína pol η exemplificando um paciente que contém uma pequena quantidade da proteína (AS966, aproximadamente 75% de mutações em G:C), assim como um paciente que não possui expressão de pol η (AS968, aproximadamente 95% de mutações em G:C), confirmando a correlação entre a presença da proteína e um aumento nas mutações em sítios A/T, uma vez que essa polimerase é a responsável pelas mutações em sítios A/T, e somente na sua ausência completa outra polimerase (κ) é recrutada e forma mutações em sítios G/C.

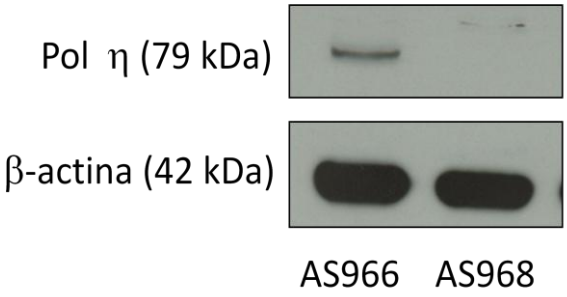


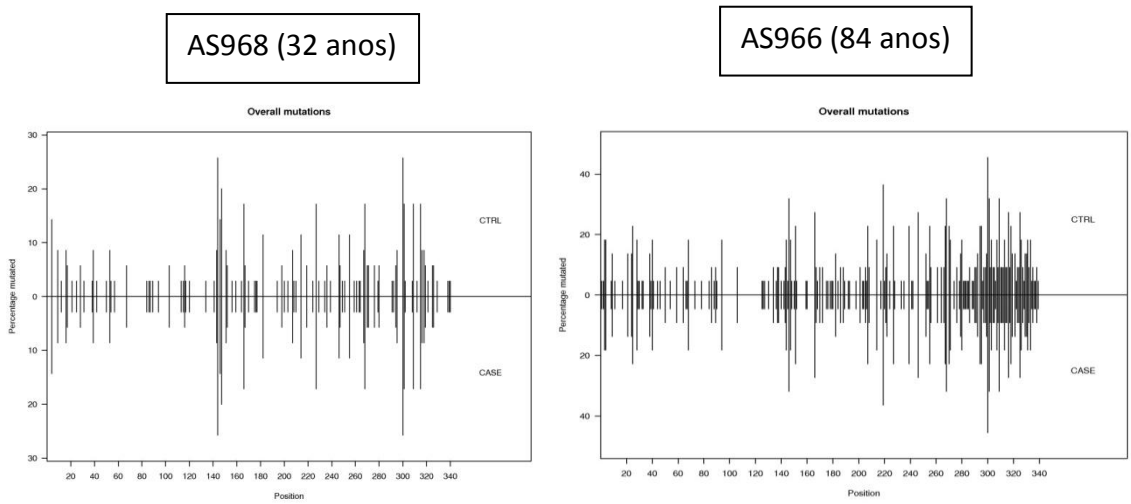
Figura 44: Análise da expressão da proteína pol η em fibroblastos primários de pacientes XP-V. Extratos das células indicadas foram utilizados para análise da presença da proteína pol η por WB.

Ensaios semelhantes estão sendo realizados com amostras dos pacientes XP-V brasileiros, após coleta de sangue realizada em novembro de 2103 em Araras (GO), para determinação da quantidade de pol η funcional das células dos pacientes, o que é interessante uma vez que a população dessa comunidade é composta por homozigotos de diferentes mutações, assim como por heterozigotos compostos e portadores, que nunca foram estudados anteriormente.

4.4.2 Análise dos tipos de mutações encontradas nas regiões sequenciadas

De forma surpreendente, o estudo das regiões amplificadas dos genes variáveis das imunoglobulinas para a análise das mutações demonstrou um padrão diferenciado entre os pacientes XP-V mais idosos em comparação aos mais jovens: a figura 45A mostra cada evento mutagênico representado por um traço ao longo da região amplificada; o comprimento do traço corresponde ao número de eventos no mesmo locus. Podemos observar que os pacientes mais idosos apresentam não só uma frequência de mutações mais elevada (superior a 4 mutações/100 bp), mas também a presença de grandes fragmentos de inserções e deleções, que não estão presentes ou estão presentes em menor quantidade e/ou tamanho nos pacientes mais jovens (Figura 46B, indicados por setas); vale lembrar que até o momento só haviam sido descritas como características do processo de SHM mutações pontuais, sendo raros os eventos de indels.

A



B

Figura 45: Aumento na frequência de mutações e na instabilidade genômica em pacientes XP-V idosos. A: Frequência e localização das mutações encontradas no fragmento amplificado (J_H-FR3) dos genes variáveis das imunoglobulinas. O comprimento dos traços verticais indica o número de eventos mutagênicos no mesmo locus. B: Regiões amplificadas de diversos clones após alinhamento com a sequência consenso, exemplificando os tipos de mutações encontrados nos pacientes jovens (mutações pontuais e pequenas indels) e nos idosos (grande frequência de indels de tamanhos variáveis, além de mutações pontuais).

Para determinar se o aumento da instabilidade genômica observado nos pacientes mais idosos é ligada somente à idade ou a um efeito combinado da ausência de pol η ao longo do tempo, foram analisadas amostras de controles idosos e jovens. A tabela 3 mostra as idades e as frequências de mutações (por cada 100 pares de bases) dos pacientes, assim como dos controles idosos e jovens, estudados neste projeto, lembrando que a frequência de mutações já descrita para os pacientes XP-V é a mesma que a da população em geral, que varia entre 1 e 2 eventos mutagênicos por 100 pares de bases (o que muda é o perfil das mutações).

Tabela 3: Idade e frequências de mutações das regiões J_H-FR3 dos genes variáveis das imunoglobulinas, dos pacientes e controles

Pacientes XP-V		Controles Idosos		Controles Jovens	
Idade	Frequência de mutações*	Idade	Frequências de mutações*	Idade	Frequência de mutações*
23	1,77	68	3,55	28	3,44
32	1,91	72	5	36	3,56
42	2,66	78	5,64	39	3,84
72	3,98	85	6,44	42	4,45
84	5,07				

* por 100 bp

A figura 46 mostra que de fato existe uma relação entre a idade dos indivíduos e a frequência de mutações nas regiões variáveis dos genes das imunoglobulinas: tanto nos pacientes XP-V como nos controles, existe um aumento na frequência de mutações em função da idade.

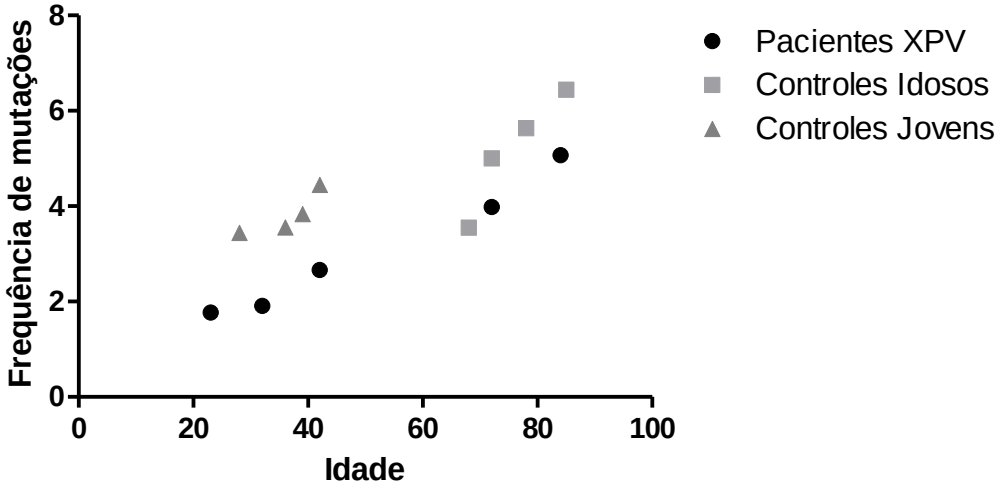


Figura 46: Aumento na frequência de mutações das regiões J_H-FR3 dos genes variáveis das imunoglobulinas em função da idade dos indivíduos. As frequências de mutações referem-se às mutações por 100 pares de bases.

Além do aumento da frequência de mutações, foi observado um aumento da instabilidade genômica associada à idade, ao menos nas regiões amplificadas. Como mostra a tabela 4, indivíduos mais idosos apresentam um maior número de inserções e deleções na região sequenciada, quando comparados com os indivíduos mais jovens (compare a porção rosa com as outras duas porções). Existe também uma diferença entre os pacientes XP-V idosos e os controles com idades semelhantes: nos pacientes idosos não só existem mais deleções e inserções, como também o tamanho dos fragmentos inseridos ou deletados é maior (compare a porção rosa com a verde). Os pacientes XP-V jovens não apresentam inserções ou deleções com mais de 10 nucleotídeos. Esses resultados não haviam sido descritos anteriormente, provavelmente pois nos estudos anteriores não foram utilizadas amostras de pacientes XP-V com idades tão avançadas.

Tabela 4: Características das mutações encontradas nas regiões J_H-FR3 dos genes variáveis das imunoglobulinas dos pacientes XP-V idosos e nos controles

	Ins/del pequenas†	Ins/del grandes†	Frequência de mutações*
J1	4	0	4,45
J2	1	2	3,56
J3	5	0	3,44
J4	4	0	3,84
O1	4	3	3,55
O2	3	0	5
O3	7	1	6,44
O4	6	1	5,64
AS967	9	5	3,98
AS966	9	4	5,1

Ins/del pequenas: < 10 nucleotídeos
Ins/del pequenas: > 10 nucleotídeos
† por clone (amplicon: 450 pares de bases)
* por 100 bp
J: controles jovens (25-45 anos)
O: controles idosos (65-85 anos)

5 DISCUSSÃO

5.1 Estresse oxidativo e homeostase celular

O surgimento do oxigênio ($^3\Sigma g$-O_2) na atmosfera terrestre há bilhões de anos, produzido gradualmente por organismos fotossintetizantes, possibilitou o desenvolvimento da vida na Terra como conhecemos hoje, através da formação da camada de ozônio (O_3) e do surgimento de seres vivos aeróbicos. O oxigênio, entretanto, é um agente oxidante, que, juntamente com outras espécies reativas, são capazes de reagir com diversas macromoléculas essenciais à vida, como os ácidos nucleicos (e ribonucléicos), as proteínas e os lipídeos das membranas celulares e mitocondriais, danificando-os de diferentes formas. Dessa forma, ao longo dos processos evolutivos, os organismos desenvolveram diversos sistemas antioxidantes para contrabalancear os efeitos negativos dessas espécies reativas, assim como vias responsáveis pelo reparo que esses agentes causam nos componentes celulares.

As Espécies Reativas de Oxigênio (ERO) não são somente deletérias: diversos organismos desenvolveram mecanismos enzimáticos para síntese e utilização de agentes oxidantes, por exemplo na defesa contra microorganismos através da produção de EROs por neutrófilos e monócitos (Lambeth, 2004), e na sinalização de diversos processos como o controle do tônus muscular, do ritmo respiratório e do equilíbrio do estado redox das células (Dröge, 2002). A maior fonte de geração de ERO intracelular, entretanto, é a mitocôndria, durante o processo de respiração (Turrens, 2003). O estado conhecido como estresse redox ocorre quando há uma produção em excesso de ERO, ou quando a célula é exposta a agentes oxidantes, que supera suas defesas antioxidantes; o excedente de ERO causa diversos danos às biomoléculas, levando consequências deletérias para a célula e para o organismo como um todo (Wang et al, 2013).

Dentre as consequências celulares do estresse oxidativo estão os danos à estrutura do DNA, às proteínas e às membranas celulares (Marnett, 2002). A peroxidação de lipídeos das membranas por ERO leva à diminuição da fluidez e aumento da permeabilidade das membranas, causa danos às proteínas integrais e leva à propagação das reações oxidativas, através da sua decomposição em produtos

tóxicos, como aldeídos bifuncionais (Cejas et al, 2004). Essa propagação tem sido associada à carcinogênese, doenças neurodegenerativas, doenças inflamatórias e auto-imunes (Bartsch e Nair, 2004; Valko et al, 2007), principalmente pela formação de adutos entre esses aldeídos e proteínas, que levam à modificação das suas funções (Pizzimenti et al, 2013). Também podem ocorrer danos nas mitocôndrias, como em suas enzimas da matriz e componentes da cadeia de transporte de elétrons (Victor et al, 2005), além do DNA mitocondrial; de fato existem cada vez mais evidências de doenças humanas cuja patologia está associada ao consequente acúmulo de danos no mtDNA, como alguns tipos de câncer e doenças degenerativas (Costa et al, 2011).

As ERO danificam o DNA através de diversos mecanismos, tanto na base nitrogenada quanto na desoxirribose, levando à formação de vários tipos de bases oxidadas, que, se não reparadas, levam à mutagênese e à instabilidade genética, participando assim do processo carcinogênico (Hanahan e Weinberg, 2011). Além das bases oxidadas "individuais", algumas ERO podem levar à formação de lesões em tandem (Cadet et al, 2012) ou em *cluster* (Sage e Harrison, 2011); essas lesões complexas são capazes de interferir nos processos de replicação e transcrição, sendo portanto mais citotóxicas do que as bases oxidadas individuais (Evans et al, 2004).

5.1.1 Estresse oxidativo e doenças neurológicas em pacientes com síndromes associadas a deficiências em reparo

Os efeitos deletérios das lesões do tipo bases oxidadas "individuais", como por exemplo a 8-hidroxi-2´-desoxiguanosina (8-OHdG ou 8-oxodG), estão ligados principalmente à processos mutagênicos, uma vez que essas lesões não causam distorções importantes na estrutura do DNA, levando a uma parada apenas transiente da RNA polimerase II (Tornaletti et al, 2004; Kathe et al, 2004; Larsen et al, 2004), mas que pode ser influenciada por outras variáveis como a concentração de ATP ou a sequência na qual a lesão está inserida (Allgayer et al, 2013). Entretanto, as lesões complexas formadas por estresse oxidativo após exposição a agentes genotóxicos como a radiação ionizante (IR) (Georgakilas et al, 2013), ou mesmo durante o metabolismo celular normal (Bennett et al, 2004), são capazes de causar distorções

significativas na dupla hélice e consequentemente levar à parada da transcrição pelo bloqueio da RNA polimerase (Brooks et al, 2000).

Inicialmente, acreditava-se que as lesões induzidas no DNA por estresse oxidativo seriam reparadas exclusivamente pela via de Reparo por Excisão de Base (BER); entretanto, após a identificação de lesões complexas que também são formadas em situações de estresse oxidativo, estas sim altamente distorsivas, foi descrita a participação de outra via, o Reparo por Excisão de Nucleotídeos (NER), no reparo do grande espectro de lesões induzidas por estresse oxidativo (Berquist e Wilson, 2012). Além dessas lesões serem substrato direto de NER, outra forma de participação de NER no reparo de lesões oxidadas é através do papel regulatório de algumas proteínas de NER sobre proteínas de BER: já foram descritas interações entre proteínas de NER e diversas glicosilases, que são responsáveis pelo aumento da atividade das últimas (Klungland et al, 1999; D'Errico et al, 2006; Muftuoglu et al, 2009; Aamann et al, 2014).

Ao contrário da alta incidência de tumores de pele nos pacientes portadores de deficiências em NER, facilmente explicável pela deficiência desses pacientes no reparo das lesões induzidas pela luz UV, algumas das manifestações clínicas desses pacientes, como os graves sintomas neurológicos presentes nos pacientes XP com comprometimento neurológico, CS, XP/CS e TTD, não podem ser explicados pela exposição desses pacientes à irradiação com luz UV (Kraemer et al, 2007). A hipótese inicial seria de que pacientes XP e XP/CS teriam uma deficiência no reparo acoplado à transcrição (TCR) de lesões oxidadas como a 8-oxodG (Cooper et al, 1997), entretanto o artigo que publicou a TCR de 8-oxodG foi retratado em 2005, por suspeita de fraudo nos resultados (Check 2005; Cooper et al, 2005; Le Page et al, 2005); atualmente o TCR de 8-oxodG ainda é motivo de debate na comunidade científica.

Assim, surgiu uma nova hipótese de que lesões distorsivas, formadas por processos endógenos de estresse oxidativo, seriam as responsáveis pelas patologias neurológicas desses pacientes (Brooks, 2007). Vale lembrar que os sintomas neurológicos que atingem de 25 a 30% dos pacientes XP, pertencentes aos grupos de complementação XP-A, -B, -D e -G (Kraemer et al, 1987) estão associados a uma degeneração progressiva dos neurônios, levando à atrofia do córtex e ao aumento da espessura do osso do crânio (Rapin et al, 2000), enquanto a disfunção neurológica

progressiva dos pacientes CS é resultante de um processo patológico diferente, ligado primariamente à desmielinização (ou hipomielinização), que ocorre desde o início do desenvolvimento (Koob et al, 2010).

Diversos artigos descreveram a participação de proteínas do NER no reparo de danos causados por estresse oxidativo no DNA, seja através da interação com proteínas de BER, seja através do reparo de lesões distorsivas/complexas, ou de intermediários de BER, pela via de NER. Fibroblastos deficientes em XPC apresentaram sensibilidade ao tratamento com agentes oxidantes (D'Errico et al, 2006; Berra et al, 2013), assim como células XPA (Berra et al, 2013), CSA e CSB (De Waard et al, 2004; D'Errico et al, 2007; Nardo et al, 2009) e XP-G/CS (Soltys et al, 2013).

Dessa forma, a partir dos indícios da participação de diversas proteínas de NER no reparo de lesões causadas por estresse oxidativo, o objetivo inicial deste trabalho foi o de estudar a participação da proteína XPD na resposta das células humanas frente ao estresse oxidativo, no sentido de melhor compreender os mecanismos que levam às diferenças fenotípicas dos pacientes XP-D, XP-D/CS e TTD/XPD.

5.1.2 Sensibilidade das células deficientes em XPD frente ao estresse oxidativo

O MB é um fotossensibilizador fenotiazínico utilizado em terapias fotodinâmicas principalmente no tratamento de alguns tipos de tumores superficiais (Wainwright et al, 1997). Pela sua característica hidrofílica, o MB é facilmente incorporado pelas células (Blazquez-Castro et al, 2009), onde ele pode ser encontrado em diferentes compartimentos celulares dependendo da concentração utilizada no tratamento, sendo que a quantidade de MB detectada no núcleo , onde ele se liga ao DNA de diversas formas (Rohs et al, 2000), aumenta depois da fotoativação (Mellish et al, 2002). Após absorção no comprimento de onda do vermelho (665 nm), a fotoativação do MB, que nas concentrações utilizadas neste trabalho (4 e 8 μM) encontra-se majoritariamente em sua forma monomérica, leva à formação de grandes quantidades de oxigênio singlete ($^1O_2$), com subsequente formação de um grande número de lesões do tipo 8-oxo-G no DNA (Boiteux et al 1992). A metodologia utilizada neste trabalho foi a mesma padronizada durante a tese de doutorado da Dra. Carolina

Maria Berra, que é comprovadamente capaz de levar à absorção do MB pelos fibroblastos humanos, e de gerar $^1O_2$ no núcleo dessas células, medido através da emissão desse composto no infra-vermelho próximo (aproximadamente 1270 nm) (Berra et al, 2013).

A linhagem XP-D utilizada neste trabalho (XP6BE) possui mutações diferentes em cada alelo: um alelo nulo que possui uma deleção de 78 nucleotídeos no exon 3, levando à perda de aproximadamente 30 aminoácidos (del36→61), e outro alelo com uma substituição de uma arginina para triptofano no códon 683 (R683W), causada por uma transversão C→T no nucleotídeo 2047 (Takayama et al, 1995). Os resultados dos trabalhos dos três grupos que resolveram a estrutura cristalográfica da proteína XPD de três diferentes Arquéias homólogas à proteína humana (Fan et al, 2008; Liu et al, 2008; Wolski et al, 2008) permitem predizer as atividades da proteína XPD produzida por esse paciente, que tem a atividade de helicase comprometida, ligada à alterações no sítio de interação com p44, à diminuição da afinidade por ssDNA e à perda de aproximadamente 80% da capacidade de hidrólise de ATP.

A linhagem XP-D/CS utilizada (XPCS2) apresenta somente um alelo funcional do gene *XPD*, que carrega uma substituição G→A no nucleotídeo 1805, resultando na mudança do aminoácido glicina para aspartato no códon 602 (G602D) na proteína (Takayama et al, 1995). De acordo com os estudos de cristalografia, a substituição da glicina, que é um aminoácido que confere flexibilidade às cadeias peptídicas por não possuir cadeias laterais, por um aspartato, leva a uma diminuição da afinidade pelo DNA por causa da adição da carga negativa desse aminoácido na região HD1-HD2, assim com a uma perda da flexibilidade da proteína, impedindo mudanças conformais importantes para a funcionalidade da proteína, assim como para a interação com outras proteínas do complexo TFIIH; além disso, essa proteína mutada também apresenta uma redução na atividade de helicase. É interessante notar que, das quatro mutações em *XPD* que levam ao fenótipo XP/CS (G47R, G602D, R666W e G675R), três são substituições de glicinas por outros aminoácidos menos flexíveis (Liu et al, 2008).

A linhagem TTD estudada (TTD2VI) possui uma substituição de arginina para prolina em homozigose no códon 592 (R592P) (Nishiwaki et al, 2004). Essa proteína

não possui redução na atividade de helicase, porém essa substituição (que também está situada na porção C-terminal (região de interação com p44) leva a uma grande desestabilização das interações da proteína XPD com os outros componentes do complexo TFIIH. Através desses estudos cristalográficos, pode-se fazer uma predição do impacto das mutações que levam aos fenótipos XP, XP/CS e TTD na funcionalidade da proteína: de forma geral, mutações XP alteram a capacidade de ligação com ATP e DNA, diminuindo sua atividade de helicase; as do tipo XP/CS alterariam a capacidade de mudanças conformacionais, e as do tipo TTD, a estabilidade dos domínios da proteína, além de sua capacidade de interação com os outros componentes do complexo TFIIH (Fan et al, 2008). Pode-se dizer que, em geral, as mutações dos dois últimos tipos levam a fenótipos clínicos mais graves, que na maioria das vezes atingem os pacientes desde o início do desenvolvimento.

Através de diversos experimentos, identificamos uma elevada sensibilidade dos fibroblastos humanos com diferentes deficiências na proteína XPD ao estresse oxidativo induzido pelo tratamento com MB fotoativado. Houve pequenas diferenças na sensibilidade entre as três linhagens, sendo que a TTD/XPD se mostrou sempre a mais sensível (com menos de 10% de sobrevivência na dose mais alta de MB), seguido da XP-D (10-20% de sobrevivência) e da XP-D/CS (20-40%). Essa sensibilidade é significativamente maior do que os fibroblastos normais, e, em concordância com diversos trabalhos anteriores, só ocorre após a fotoativação do MB (Wainwright et al, 1997; Blazquez-Castro et al, 2009; Berra et al 2013; Soltys et al , 2013).

O aumento da sensibilidade também foi mostrado após tratamento com outro agente oxidante, o Bromato de Potássio ($KBrO_3$), que também leva à formação de bases oxidadas porém através de um mecanismo diferente do MB fotoativado (Ballmaier e Epe, 2006; Kawanishi e Murata, 2006), mostrando que a sensibilidade dessas células não deve ser exclusiva ao MB fotoativado, mas sim uma resposta comum ao estresse oxidativo em geral. Células primárias mutadas em *XPD* também se mostraram mais sensíveis ao tratamento com MB fotoativado, porém essa sensibilidade é menos acentuada que nos fibroblastos transformados. Sabe-se que a transformação com o antígeno *Large T* do vírus SV40 ocorre principalmente pela interação dessa oncoproteína viral com os supressores de tumor p53 e pRb, inativando

suas funções (Pipas, 2009); com os controles de *checkpoint* do ciclo celular atenuados pela ausência da ação dessas duas proteínas, pode-se esperar que as células transformadas ativem mecanismos de morte celular com mais facilidade do que as células primárias, que conseguem ativar corretamente seus controles do ciclo e assim reparar as lesões ao invés de entrarem em apoptose. É importante destacar também que a sensibilidade dessas células ao tratamento com MB ativado foi corrigida por complementação com a transfecção de um vetor de expressão com o gene *XPD*, confirmando o papel da proteína XPD no processo que garante a resistência ao tratamento.

A deficiência no reparo de fotoprodutos em células XP-D, XP-D/CS e TTD/XPD já foi descrita (Fujimoto et al, 2005; Nishiwaki et al, 2008), assim como um aumento na sensibilidade ao quimioterápico doxorrubicina (Saffi et al, 2010); Arlett et al (2008) não encontraram sensibilidade ao tratamento com IR em fibroblastos XP ou XP/CS de diversos grupos de complementação, entretanto as células CS são sensíveis a esse tratamento (Cramers et al, 2011). Células CS com mutações em *CSA* e *CSB* são reconhecidamente sensíveis ao estresse oxidativo (Tuo et al, 2003; Spivak e Hanawalt, 2006; D'Errico et al, 2007), provavelmente pela importância dessas proteínas não só no reparo do DNA nuclear mas também na manutenção da integridade mitocondrial (Osenbroch et al, 2009). Em relação a tratamentos oxidantes em células com mutações em *XPD*, já foi descrito um aumento na sensibilidade de células linfoblastóides humanas XP-D (e XP-B) ao tratamento com peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (Gopalakrishnan et al, 2010). Do nosso conhecimento, essa é a primeira descrição do aumento da sensibilidade de células XP-D/CS ou TTD/XPD a tratamentos oxidantes.

Após o tratamento com MB fotoativado, detectamos um bloqueio no ciclo celular em fase G2/M nas três linhagens com mutações em *XPD*, mesmo após 48 horas do tratamento, período após o qual os fibroblastos proficientes já haviam retornado ao seu perfil normal do ciclo celular, indicando a presença de danos não-reparados no genoma dessas células. É interessante notar que tanto as células transformadas quando as primárias mostraram o bloqueio na mesma fase do ciclo. Esses resultados estão de acordo com diversos outros trabalhos que também detectaram bloqueio em G2/M em células mutadas em *XPD* após tratamento com doxorrubicina (Saffi et al,

2010), assim como em fibroblastos XP-A, XP-C (Berra et al, 2013) e XP-G/CS (Soltys et al, 2013) após tratamento similar ao deste trabalho. A transição G2/M é controlada por diversas vias de sinalização de *checkpoint*, essenciais para que a mitose ocorra de forma adequada, e verificou-se que diversos compostos que induzem estresse oxidativo levam a um bloqueio do ciclo celular na fase G2/M (Burhans e Heintz, 2009), em um fenômeno que talvez esteja ligado ao fato de que uma grande parte das proteínas que controlam o checkpoint em G2/M possuem sítios responsivos ao estado redox da célula (Conour et al, 2004).

É interessante notar também o grande aumento na população poliplóide (quantidade de DNA > 4n) nas células XP-D após tratamento com MB fotoativado, principalmente nas maiores concentrações utilizadas. Esses resultados talvez estejam ligados à participação da proteína XPD em outro complexo que não o TFIIH, o MMXD (composto pelas proteínas MMS19, XPD, MIP18, Ciao1 e ANT2), que se localiza no fuso mitótico e é importante para a correta formação e segregação dos fusos (Ito et al, 2010); esse trabalho descreveu a formação de núcleos aberrantes por causa de deficiências na segregação correta dos cromossomos, tanto em células XP-D quanto em XP-D/CS. Gopalakrishnan et al (2010), utilizando células linfoblastóides humanas, também detectou anomalias cromossômicas assim como uma grande quantidade de danos no DNA em regiões teloméricas em células XP-D após tratamento com H_2O_2, sugerindo um papel importante dessa proteína na manutenção da integridade genômica em condições de estresse oxidativo.

Em concordância com a parada no ciclo celular, a marcação da histona H2AX fosforilada (γ-H2AX) também se manteve alta mesmo após 48 horas de tratamento com MB fotoativado, o que não foi observado nos fibroblastos normais, nos quais essa marcação já havia retornado aos níveis iniciais 24 horas após o tratamento. A fosforilação dessa histona na serina 139 pelas quinases da família PI3K (ATM, ATR ou DNA-PKcs) foi utilizada durante muito tempo como marcador de quebras na fita dupla do DNA (DSBs), como observa-se por exemplo após tratamento com IR; atualmente, entretanto, essa marcação é aceita como indicativo da presença de diversos tipos de dano no DNA, servindo para o recrutamento de proteínas de *checkpoint* do ciclo celular, reparo e apoptose, sendo assim importante na manutenção da integridade do

genoma (Lukas et al, 2011). Nossos resultados de ciclo celular e marcação de γ-H2AX indicam a presença de danos não reparados no genoma das células deficientes em XPD após tratamento com MB fotoativado, mostrando que essa proteína é essencial para o reparo das lesões formadas por estresse oxidativo, mas que as deficiências em XPD não impedem a sinalização em resposta aos danos, ao contrário do que ocorre em fibroblastos deficientes em XPF (Mogi e Oh, 2006).

5.1.3 Diferenças entre os mecanismos de morte celular entre as células deficientes em XPD frente ao estresse oxidativo

Além da análise do ciclo celular, a marcação com o Iodeto de Propídeo (PI), um intercalante da fita dupla de DNA, permite a detecção da população em SubG1, ou seja, com um conteúdo de DNA menor do que células em fase G1 (< 2n). Essa fragmentação do DNA ocorre durante o processo de morte celular por apoptose, que é um processo que envolve a ação regulada de enzimas catabólicas (proteases e nucleases), e leva a mudanças características na morfologia nuclear, como a condensação e fragmentação da cromatina, com a formação de fragmentos de DNA de múltiplos de aproximadamente 200 bp (Kroemer et al, 1998). Em concordância com os ensaios de sensibilidade, os experimentos de citometria de fluxo detectaram um aumento na população em Sub-G1 nas células deficientes em XPD 72 horas após tratamento com MB fotoativado ou $KBrO_3$, o que não ocorre nos fibroblastos normais.

A apoptose também é caracterizada pela ativação de caspases, que são cisteína-proteases que clivam as proteínas e levam à sua degradação. As caspases apoptogênicas (2, 3, 6, 7, 8, 9 e 10) podem ser divididas entre caspases ativadoras (2, 8, 9 e 10), cuja função é ativar as caspases efetoras (3, 6 e 7) que são as responsáveis pelos eventos proteolíticos característicos da apoptose (Thornberry, 1998). As caspases efetoras são responsáveis por uma série de eventos irreversíveis no interior das células, como a clivagem de proteínas essenciais para a integridade do citoesqueleto (como a actina) ou do DNA (como PARP, TOP-1 e ICAD, inibidor da DNAse ativada por caspases, CAD), levando à morte celular (Ryter et al, 2007). Durante a apoptose ocorrem também mudanças na membrana plasmática que levam à exposição de resíduos de fosfatidilserina (Ptd-Ser), o que é um sinal para

reconhecimento e eliminação das células apoptóticas pelas células vizinhas ou por fagócitos profissionais, antes que a ocorra o rompimento da membrana celular e o extravasamento dos conteúdos celulares para o meio extracelular, o que poderia levar a uma reação inflamatória, como é o caso da morte por necrose (Ravichandran e Lorenz, 2007). Assim como os experimentos de detecção da população em Sub-G1, os ensaios de detecção de caspase 3 ativada mostraram um aumento dessa marcação em todas as linhagens deficientes em XPD 72 horas após tratamento com MB fotoativado, em uma extensão muito maior do que nos fibroblastos normais.

Outro experimento que permite detectar o mecanismos de morte celular é a coloração com três corantes fluorescentes; o DAF é um corante verde de citoplasma, e há dois corantes de DNA, o Hoechst, em corante supravital capaz de ser incorporado por células vivas (ou em apoptose inicial), e o PI, que só é incorporado por células mortas por necrose ou com a membrana já permeabilizada (apoptose tardia). Assim, de acordo com a incorporação dos corantes, assim como a morfologia das células, pode-se distinguir entre morte por apoptose (incorporação do Hoechst, condensação nuclear, formação de *blebs*) ou necrose (incorporação de PI, tamanho aumentado). Os experimentos utilizando a coloração simultânea com esses três corantes mostrou um grande predomínio de morte por necrose nas células XP-D/CS e TTD/XPD após tratamento com MB fotoativado, em ambas as concentrações utilizadas, assim como ao longo de todo o tempo em que as células foram acompanhadas. Esses resultados parecem contraditórios com os dos experimentos de detecção da população em Sub G1 e da ativação de caspase 3 por citometria, ambos indicativos da ativação de mecanismos de apoptose por todas as linhagens estudadas.

A morte por necrose pode ser morfologicamente caracterizada por um grande aumento do conteúdo citoplasmático (*oncosis*) e da matriz mitocondrial, que ocorrem logo antes do rompimento da membrana celular; esse tipo de morte foi durante anos caracterizado como um mecanismo não programado, quase “acidental”, que ocorreria em resposta a insultos fisicoquímicos, ao contrário da apoptose, que sempre foi conhecida como “morte celular programada”, e há anos esteve associada à homeostase dos organismos e a processos como a metamorfose de insetos e anfíbios (Vandenabeele et al, 2010). Entretanto, desde o trabalho de Chen et al (2003),

começaram a ser descritos diversos mecanismos de necrose regulada, vias de morte celular geneticamente controladas que levam ao extravasamento de conteúdos intracelulares, e são morfologicamente caracterizados por granulação do citoplasma e oncose de organelas e da célula como um todo. Atualmente foram descritas diversas vias de necrose regulada que apresentam em comum essas características, mas que diferem em seus mecanismos de iniciação assim como nas moléculas sinalizadoras e efetoras do processo, como a necroptose, o partanatos, oxitose, ferroptose, ETose, NETose, pironecrose e piroptose (Berghe et al, 2014); existe também uma via de necrose denominada *autoschizis*, que apresenta morfologicamente algumas características de apoptose como fragmentação nuclear e formação de *blebs* citoplasmáticos (Jamison et al, 2002).

Tanto a via extrínseca da apoptose quando a necroptose podem ser iniciadas pela ativação de receptores de morte da família receptores de TNF (*Tumor Necrosis Factor*), como os TNF-R1 e 2 ou Fas após ligação com TNF-α ou FasL (ligante de Fas), respectivamente (Fayaz et al, 2014). Após a ligação de TNF ao receptor, há a formação de um complexo ligado ao TNFR1 denominado complexo I (composto por RIPK1 – *Receptor Interacting Protein Kinase* 1 - e TRADD – *TNFR1-Associated Death Domain*), responsável pela ativação de NF-κB (*Nuclear Factor-κB*), que aumenta a transcrição de diversos genes anti-apoptóticos; existe também um complexo denominado complexo IIa, dependente de TRADD, que é formado por FADD (*Fas-Associated Death Domain*), RIPK3, FLIPs (*Flice-Like Inhibitory Protein*) e pró-caspase 8 (Wu et al, 2012). Os homodímeros da pró-caspase 8 sofrem autoproteólise resultando na sua ativação e dissociação do complexo IIa, permitindo a ativação das caspases efetoras 3 e 7, que irão dar continuidade ao processo apoptótico.

Entretanto, quando há uma inibição da caspase 8, RIPK1 e RIPK3 se associam, são ativados por auto- e transfosforilação, e se agregam em complexos denominados necrossomos. A fosforilação de RIPK3 leva ao recrutamento de MLKL (*Mixed Lineage Kinase Domain-Like*), que também é fosforilada por RIPK3, levando à ativação de uma série de JUN quinases (JNKs), produção de EROs (em grande parte pelas mitocôndrias) e indução de necroptose. Entretanto, quando cIAPs (*cellular Inhibitor of Apoptosis Proteins*) são degradadas ocorre uma cascata de sinalização um pouco diferente,

através da mudança da ativação canônica para não-canônica de NF-κB; essa mudança leva à formação de um complexo dependente de RIPK1 denominado complexo IIb ou ripoptossomo. O complexo IIb pode induzir tanto apoptose quanto necroptose, dependendo da presença ou ausência da caspase 8 (Galluzi et al, 2014).

Dessa forma, é possível que o processo de morte celular que ocorra nas células XP-D/CS e TTD/XPD seja algum tipo de necrose regulada, como a necroptose, se essas células possuírem algum tipo de deficiência no processo apoptótico, como por exemplo na ativação da pró-caspase 8, que é uma das proteínas reguladoras da escolha entre as duas vias. Alguns domínios da proteína XPD já foram descritos como essenciais para o processo apoptótico após danos causados por irradiação UV, sendo que esses domínios estão mutados em células TTD/XPD, tornando assim as células XP-D mais sensíveis à morte por apoptose (Queille et al, 2001). Um trabalho mais recente mostrou que a proteína XPD se colocaliza com foci de γ-H2AX em regiões de DSBs geradas por triplexes de DNA, e que a fosforilação de H2AX no resíduo de tirosina 142 foi capaz de estimular a apoptose, em um mecanismo dependente de XPD, mostrando um papel dessa proteína na proteção da instabilidade genômica induzida por estruturas não-canônicas de DNA (Tiwari e Rogers, 2013).

No caso das células XP-D/CS e TTD/XPD possuírem alguma deficiência no processo apoptótico (em especial na ativação da caspase 8), devido ou não às mutações em XPD, é possível que elas estejam ativando outras vias de morte, como a necroptose, ou mesmo que haja uma coexistência entre mais de uma via, uma vez que foi detectada a ativação de caspase 3 nessas duas linhagens, o que nunca foi descrito como estando relacionado a alguma forma de necrose regulada. De qualquer forma, está claro que há uma grande diferença entre os mecanismos de morte entre as células XP-D e as células XP-D/CS e TTD/XPD.

É possível que essa diferença esteja ligada aos fenótipos dos pacientes XP-D, XP-D/CS e TTD; alguns dos pacientes XP-D apresentam sintomas neurológicos ligados à neurodegeneração que aparecem mais tardiamente ao longo da vida desses pacientes, enquanto os portadores de XP-D/CS e TTD apresentam sintomas neurológicos mais graves, desde o início da infância ou mesmo durante a gestação, caracterizados por

uma desmielinização que é uma doença mais ligada a falhas no desenvolvimento, e não de degeneração. Essa presença acentuada de necrose detectada nos fibroblastos após danos genotóxicos causados por estresse oxidativo, indicando processos diferentes do apoptótico, pode ocorrer também nas células do sistema nervoso central (CNS, de *Central Nervous System*), como as células da glia ou as células-tronco do CNS, durante exposição a EROs de origem endógena. O mecanismo de necroptose já foi associado a diversas patologias, como em doenças neurodegenerativas como Huntington, Parkinson e Alzheimer (Lin e Beal, 2006), ou após danos causados por isquemia/reperfusão; de fato, diversos trabalhos descreveram que o uso de inibidores específicos de diversos fatores da necroptose, como RIPK1 ou RIPK3, é capaz de levar a uma melhoria nos fenótipos de diversas doenças neurodegenerativas (Yuan et al, 2003). Dessa forma, seria interessante estudar se existe de fato um envolvimento desses mecanismos nas patologias de CS e TTD, uma vez que inibidores dessas vias, ou mesmo da sua inflamação associada, poderiam levar a uma melhora no fenótipo desses pacientes.

5.1.4 Interações entre as vias de BER e NER no reparo de lesões causadas por estresse oxidativo

Neste trabalho também realizamos experimentos na tentativa de buscar possíveis interações entre as vias de BER e NER no reparo das lesões causadas por estresse oxidativo. De fato, diversos trabalhos já descreveram interações entre essas duas vias através do estímulo da atividade de glicosilases de BER por proteínas de NER, como já mencionado anteriormente (Klungland et al, 1999; D'Errico et al, 2006; Muftuoglu et al, 2009; Aamann et al, 2014).

Além disso, outros estudos mostraram a participação de diversas proteínas de NER no reparo de lesão causadas por estresse oxidativo (De Waard et al, 2004; D'Errico et al, 2006; Spivak e Hanawalt, 2006; D'Errico et al, 2007; Nardo et al, 2009; Berra et al, 2013; Soltys et al, 2013), que não necessariamente estão relacionados a uma interação entre uma proteína de NER e uma glicosilase: por exemplo, segundo Parlanti et al (2012), a participação da proteína XPA no reparo desse tipo de lesões não está ligada a interação com nenhuma glicosilase, talvez porque as principais lesões

responsáveis pela toxicidade do tratamento com agentes oxidantes não sejam as bases individuais (substratos principais de BER), mas sim os danos complexos como ciclopurinas, quebras ou até ligações cruzadas entre DNA e proteínas (substratos de outras vias de reparo, como NER, HR, NHEJ ou reparo de ICLs). Nesse mesmo trabalho, os autores não encontraram diminuição na viabilidade celular após estresse oxidativo associado ao silenciamento de OGG1 nas células XP-A ou CS-B, e concluíram que todas essas proteínas fazem parte de uma mesma via de reparo, iniciada por OGG1, e que tem como cofatores algumas proteínas de NER.

O reparo dessas lesões, que conta com interações de proteínas de duas vias distintas, pode ser responsável pelo reparo do genoma como um todo, ou somente dos genes transcricionalmente ativos, em uma espécie de TCR da via de BER: a glicosilase NEIL2 foi encontrada associada à RNA polimerase II em regiões onde havia presença de bases oxidadas, e não foi encontrada em genes inativos (Banerjee et al, 2010). Outro trabalho, utilizando uma nova metodologia (*Comet-FISH assay*), demonstraram que existe de fato um mecanismo de TCR de 8-oxoG, e que o reparo preferencial dessa lesão na fita transcricionalmente ativa é dependente tanto de proteínas de BER (OGG1) quanto de NER (XPA, CSB e UVSSA)(Guo et al, 2013).

Uma das estratégias utilizadas foi o uso de um inibidor de PARP, a 3-Aminobenzamida, $C_7H_8N_2O$ (3-Ab); a estrutura da 3-Ab é muito semelhante à do NAD^+, e sua atividade como inibidor se dá por competição com NAD^+ pela ligação à PARP, essencial para o funcionamento da enzima. PARP1 é uma proteína nuclear que tem afinidade por regiões de SSBs e DSBs, e é ativado na presença de diversos tipos de danos; essa ativação se dá pelo recrutamento de PARP1 para as regiões de DNA danificado, o que causa um grande aumento na sua atividade catalítica, possibilitando a síntese de longos polímeros de PAR (poli-ADP ribose), que são ligados a diversas proteínas, incluindo a própria PARP, modificando as funções das proteínas PARiladas (Rouleau et al, 2010). Sua ativação é necessária para o reparo de SSBs por BER através do recrutamento da proteína XRCC1, proteína responsável pela montagem e ativação da maquinaria de BER (El-Khamisy et al, 2003); PARP1 também participa do reparo de DSBs pelas vias de HR, através do recrutamento de ATR e do complexo MRE1 na presença de DSBs (Haince et al, 2008), e de NHEJ (Wang et al, 2006; Patel et al 2011).

De fato, diversos inibidores de PARP têm sido testados na clínica, inclusive já em testes clínicos de fase II, para terapia contra diversos tipos de câncer, em combinação com diferentes agentes quimioterápicos, pelo poder dos inibidores de PARP de aumentar a sensibilidade das células tumorais aos agentes quimioterápicos convencionais (O'Sullivan et al, 2014).

Nossos experimentos mostraram que a inibição de PARP foi capaz de causar um aumento da sensibilidade ao tratamento nas células MRC5, apesar de um aumento moderado na sensibilidade das outras linhagens. A linhagem normal MRC5, que apresenta sensibilidade ao tratamento com MB fotoativado apenas na presença desse inibidor, pode indicar que PARP participa do reparo das lesões induzidas por esse tratamento, provavelmente através da ativação de BER, embora não se possa excluir a possibilidade da participação das vias de reparo de quebras, uma vez que esse tratamento também pode levar à formação de quebras, como detectado pelos ensaios de cometa. Em relação às linhagens deficientes em XPD é possível que a sensibilidade dessas células já seja tão grande nas concentrações de MB utilizadas, que não esteja ocorrendo um efeito sinérgico da inibição de mais uma via; é possível também que o menor efeito do 3-Ab nessas células seja uma indicação de que a participação de PARP no reparo dessas lesões dependa da atividade da proteína XPD.

Utilizamos também uma outra estratégia para interferir na via de BER, através do uso de RNA de interferência (siRNA) para diminuir a expressão de genes dessa via, no caso a glicosilase OGG1 e a DNA polimerase pol β. Nossos resultados mostraram que não houve grande diferença na viabilidade das células após o tratamento com MB fotoativado na presença de ambos os siRNAs, em nenhuma das linhagens.

Em relação ao siPOLB, é possível que a ausência de fenótipo detectável por experimentos de viabilidade seja devido à possibilidade de realização de BER mesmo na ausência dessa proteína, através da via longa de BER, que também pode utilizar a DNA polimerase δ. No caso da OGG1, a ausência de efeito do silenciamento na sobrevivência pode ser explicada pela grande redundância que existe entre as glicosilases: a OGG1 é a principal glicosilase envolvida na excisão de 8-oxoG e FapyG (Dizdaroglu, 2005), entretanto outra glicosilase, MYH (homóloga em *Homo sapiens* da MutY de *E. coli*) também participa do reparo de 8-oxoG, através da excisão da adenina erroneamente incorporada frente a 8-oxoG após a replicação, evitando assim os

efeitos mutagênicos dessa lesão (Hazra et al, 2001); em relação à FapyG, pelo menos outras duas glicosilases, NEIL1 e NEIL3, também são capazes de realizar sua excisão (Wallace, 2013). O camundongo nocaute para OGG1 ($OGG1^{-/-}$) é viável e não apresenta nenhum fenótipo ao longo da vida, e apesar de apresentar um aumento nas taxas de mutagênese espontânea e de acumular grandes quantidades de 8-oxo no DNA mitocondrial, não desenvolve tumores (Klungand et al, 1999; De Souza-Pinto et al, 2001). Entretanto, na presença de estresse oxidativo, esse camundongo apresenta um fenótipo significativamente pior do que os animais selvagens: por exemplo, após isquemia/reperfusão, os camundongos $OGG1^{-/-}$ apresentaram quantidades muito maiores de danos do tipo bases oxidadas em diversas regiões do cérebro, e apresentaram uma recuperação muito mais lenta (Liu et al, 2011). Talvez seja possível detectar um fenótipo do silenciamento de *OGG1* e *POLB* após tratamento com MB fotoativado através de outros experimentos que não os de viabilidade, como por exemplo por HCR.

5.1.5 Capacidade de reparo e/ou retomada da transcrição após danos genotóxicos causados por estresse oxidativo das células com mutações em *XPD*

Para estudar o papel dos danos ao DNA na sensibilidade das células com mutações em *XPD* ao tratamento com MB fotoativado foram realizados ensaios de HCR, que permite a análise do papel do reparo nuclear aos danos ao DNA sem a interferência dos danos ao DNA mitocondrial e à membrana celular, que ocorrem durante tratamentos oxidantes, e que podem interferir nos resultados de viabilidade realizados quando o tratamento é realizado nas células inteiras. Além da capacidade de reparo, esse ensaio permite também verificar a capacidade de reiniciar a transcrição após o dano genotóxico.

Nossos resultados mostraram uma diminuição da capacidade de reparo do DNA plasmidial em todas as células mutadas em *XPD* quando comparada à capacidade de reparo dos fibroblastos normais, sugerindo que de fato a presença de danos não reparados no DNA nuclear dessas células é responsável em grande parte pela sensibilidade dessas células ao estresse oxidativo. Outros grupos também

demonstraram, através de ensaios semelhantes, a deficiência no reparo de lesões causadas por estresse oxidativo em DNA plasmidial em células com mutações em proteínas de NER: XP-C (Kassam e Rainbow, 2007; Berra et al, 2013), CS-A e CS-B (Spivak e Hanawalt, 2006); mutações em pelo menos um gene de MMR, *MSH2*, também levaram a uma diminuição na capacidade de reparo de bases oxidadas causadas por tratamentos com luz UVA ou MB fotoativado em DNA plasmidial (Pitsikas et al, 2007).

Além disso, as células XP-D/CS e XP-D/TTD apresentam menor capacidade de reparo/retomada da transcrição do que as XP-D, o que pode indicar uma correlação entre a deficiência de reparo de DNA e/ou retomada da síntese de RNA e a severidade do fenótipo dos pacientes, uma vez que os pacientes XP-D/CS e TTD/XPD apresentam os fenótipos mais severos (se comparados aos pacientes XP-D), assim como as menores taxas de reparo/retomada da transcrição após danos gerados por estresse oxidativo ao DNA plasmidial. De fato, diversas síndromes estão associadas a deficiências em diferentes via de reparo de DNA, não somente XP, CS e TTD, mas também as síndromes de Bloom, Werner, FA, ataxia-telangiectasia (AT), tendo todas elas alguns sintomas em comum, como aumento na incidência de tumores, envelhecimento precoce e sintomas neurológicos. Deficiências no reparo de DNA, tanto nuclear quanto mitocondrial, estão também associados a diversas doenças neurológicas (Kulkarni e Wilson, 2008; Hayashi, 2009; Jeppesen et al, 2011; Canugovi et al, 2013; Sepe et al, 2013). Dessa forma, durante anos pensou-se que as patologias neurológicas dos pacientes XP, CS, XP/CS e TTD também pudessem ser respondidas pela sua deficiência no reparo de DNA, uma vez que a deficiência no reparo está ligada aos sintomas de fotossensibilidade, envelhecimento precoce e aumento de incidência de tumores (Hashimoto e Egly, 2009; Brooks 2013).

Entretanto, é importante lembrar que a via de NER é menos ativa em células terminalmente diferenciadas, como é o caso dos neurônios e astrócitos (Nouspikel, 2007; Yamamoto et al, 2007), e que, por mais que o acúmulo de danos no DNA possa levar à morte celular, a luz UV nunca é capaz de atingir as células do CNS. Além disso, as patologias neurológicas dos pacientes XP, CS (ou XP/CS) e TTD é extremamente diferente: como já mencionado, os pacientes XP que apresentam sintomas neurológicos sofrem de processos neurodegenerativos, enquanto as patologias dos

pacientes CS e TTD é mais ligada à deficiências no processo de deposição da mielina, desde o início do desenvolvimento. Dessa forma, alguns grupos defendem que as patologias neurológicas dos pacientes CS e TTD não podem ser explicadas somente pela deficiência no reparo do DNA, mas também (ou principalmente) pelas deficiências nos processos transcricionais desde o início do desenvolvimento (Compe e Egly, 2012). De fato, uma diferença importante entre as células XP-D e XP-D/CS reside não na capacidade de reparo de fotoprodutos (completamente ausente para CPDs e deficiente para 6,4-PPs, tanto em genes inativos quanto ativos em ambas as linhagens), mas sim na retomada da transcrição após os danos causados pela luz UV, que as células XP-D/CS, ao contrário das XP-D, não conseguem realizar mesmo após 24 horas de tratamento (Van Hoffen et al, 1999). Essa deficiência na retomada da transcrição não parece ser ligada à deficiência no reparo, mas sim a um processo ativo de repressão da transcrição de diversos genes, o que poderia ajudar a explicar os fenótipos severos dos pacientes XP-D/CS (Vélez-Cruz et al, 2012). Seria interessante verificar se essa mesma diferença ocorre após danos causados por estresse oxidativo.

Além da sua participação em processos de reparo e de transcrição, o complexo TFIIH também é importante para diversos outros processos, como na regulação de outros fatores de transcrição, como o p53 (Lu et al, 1997), e de diversos receptores nucleares, que são fosforilados pela subunidade CDK7 do complexo TFIIH, como os receptores de ácico retinóico, vitamina D, hormônios sexuais ou da tireoide (Compe e Egly, 2012; Zhou et al, 2013). Dessa forma, algumas deficiências de desenvolvimento de pacientes TTD podem ser explicadas por exemplo por defeitos na estabilização de receptores de hormônios da tireoide (TR) somente em determinada população de células (as responsivas a hormônios da tireóide), devido às mutações em XPD que levam ao mal funcionamento do complexo TFIIH (Compe et al, 2007), o que explicaria em parte a ausência de diferenças na expressão gênica de fibroblastos de pacientes XP e TTD (Offman et al, 2008); assim, é possível que muitas das diferenças importantes entre os pacientes XP, XP/CS e TTD não sejam detectadas através do estudo de fibroblastos.

A deficiência de reparo, entretanto, está claramente associada não somente à etiologia dos tumores de pele de pacientes XP (Bradford et al, 2011; Lai et al, 2013), mas também ao desenvolvimento de sintomas oculares (Brooks et al, 2013) e auditivos

(Totonchy et al, 2013). Um estudo com diversos camundongos deficientes em NER mostrou diferenças interessantes entre os animais nocaute para *Csa* e *Csb*, assim como no animal Xpd^{XPCS}, que apresentam alterações nas células da microglia compatíveis com a desmilinização que é vista nos pacientes CS, e não encontradas nos animais nocaute para *Xpa* e *Xpc*. Não foram encontrados sintomas claros de neurodegeneração em nenhum dos animais, somente alguns foci de ativação de p53, mais frequentes nos animais CS do que nos XP; sabe-se que somente cruzando os animais CS com XP consegue-se o aparecimento de sintomas neurológicos, entretanto esses duplo-mutantes apresentam progeria grave e têm uma vida extremamente curta (Murai et al, 2001). Para estudar os efeitos da deficiência completa de NER na patologia neurológica, foram gerados animais CS com nocaute condicional para *Xpa* somente em neurônios pós-natais. Esses animais apresentam grande perda neuronal ao longo do tempo, provavelmente causada pelo acúmulo de lesões no DNA, mostrando que as deficiências em NER se somam às deficiências em TCR nos processos neurodegenerativos (Jaarsma et al, 2011).

Em resumo, as diferenças entre os fenótipos dos pacientes XP-D, XP-D/CS e TTD/XPD estão provavelmente ligadas à deficiências no reparo de diversos tipos de lesões, inclusive lesões causadas por estresse oxidativo, mas também a diferenças nos processos transcricionais após dano genotóxico, e outros processos que o complexo TFIIH faz parte, como a ativação de receptores nucleares. Nossos resultados indicam que diferenças nos mecanismos de morte celular também podem estar ligados às diferenças fenotípicas entre esses pacientes.

5.1.6 Sensibilidade das células XP-V aos danos genotóxicos causados por estresse oxidativo

Aproximadamente 20% dos pacientes XP pertencem ao grupo XP variante (XP-V) (Opletalova et al, 2014); esses pacientes apresentam fenótipo clínico mais brando, quando comparados pacientes XP clássicos (XP-A a XP–G), que possuem deficiências em NER. Os portadores de XP-V não apresentam grande fotossensibilidade na infância, porém esta aparece na puberdade e aumenta no início da idade adulta, quando começam a surgir as primeiras lesões malignas de pele. Além disso, esses pacientes não desenvolvem sintomas neurológicos (Tanioka et al, 2007). Com a clonagem do

cDNA do gene *XPV/POLH*, em 1999, identificou-se seu produto gênico como sendo a DNA polimerase η (pol eta, XPV ou POLH), homólogo de Rad30 em leveduras, envolvida na TLS de fotoprodutos (Johnson et al, 1999; Masutani et al, 1999). Esta é a única polimerase descrita cuja deficiência está associada a uma síndrome humana até o momento.

Sabe-se que atividade da DNA polimerase η é essencial para evitar os efeitos carcinogênicos da radiação UV; essa importância é evidenciada pela maior incidência de tumores de pele nos pacientes XP-V, que, apesar de ser menor do que nos outros pacientes XP, é maior quando comparado com a população em geral. Pol η apresenta baixa fidelidade e processividade na replicação de DNA íntegro (Matsuda et al, 2000), porém é especializada na síntese de DNA contendo lesões causadas pela luz UV (Biertümpfel et al, 2010): essa polimerase é capaz de adicionar os nucleotídeos corretos (A-A) opostos a CPDs formados por dímeros de T-T (*cis-syn* dímeros de ditimina) (Masutani et al, 2000), as lesões mais comuns formadas após exposição à luz solar. Na ausência de pol η, o recrutamento de outras polimerases TLS (ι e ξ) para fazer o *bypass* dos CPDs resulta em aumento de mutações que levam aumento na incidência de tumores de pele dos pacientes XP-V (Waters et al, 2009). Assim, acredita-se que, ao contrário do *bypass* feito pela pol η, esse processo é mutagênico. Pol η também participa da TLS dos 6,4-PPs, que é realizado por duas polimerases: η ou ι como insersoras (síntese do nucleotídeo frente à lesão) e ξ como extensora (continuação da síntese de DNA na lacuna), em um processo geralmente mutagênico (Prakash et al, 2005).

Nossos dados mostraram que os fibroblastos provenientes de pacientes XP-V apresentam um aumento da sensibilidade ao tratamento com MB fotoativado, que é maior do que os fibroblastos normais, porém menor do que os fibroblastos com mutações em XPD. Ensaios com linhagens de células XP-V primárias, provenientes do pacientes XP-V brasileiros, também mostraram sensibilidade ao tratamento com MB fotoativado, embora essa sensibilidade seja menos acentuada do que o observado nas linhagens transformadas. Os fibroblastos XP-V também mostraram sensibilidade ao tratamento oxidante com $KBrO_3$.

De acordo com os resultados de sensibilidade, as células XP-V apresentam um aumento na população em Sub-G1 após tratamento com MB fotoativado, que é maior do que a dos fibroblastos normais, e menor do que a encontrada nas células com mutações em *XPD*; é interessante notar que as células do paciente XP06GO, apesar de se mostrarem mais sensíveis pelo experimento de sobrevivência clonogênica, apresentam as menores quantidades de células em apoptose. Experimentos de citometria para caspase 3 ativada também mostraram uma grande parte da população de células da linhagem XP30RO positivas para essa marcação 72 horas após tratamento com MB fotoativado, indicando, juntamente com os resultados da população em Sub-G1, que essas células provavelmente morrem por apoptose.

Os resultados de citometria de fluxo mostraram que as células XP-V apresentam um bloqueio no ciclo celular que permanece mesmo após 48 horas do tratamento, diferente dos fibroblastos normais. É interessante notar que, mesmo as linhagens possuindo mutações truncantes, o comportamento delas frente ao estresse oxidativo é um pouco diferente: de forma geral todas as linhagens transformadas apresentam um bloqueio em fase S/G2, entretanto esse bloqueio é variável em intensidade principalmente nas concentrações mais baixas de MB. Da mesma forma que as células transformadas, as células primárias também apresentam um bloqueio no ciclo celular 48 horas após o tratamento com MB fotoativado, que é diferente entre as linhagens: enquanto a linhagem proveniente do paciente XP04GO apresenta um forte bloqueio na fase G1, as linhagens dos pacientes XP05SP e XP06GO apresentam um bloqueio muito menos acentuado, mais semelhante aos fibroblastos normais.

As células da linhagem XP30RO apresentam uma permanência da sinalização da presença de danos no genoma, que é semelhante entre 4 e 24 horas porém aumenta significativamente entre 24 e 48 horas após o tratamento com MB fotoativado, em mais uma indicação da permanência de lesões não-reparadas no genoma. Essas lesões não devem ser quebras, uma vez que os resultados dos ensaios de cometa mostraram que essas mesmas células são proficientes no reparo de quebras causadas pelo tratamento com MB fotoativado.

É necessário lembrar que tanto o aumento da sensibilidade das células XP-V frente aos tratamentos oxidantes em relação aos fibroblastos normais, assim como as diferentes respostas observadas entre as linhagens de pacientes diferentes, podem

ocorrer não somente devido a possíveis diferenças na expressão e/ou atividade da proteína pol η, mas também de todo o *background* genético de cada linhagem. Ensaios de complementação são necessários para que se possa afirmar a validade desses resultados.

De forma geral, um aumento na sensibilidade das células XP-V ao tratamento oxidante não era esperado, uma vez que essas células são proficientes em NER e BER, provavelmente as vias mais importantes para o reparo das lesões causadas por esse tratamento. É conhecido que pol η está implicada na TLS de outras lesões além das lesões causadas pela luz UV, como bases oxidadas tipo 8-oxoG e timina glicol (Haracksa et al, 2000a; Kusumoto et al, 2002), bases alquiladas como a O^6-MeG (Haracksa et al, 2000b), adutos de cisplatina (Vaismann et al, 2000) e sítios AP (Choi et al, 2010).

Os fibroblastos de pacientes XP-V são moderadamente sensíveis à radiação UVC, e essa sensibilidade é fortemente aumentada na presença de cafeína, um inibidor das quinases da família PI3K, que participam da sinalização para a parada no ciclo celular. Entre essas quinases está ATR, que é ativada após danos genotóxicos causados por UVC pela interação de ATRIP com regiões de ssDNA protegidos por RPA; um dos alvos de ATR é Chk1, essencial para a parada no ciclo celular, assim como para a estabilização da forquilha de replicação (Despras et al, 2010). Além disso, ATR também está envolvida no recrutamento de pol η para regiões de parada na forquilha de replicação após UVC, através da fosforilação de pol η (Chen et al, 2008). A cafeína também é capaz de aumentar a sensibilidade das células XP-V ao tratamento com cisplatina (Albertella et al, 2005), entretanto esses mecanismos ainda não foram completamente elucidados.

Células deficientes em pol η também mostraram-se mais sensíveis ao tratamento com doxorrubicina, assim como células deficientes em XP-A, sensibilidade que também é aumentada na presença de inibidores de quinases (Moraes et al, 2012b). A sensibilidade a agentes oxidantes, entretanto, nunca foi descrita em células XP-V. Células deficientes em outra polimerase TLS, pol ι, se mostraram sensíveis a tratamentos oxidantes, provavelmente através do seu papel na via de BER (Petta et al, 2008), o que não parece entretanto ser o caso da pol η.

O papel dessa polimerase na TLS de algumas lesões causadas pelo tratamento com MB fotoativado está certamente ligado à diminuição da mutagenicidade, uma vez

que a pol η apresenta alta fidelidade ao replicar lesões do tipo 8-oxoG (Mcculloch et al, 2009), presentes em grande quantidade após esse tratamento. Entretanto, as lesões mais responsáveis pela citotoxicidade desse tratamento provavelmente não são as bases oxidadas individuais, mas sim as lesões em *cluster*, as ciclopurinas e as quebras, provenientes em grande parte após a ação da APE1 em sítios AP, principalmente na presença de muitas bases oxidadas em uma mesma região (Sage e Harrison, 2011). De fato, o tratamento com diversos agentes oxidantes é capaz de levar à parada na forquilha de replicação (provavelmente pela formação de outros danos além das bases oxidadas individuais), uma vez que Zlatanou et al (2011) detectaram altos níveis de PCNA monoubiquitinado após tratamentos oxidantes, sinalização essencial para o recrutamento de polimerases TLS (Kannouche, 2004; Bienko et al, 2010; Despras et al, 2012), e que de fato pol η é recrutada para regiões onde há a presença de lesões em tandem de forma dependente de MSH2, e que a síntese de DNA não-programada (UDS) só é retomada na presença tanto de MSH2 quanto de pol η, mostrando que essas proteínas são essenciais para o reparo desse tipo de lesão.

Além de ser capaz de realizar a TLS através de sítios AP, pol η também é capaz de realizar o *bypass* de lesões do tipo bases oxidadas em tandem, como as 8,5´-ciclopurina-2´-desoxinucleosídeos: de fato, essa polimerase é capaz de inserir as bases corretas T e C frente às lesões ciclo-dA e ciclo-dG, respectivamente, com frequências maiores do que as bases incorretas (Swanson et al, 2012); entretanto, pol η é capaz de inserir apenas dois ou três nucleotídeos sem se dissociar do DNA após o *bypass* da lesão, sendo então substituída pela polimerase ξ (You et al, 2013). Dessa forma, pol η não está ligada somente à diminuição dos efeitos mutagênicos do estresse oxidativo, mas também dos efeitos citotóxicos, por evitar os eventos de parada na forquilha de replicação, que podem eventualmente colapsar formando quebras.

Uma vez que essa polimerase também está envolvida em outros tipos de reparo de lesões mais complexas, como as quebras e ligações cruzadas (que também podem ser formadas durante estresse oxidativo), através da sua participação nas vias de HR (Kawamoto et al, 2005; Mcillwraith et al, 2005; Sebesta et al, 2005) e do reparo de ligações cruzadas (Ho e Schärer, 2010; Klug et al, 2012; Fu et al, 2013). Pol η também possui um papel não-catalítico na sinalização e reparo de lesões que causam a

parada na forquilha de replicação, através da sua participação no recrutamento de Rad18 para os locais onde há danos, o que é essencial para a monoubiquitinação de PCNA e consequentemente para a retirada do bloqueio da forquilha (Durando et al, 2013).

Dessa forma, é possível que o aumento na sensibilidade encontrado nas células XP-V esteja ligado ao papel da DNA polimerase η no reparo de lesões mais complexas do que as bases oxidadas individuais, uma vez que essa polimerase participa de diversas vias de reparo, lembrando que há necessidade dos ensaios de complementação para a confirmação desses resultados.

5.2 Indução da DNA polimerase η após estresse genotóxico e suas consequências nas respostas celulares

Nossos resultados mostraram uma clara indução nos níveis proteicos da DNA polimerase η após o tratamento com luz UVC, tanto nos fibroblastos normais quanto nos deficientes em NER (XP-G), 24 horas após o tratamento, mostrando que essa indução é uma resposta celular que independe da sua proficiência em reparo. Resultados semelhantes foram obtidos de forma independente pelo doutorando Guilherme Francisco, do laboratório do Dr. Roger Chammas (FM-USP): foi observada uma indução da proteína pol η em linhagem de melanoma (SK-Mel 37), 24 horas após tratamento com UVC, UVB e cisplatina. Além disso, a mesma indução não foi observada na linhagem mutada em p53 (SK-Mel 28). Da mesma forma, não foi detectada a indução após doses equitóxicas de luz UVC em fibroblastos transformados por SV40, ou após adição do inibidor de p53 (pifitrina-α). Além disso, experimentos realizados por Guilherme Francisco mostraram que a expressão de um plasmídeo contendo a sequência do gene *TP53* foi capaz de restabelecer a indução de pol η após tratamentos genotóxicos.

Alguns grupos realizaram o perfil de expressão gênica em diversos modelos, entretanto a indução de pol η não foi detectada em nenhum deles (Dazard et al, 2003; Lee et al, 2005; Enk et al, 2006). É possível que o gene POLH não fizesse parte dos painéis analisados por nenhum desses arquivos. No trabalho de Enk et al (2006),

entretanto, uma grande quantidade de genes foram modulados por UVB em células da pele também 24 horas após tratamento, mostrando que existe de fato uma resposta tardia das células à esse estresse genotóxico. Em relação a genes ligados a reparo, já é conhecido que as proteínas XPC, XPE e XPF são induzidas após radiação UV, sendo que os genes *XPC* e *p48/DDB2* são responsivos a p53 (Hwang et al, 1999; Adimoolan e Ford, 2002; Li et al, 2013), enquanto a indução de XPF foi descrita como dependente de um aumento de c-Fos (Tomicic et al, 2011). Mesmo adutos causados por aflatoxina são capazes de induzir a atividade de NER de forma geral, assim como aumentar a expressão de XPA e XPB principalmente no fígado dos animais tratados, efeitos também ligados ao status de p53 (Mulder et al, 2014).

Outros artigos avaliaram a expressão gênica após tratamento com cisplatina, e detectaram aumento na expressão de XPC e hHR23 em células de adenocarcinoma de pulmão (Shen et al, 2011), e de XPC e XPE em melanoma (Bowden et al, 2010; Barckhausen et al, 2013), também dependentes de p21 e p53. Liu e Chen (2006) demonstraram que existe um elemento de ligação a p53 na região promotora do gene *POLH*, e detectaram um aumento no mRNA de pol η após quebras geradas pelo tratamento com camptotecina e IR, de forma dependente de p53. Dessa forma, nossos dados parecem concordar com a literatura que mostra a indução de genes ligados à resposta das células a insultos ao genoma, e que essa indução está geralmente ligada ao fator de transcrição p53.

Essa indução de pol η, no entanto, não implica necessariamente em uma vantagem funcional, uma vez que a simples expressão dessa proteína em células XP-A não aumentam a capacidade dessas células de replicarem genoma lesado (Lima-Bessa et al, 2006). Sendo assim buscamos estratégias que pudessem testar a funcionalidade dessa proteína induzida nos fibroblastos primários. Realizamos experimentos semelhantes aos ensaios que eram feitos nas décadas de 60 e 70, nos quais eram aplicadas doses fracionadas de radiação UV ou IR, em geral uma dose menor seguida de uma dose maior, que geravam efeitos diferentes nas células em comparação com a aplicação de somente uma dose grande (Elkind e Sutton, 1960; Domon e Rauth, 1973; Todd, 1973; Todd et al, 1977; Moustacchi et al, 1979). Assim, tratamos fibroblastos deficientes em GGR (XP-C) com a menor dose de UVC após a qual havia sido detectada a indução da proteína pol η por WB, e 24 horas depois (tempo no qual detectamos a

maior indução), aplicamos uma segunda dose, mais alta, de irradiação UVC. De um modo geral, nossos dados indicaram que a indução da proteína pol η em células humanas tem capacidade funcional: permitem não só um melhor processo de replicação de genoma lesado, como também levam a um aumento da sobrevivência das células. Células que receberam somente doses elevadas apresentaram um forte bloqueio em fase G1, enquanto as células que haviam recebido a pré-dose apresentaram um bloqueio diferente, em fase S/G2. Os ensaios de incorporação de PI também mostraram que as células que receberam a pré-dose apresentaram uma menor quantidade de células em apoptose (Sub-G1) do que as células que receberam somente as doses elevadas.

Ensaios de citometria através da marcação de BrdU, com um pulso realizado após a dose alta de UVC, também mostraram que as células pré-irradiadas são capazes de incorporar uma maior quantidade desse nucleotídeo na molécula de DNA, em relação à células não-irradiadas. Além disso, ensaios de fibra de DNA (*DNA fiber*) demonstraram que tanto células normais quanto deficientes em NER (XP-C) irradiadas com a pré-dose apresentaram uma elongação mais eficiente do DNA em replicação após irradiação com doses altas de luz UVC, em relação a células que só receberam essas doses de luz UVC mais altas.

Esses resultados podem indicar que a indução de pol η está permitindo às células realizarem TLS mais eficientemente através dos danos causados pela irradiação com luz UVC, reduzindo o bloqueio das forquilhas de replicação, que podem sinalizar para apoptose (Ortolan e Menck, 2013), como parece ocorrer nas células que não receberam a pré-dose. O trabalho de Moustacchi et al (1978) também detectou um aumento na capacidade de replicação de DNA após doses altas em fibroblastos normais que haviam recebido pré-doses de UVC, efeito que estava ausente em fibroblastos de pacientes XP-V e XP-A; esses resultados podem indicar também que os efeitos da pré-dose no aumento da sobrevivência das células não esteja somente ligado à TLS, mas também ao processo de reparo das lesões.

Os resultados desses ensaios apresentaram semelhanças aos resultados do trabalho de Sarasin e Hanawalt (1978), que detectaram que o tratamento de células de primatas com doses baixas de diversos agentes carcinogênicos, assim como a irradiação com luz UVC, eram capazes de aumentar a resistência de vírus SV40 à

irradiação com luz UVC. Os compostos carcinogênicos utilizados, como a aflatoxina e o metilmetanosulfonato (MMS), têm em comum a capacidade de levar à parada na forquilha de replicação das células eucariontes, sendo que o aumento da sobrevivência dos vírus foi relacionado à inibição da replicação do DNA viral das células hospedeiras.

Curiosamente, resultados similares haviam sido obtidos em bactérias, uma vez que bactérias pré-irradiadas com UVC ou IR, ou pré-tratadas com mitomicina C (MMC) ou aflatoxina, eram capazes de levar ao aumento da sobrevivência de vírus fago-λ inativados por UVC (Sarasin et al, 1977), e que esse fenômeno (conhecido como *induced phage reactivation*) era dependente da ativação da via de resposta SOS em bactérias (Weigle, 1953). Estes estudos levaram à busca por uma resposta em células de mamíferos semelhante à resposta SOS de bactérias (Sarasin, 1985).

O termo resposta SOS foi utilizado pela primeira vez em 1974 por Miroslav Radman, para descrever um mecanismo celular de resposta a estresse causado por exposição à luz UV. Existem mais de 40 genes, regulados pela proteína repressora LexA, que são induzidas em resposta a danos ao DNA e fazem parte do regulon SOS em *E. coli*. Na presença de danos genotóxicos, ocorre o acúmulo de filamentos da proteína RecA ativada (RecA*), o que ativa a transcrição de genes SOS pela clivagem do repressor LexA. Dentre esses genes, além do próprio *lexA*, estão genes ligados a vias de reparo de DNA, como NER (genes *uvr*) e reparo por recombinação (*recA*); dessa forma, após o reparo das lesões, os genes SOS são novamente reprimidos por LexA (Schlacher e Goodman, 2007).

Uma das características da indução da resposta SOS é a o aumento da mutagênese; de fato, existem três genes de polimerases TLS induzidos pela resposta SOS em *E.coli*: pol IV (*dinB*), pol II (*dinA*) e pol V (*umuDC*), sendo esta última a principal responsável pela mutagênese observada após indução da resposta SOS (Bagg et al, 1981). Na fase estacionária do ciclo celular, entretanto, as três polimerases são responsáveis pela geração de mutações que conferem variabilidade na busca das células procariontes por vantagens adaptativas (Yeser et al, 2002). A DNA polimerase V (composta pelas subunidades UmuC e UmuD', sendo UmuC a catalítica) também pertence à família Y das polimerases TLS, e é a principal polimerase implicada na TLS de CPDs, 6,4-PPs e sítios AP (Nohmi, 2006). Na TLS de 6,4-PPs formados por T-Ts, pol V incorpora principalmente dG frente a esses fotoprodutos, o que consiste no perfil

mutagênico detectado após indução da resposta SOS *in vivo* (Leclerc et al, 1991). Logo, o processo SOS é ativado em bactérias reduzindo o efeito letal da irradiação UVC, porém, ao custo de aumento de mutagênese.

Nossos resultados mostraram ainda que o silenciamento da expressão de pol η também confirma o papel dessa proteína na redução de morte das células, porém não realizamos ensaios de mutagênese. É provável que a indução dessa proteína apresente um papel importante na resposta das células a longo prazo, provavelmente aumentando a eficiência de TLS e impedindo o colapso das forquilhas de replicação que posteriormente sinalizam para ativação de apoptose.

Assim, os efeitos "protetores" da pré-dose aparentemente não dependem somente do aumento da capacidade de TLS, mas provavelmente também ao aumento da expressão de diversas outras proteínas induzidas por p53, dentre elas diversos genes relacionados ao ciclo e ao reparo de DNA. No trabalho de Barckhausen et al (2013), o aumento na expressão de XPC e XPE nas células de melanoma por tratamentos quimioterápicos foi capaz de conferir resistência a longo prazo ao tratamento com agentes que causam ICLs nessas células, fenômeno que só ocorreu nas células com p53 selvagem, mostrando que o aumento da capacidade de reconhecimento dessas lesões por proteínas de NER, assim como o aumento na capacidade de lidar com as forquilhas bloqueadas, é capaz de conferir um aumento na sobrevivência das células.

Sendo assim, pode-se fazer algumas analogias entre nossos resultados e a resposta SOS de bactérias: a pré-dose de UVC funcionaria como um ativador de um gene controlador da expressão de diversos outros genes, como é o caso de *RecA* nas bactérias e de *TP53* nas células de mamíferos. Dentre os genes induzidos, tanto na resposta SOS como nos sistemas de pré-dose, estão genes ligados a reparo de DNA, assim como polimerases TLS. Uma das pols TLS induzidas pela resposta SOS é a pol V que, assim como a pol η de mamíferos, é responsável pelo *bypass* de lesões causadas pela luz UV. De fato, um mecanismo que possibilitasse às células eucariontes a responder de uma forma mais eficiente (através do aumento das suas capacidades de reparo e de evitar a parada prolongada da forquilha de replicação) a um agente genotóxico presente de forma constante no meio ambiente, como a luz UV, poderia de fato conferir uma vantagem evolutiva à essas células, e poderia ter sido um

mecanismo selecionado ao longo da evolução. Entretanto, para de fato definir um mecanismo "*SOS-like*" em células de mamíferos, é necessário o estudo da mutagênese, que é uma das características da resposta SOS de procariotos.

5.3 Determinação da funcionalidade da proteína DNA polimerase η nas células de pacientes XP-V através do padrão de mutações dos genes variáveis das imunoglobulinas após Hipermutação Somática

A Hipermutação Somática (SHM, de *Somatic Hypermutation*) ocorre nos centros germinativos dos órgãos linfóides secundários, e leva à diversificação dos genes variáveis das imunoglobulinas durante a resposta a determinado antígeno, através da seleção de células B possuindo receptores com maior afinidade pelo antígeno (Weill e Reynaud, 2008). As células B que possuírem um receptor BCR (*B Cell Receptor*) com maior afinidade pelo antígeno podem se diferenciar em plasmócitos ou células B de memória, conferindo proteção a longo prazo contra o antígeno específico. Durante o processo de SHM são introduzidas (em sua maioria) mutações pontuais nos genes codificantes para as regiões variáveis das cadeias pesada (V_H) e leve (V_L) das imunoglobulinas, depois que as células passaram pelo processo de recombinação V(D)J e após estímulo por células T (Longo e Lipsky, 2006).

O processo de SHM é iniciado pela enzima AID (*activation-induced cytidine deaminase*), que catalisa a desaminação de citidinas em uracilas em regiões específicas, de aproximadamente 2 kbp dos genes das imunoglobulinas, levando a frequência de uracilas 1 milhão de vezes maior que no restante do genoma (Saribasak e Gearhart, 2012). A uracila pode ser reconhecida e excisada pela glicosilase UNG ou pelo complexo MSH2-MSH6, e de acordo com a via de reconhecimento e formação do sítio AP há o recrutamento de diferentes polimerases TLS, sendo que pol η é recrutada pela via MSH2-MSH6, formando mutações em sítios A/T (Reynaud et al, 2009).

Em 2001 foi feita a primeira descrição da pol η como responsável pela geração de mutações nos sítios A/T durante o processo de SHM (Zeng et al, 2001), demonstrando que os genes variáveis das imunoglobulinas de pacientes XP-V apresentam uma grande diminuição das mutações nos sítios A/T (de

aproximadamente 50% para menos de 10%, com um aumento concomitante nas mutações preferencialmente em sítios G/C), em comparação com a população em geral, apesar do número de mutações não sofrer alteração significativa. Estudos posteriores demonstraram que a frequência de mutações nos sítios A/T está diretamente relacionada à quantidade da proteína pol η funcional; assim, foi sugerido que o sequenciamento das regiões variáveis dos genes das imunoglobulinas poderia ser usado como auxílio no diagnóstico de pacientes XP-V, assim como para o estudo da funcionalidade da proteína mutada nesses pacientes (Faili et al, 2009).

Os experimentos realizados em colaboração com os Dres. Said Aofouchi e Alain Sarasin comprovaram que os pacientes que possuem mutações que permitem a produção da proteína pol η, mesmo em quantidades residuais, exibem uma quantidade de mutações em sítios A/T superior aos pacientes que possuem mutações que levam à ausência total da proteína, confirmando a correlação entre a presença da proteína e um aumento nas mutações em sítios A/T. Ensaios semelhantes serão de grande interesse para a determinação da quantidade de pol η funcional das células dos pacientes XP-V brasileiros, sobretudo nessa população extremamente singular, composta por homozigotos de diferentes mutações, assim como por heterozigotos compostos e portadores, que nunca foram estudados anteriormente. Esses experimentos, assim como os ensaios de complementação, poderão responder se as diferenças observadas nas diferentes linhagens de pacientes XP-V após tratamento oxidativo se devem realmente à diferenças na expressão/atividade de pol η.

5.3.1 Papel da DNA polimerase η na manutenção da integridade da região dos genes variáveis de imunoglobulinas em idosos.

O estudo das regiões amplificadas dos genes variáveis das imunoglobulinas para a análise das mutações demonstrou um padrão diferenciado entre os pacientes XP-V mais idosos em comparação aos mais jovens, com uma frequência de mutações mais elevada e a presença de grandes fragmentos de inserções e deleções, que não estão presentes (ou estão presentes em menor quantidade e/ou tamanho) nos pacientes mais jovens. Esses resultados foram inesperados uma vez que até o

momento só haviam sido descritas como características do processo de SHM mutações pontuais, sendo raros os eventos de indels (Keim et al, 2013).

Com a utilização de controles de idade pareada, detectamos não só um aumento na frequência de mutações em função da idade (tantos nos pacientes quanto nos controles), mas também um aumento na instabilidade genômica (número de eventos mutagênicos) associada à idade, ao menos nas regiões amplificadas: indivíduos mais idosos apresentam um maior número de indels na região sequenciada, quando comparados com os indivíduos mais jovens. Existe também uma diferença entre os pacientes XP-V idosos e os controles com idades semelhantes: nos pacientes idosos existe não só um número maior de indels, como também o tamanho dos fragmentos inseridos ou deletados é maior. Os pacientes XP-V jovens não apresentam inserções ou deleções com mais de 10 nucleotídeos. Esses resultados não haviam sido descritos anteriormente (provavelmente pela ausência de pacientes XP-V em idades avançadas nos outros estudos), e indicam um papel dessa polimerase na manutenção da integridade do genoma ao longo da vida dos indivíduos, ao menos nos genes das imunoglobulinas.

Pol η é necessária para a manutenção da estabilidade genômica na presença de danos genotóxicos como os fotoprodutos, sua ausência estando associada ao aumento de quebras (Limoli et al, 2002). Além disso, mesmo na ausência de agentes genotóxicos externos, cada vez mais estudos têm relacionado a ação de pol η na replicação de DNA em regiões de estruturas não-B de DNA, que ocorrem normalmente em algumas regiões do genoma e podem bloquear as polimerases replicativas (Bétous et al, 2009; Sharma et al, 2012; Boyer et al, 2013), e na replicação de sítios frágeis (Rey et al, 2009; Bergoglio et al, 2013), sendo que sua ausência também está associada à formação de quebras cromossômicas nessas situações. É possível que a ausência de pol η, com sua substituição por outra(s) polimerase(s) por um longo período de tempo, esteja ligada a um aumento da instabilidade genômica, principalmente nas regiões repetitivas, em um mecanismo semelhante ao observado em *C. elegans*, que acumula um número crescente de deleções ao longo da vida, na ausência de pol η ou em resposta a estruturas não-canônicas de DNA, em um mecanismo dependente de outra polimerase, θ (POLQ)(Roerink et al, 2014; Koole et al, 2014).

6 CONCLUSÕES

Com o trabalho realizado durante esta tese, e relação com dados existentes na literatura, pudemos contribuir com algumas conclusões, dentre as quais destacamos as que julgamos mais importantes:

Fibroblastos humanos com mutações em *XPD/ERCC2*, provenientes de pacientes XP-D, XP-D/CS e TTD/XPD são altamente sensíveis ao estresse oxidativo, induzido por pelo menos dois agentes oxidantes (Azul de Metileno fotoativado e Bromato de Potássio), sendo que a complementação das três linhagens com o gene *XPD* foi capaz de restaurar a proficiência de reparo em todas as linhagens. Detectamos diferenças importantes relacionadas ao mecanismo de morte celular entre as linhagens estudadas, sendo que as células XP-D apresentam um mecanismo de morte celular por apoptose, enquanto as células XP-D/CS e TTD/XPD apresentam em concomitância mecanismos de apoptose e necrose. As linhagens diferem também em relação à capacidade de reparo/retomada da transcrição após danos oxidativos causados em DNA plasmidial, que são extremamente diminuídas nas células XP-D/CS e TTD/XPD, quando comparado com as células XP-D. Identificamos também uma sensibilidade moderada de células provenientes de pacientes XP-V ao tratamento oxidativo, porém esses dados necessitam de confirmação por ensaios de complementação. De um modo geral, esses dados indicam que a proteína XPD, e a via de reparo NER, participa do processamento de lesões induzidas por estresse oxidativo, auxiliando células humanas a sobreviver a lesões induzidas no seu genoma nuclear. Na ausência de determinadas funções dessa proteína, a redução da capacidade de reparo dessas lesões sinaliza a processos de morte celular, os quais podem explicar fenótipos clínicos observados em pacientes XP-D. Curiosamente, células de linhagens que apresentam apoptose e necrose, após tratamento com agente gerador de oxigênio singlete (MB fotoativado), correlacionam com fenótipos mais graves, envolvendo problemas de desenvolvimento com XPD/CS e TTD. Células provenientes de paciente com fenótipo mais brando (XP-D) apresentam apenas apoptose. Esses dados devem ser melhor explorados, buscando confirmar essa correlação em um número maior e diversificado, na expectativa que os fenótipos celulares (apoptose/necrose ou apenas apoptose) possam corresponder a uma regra geral que discrimine fenótipos clínicos de

pacientes (CS e TTD ou XP, respectivamente). Essas observações não só poderiam facilitar o diagnóstico de pacientes como também podem ser pistas importantes para se compreender as bases moleculares da diferença fenotípica entre esses pacientes.

A proteína DNA polimerase η é induzida após tratamento genotóxico em fibroblastos primários proficientes e deficientes em NER, sendo que o tratamento de células primárias com pré-doses de UVC antes de doses altas do mesmo agente genotóxico é capaz de induzir mudanças no perfil do ciclo celular, aumentar a capacidade de retomada do processo de replicação do DNA e proteger da morte celular. Esses dados são pioneiros no sentido de demonstrar que células humanas também apresentam processos indutivos similares ao processo SOS observado inicialmente em bactérias, envolvendo aumento da expressão e atividade de uma DNA polimerase TLS.

Confirmamos também a possibilidade de uso do perfil de mutações em sítios A/T nos genes variáveis das imunoglobulinas como alternativa de diagnóstico de XP-V, assim como na predição da funcionalidade da proteína pol η presente nas células dos pacientes. Além disso, detectamos um aumento na frequência de mutações nos genes variáveis das imunoglobulinas em função da idade nas células humanas, assim como a presença de grandes deleções e inserções nos genes variáveis das imunoglobulinas nos pacientes XP-V de idades avançadas, o que não foi observado nos pacientes jovens ou em controles de idades pareadas.

7 ANEXOS

Anexo 1: Paper publicado. Rocha CR e Lerner LK, Okamoto OK, Marchetto MC, Menck CF. The role of DNA repair in the pluripotency and differentiation of human stem cells. Mutat Res 752(1): 25-35, 2013.

Anexo 2: Tabela com as sequências dos *primers* utilizados.

Mutation Research 752 (2013) 25–35

Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Mutation Research/Reviews in Mutation Research

journal homepage: www.elsevier.com/locate/reviewsmr
Community address: www.elsevier.com/locate/mutres

Review

The role of DNA repair in the pluripotency and differentiation of human stem cells

Clarissa Ribeiro Reily Rocha [a,1], Leticia Koch Lerner [a,1], Oswaldo Keith Okamoto [b], Maria Carolina Marchetto [c], Carlos Frederico Martins Menck [a,*]

[a] Department of Microbiology, Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, Av. Prof. Lineu Prestes, 1374, São Paulo, SP 05508 900, Brazil
[b] Department of Genetics and Evolutionary Biology, Institute of Biosciences, University of São Paulo, Rua do Matão, 277, São Paulo, SP 05508-090, Brazil
[c] Laboratory of Genetics (LOG-G), The Salk Institute for Biological Studies, 10010 North Torrey Pines Road, La Jolla, CA 92037, USA

ARTICLE INFO

Article history:
Received 29 June 2012
Received in revised form 13 September 2012
Accepted 14 September 2012
Available online 23 September 2012

Keywords:
DNA repair
Embryonic stem cells
Induced pluripotent stem cells (iPS)
Reprogramming
Cellular therapy

ABSTRACT

All living cells utilize intricate DNA repair mechanisms to address numerous types of DNA lesions and to preserve genomic integrity, and pluripotent stem cells have specific needs due to their remarkable ability of self-renewal and differentiation into different functional cell types. Not surprisingly, human stem cells possess a highly efficient DNA repair network that becomes less efficient upon differentiation. Moreover, these cells also have an anaerobic metabolism, which reduces the mitochondria number and the likelihood of oxidative stress, which is highly related to genomic instability. If DNA lesions are not repaired, human stem cells easily undergo senescence, cell death or differentiation, as part of their DNA damage response, avoiding the propagation of stem cells carrying mutations and genomic alterations. Interestingly, cancer stem cells and typical stem cells share not only the differentiation potential but also their capacity to respond to DNA damage, with important implications for cancer therapy using genotoxic agents. On the other hand, the preservation of the adult stem cell pool, and the ability of cells to deal with DNA damage, is essential for normal development, reducing processes of neurodegeneration and premature aging, as one can observe on clinical phenotypes of many human genetic diseases with defects in DNA repair processes. Finally, several recent findings suggest that DNA repair also plays a fundamental role in maintaining the pluripotency and differentiation potential of embryonic stem cells, as well as that of induced pluripotent stem (iPS) cells. DNA repair processes also seem to be necessary for the reprogramming of human cells when iPS cells are produced. Thus, the understanding of how cultured pluripotent stem cells ensure the genetic stability are highly relevant for their safe therapeutic application, at the same time that cellular therapy is a hope for DNA repair deficient patients.
© 2012 Elsevier B.V. All rights reserved.

Contents

1. Introduction . . . 26
2. Adult stem cells have elevated DNA repair capacity . . . 26
3. DNA damage response in stem cells . . . 27
4. Cancer stem cells: the dark side of DNA repair . . . 28
5. The intimate relationships between DNA repair, stem cells and aging . . . 29
6. Embryonic stem cells have the highest DNA repair capacity . . . 29
7. DNA repair efficiencies in induced pluripotent stem cells and in embryonic stem cells are equivalent . . . 30
   7.1. Cellular therapy using iPS cells . . . 31
   7.2. iPS cell therapy for patients with DNA repair deficiencies . . . 31
   7.3. Can a DNA repair deficient cell generate an iPS cell? . . . 31
8. Concluding remarks . . . 32
   Acknowledgements . . . 33
   References . . . 33

* Corresponding author. Tel.: +55 11 3091 7499; fax: +55 11 3091 7354.
E-mail address: cfmmenck@usp.br (C.F.M. Menck).
[1] Both authors contributed equally to this work.

1383-5742/$ – see front matter © 2012 Elsevier B.V. All rights reserved.
http://dx.doi.org/10.1016/j.mrrev.2012.09.001

1. Introduction

Genetic material is constantly exposed to a variety of genotoxic agents that can produce lesions on DNA and ultimately generate genomic instability. The potential sources of DNA damage include (i) endogenous factors such as those generated by metabolic activities (e.g., reactive oxygen species [ROS]) and DNA replication and (ii) exogenous factors such as environmental agents (e.g., ultraviolet [UV] and ionizing radiation [IR]). Some DNA lesions create structural alterations in the DNA that can impair gene transcription and DNA replication, thereby compromising vital cellular functions [1].

To counteract the constant occurrence of DNA lesions, cells have evolved complex DNA repair systems that are responsible for maintaining the integrity of genetic material. The major excision repair mechanisms in most cells for repairing damaged or inappropriate base incorporation within single DNA strands are base excision repair (BER), nucleotide excision repair (NER) and mismatch repair (MMR) [2]. In addition, two important mechanisms are responsible for repairing lesions involving two strands of DNA, interstrand crosslinks (ICLs) or double strand breaks (DBS): non-homologous end-joining (NHEJ) and homologous recombination (HR) [3]. The repair of different types of DNA lesions therefore depends on different sets of proteins that presumably undergo crosstalk to form a network for protection of the cell genome [4]. DNA repair mechanisms are ubiquitous protective mechanisms comprised of several pathways that address many different types of DNA lesions.

Human stem cells have the potential to differentiate into several cell types. Adult stem (AS) cells are important in the long-term maintenance of tissues throughout life, as they are responsible for regenerating tissues in response to damage and for replacing senescent terminally differentiated cells. AS cells normally have their differentiation limited to certain derived tissues and do not generate germ cell lines. In contrast, human embryonic stem (ES) cells have the potential to differentiate into all cell types found in mammalian embryos, including germ cells. Although stem cells are difficult to obtain and their clinical use is limited by ethical and safety considerations, genetic strategies were developed to reprogram the nuclei of somatic differentiated cells into pluripotent stem cells, which were termed induced pluripotent stem (iPS) cells [5]. The maintenance of genomic integrity in stem cells, both by increased stress defense and DNA repair mechanisms is extremely robust because genetic alterations can potentially compromise the functionality of entire cell lineages. For AS cells, genetic alterations have been linked to the impairment of proliferation and differentiation capacity and to the increased potential of tumorigenicity and aging [6]. Unrepaired DNA damage can lead to genomic instability and mutation, which can affect cell proliferation control, resulting in cancer. The inability of cells to cope with DNA damage triggers certain cellular responses that may lead to cell death. This event is critical because it provokes a decrease in the pool of stem cells, reducing the body's ability to repopulate damaged tissues and leading to aging.

In this review, we discuss (i) the DNA repair capacity of stem cells and its crucial role in differentiation and pluripotency maintenance of ES and iPS cells; (ii) the DNA repair responses of cancer stem cells and their implications for cancer therapy; and (iii) the possible roles of DNA repair in the reprogramming process of somatic cells to a pluripotent state and the potential use of iPS cells for cellular therapy of DNA repair deficient patients.

2. Adult stem cells have elevated DNA repair capacity

AS cells have the remarkable ability of self-renewal and differentiation into different functional cell types. In contrast to postmitotic or short-lived somatic cells, tissue-specific stem cells persist and function throughout the entire life of an organism to regulate tissue homeostasis and regeneration. AS cells are responsible for supporting many tissue functions, including the production of undifferentiated cells for tissue rejuvenation [6]. The functional demands and the longevity of stem cells indicate that they are uniquely equipped to maintain genomic integrity in ways different from those of somatic cells. In fact, as it will be discussed here, AS cells generally display high levels of DNA repair capacity, which decreases with differentiation.

One of the most versatile and highly conserved DNA repair mechanisms is the NER. This pathway is involved in the repair of helix-distorting lesions such as UV-induced photoproducts, cyclobutane pyrimidine dimers (CPDs) and pyrimidine 6–4 pyrimidone photoproducts ((6–4)PPs) [7]. Many bulky DNA adducts, including ICLs, generated by environmental pollutants (e.g., aldehydes) or by anti-tumor agents (e.g., cisplatin) are also repaired by the NER pathway [8]. The NER pathway comprises two subpathways: global genome repair (GGR), which senses the distortion in the double helix and repairs damage throughout the genome, and transcription-coupled repair (TCR), which addresses DNA lesions at the transcribing strand of active genes.

NER activity was shown to decrease during the differentiation of many types of human stem cells [9]. When the repair of UV-induced DNA lesions was compared in terminally differentiated human (hNT) neurons and their precursor cells (NT_2), the removal of CPDs, by GGR, was markedly decreased in hNT neurons. Furthermore, (6–4)PPs repair kinetics was also perturbed in hNT neurons, since nearly complete removal was achieved only after 3 days, whereas a complete repair of (6–4)PPs lesions was observed within hours in NT2 cells [10]. The attenuation of GGR upon differentiation was also observed in differentiated macrophages as a result of the hypo-phosphorylation of the ubiquitinating enzyme E1. The TFIIH complex, a component of NER pathway, could be the potential target for ubiquitination and may represent an important mechanism to regulate NER upon differentiation [11]. By contrast, TCR subpathway remained functional in those cells and there was no significant reduction in levels of NER enzymes. Moreover, terminally differentiated cells also efficiently repair the nontranscribed strand of active genes, a mechanism known as differentiation-associated repair (DAR). In this case, NER enzymes are recruited at the transcription domain resulting in the efficient repair of the damaged non-transcribed DNA strands [12,13].

BER is responsible for correcting small base modifications (e.g., oxidized bases and alkylation damage) and DNA single-strand breaks (SSBs). Such damage may result from endogenous events (e.g., mitochondrial metabolism) or exogenous genotoxic agents (e.g., anticancer drugs). The BER pathway also comprises two subpathways: the short-patch subpathway in which a single nucleotide is replaced and the long-patch subpathway in which 2–13 nucleotides are replaced [14]. In situ hybridization studies showed that, in the mice brain, some BER glycosylases (such as OGG1 and Neil 1) are highly expressed in neural stem or progenitor cells, conferring high capacity to remove 8-oxoguanine (8-oxoGua) lesions, which were reduced upon the induction of differentiation [15]. The murine Nei endonuclease VIII-like 3 (Neil3) glycosylase was also found to be specifically expressed in areas known to harbor neural stem and progenitor cells [16,17]. In addition, other groups observed downregulation of BER genes, such as XRCC1 and DNA ligase III and DNA ligase I during differentiation of mouse myoblasts to terminally differentiated myotubes. Importantly, both short and long patch BER pathways were dysfunctional in myotubes and accumulation of 8-oxoGua was observed as a consequence. The attenuation of BER in these differentiated cells also resulted in the accumulation of SSBs and phosphorylated H2AX nuclear foci after exposure to hydrogen peroxide [18].

The HR and NHEJ pathways repair the DNA molecule when it undergoes DSBs, usually caused by IR or free radicals exposure. HR is an error-free repair mechanism that requires a homologous DNA sequence to perform DSB repair [19]. Therefore, this mechanism is limited to the S or G2 cell cycle phase when sister chromatids are available to serve as a template for correction of the broken strand [20]. In contrast to HR, the NHEJ pathway joins the two ends of a DSB through a process that is largely independent of homology or cell cycle phase. As a result of NHEJ repair, the insertion or deletion of a few nucleotides may occur at the rejoining site. Thus, NHEJ is considered an error-prone DNA repair mechanism [21,22]. Interestingly, in hematopoietic SC, downregulation of the NHEJ key component Ku70 protein is correlated with donor aging. As a consequence, expression levels of Ku70 is higher in the newborns' SCs when compared to young and old donors [23]. Also, human hair follicle bulge SCs, compared with epidermal cells, have increased nuclear expression and activity of DNA-PKcs ensuring faster repair of DSBs by NHEJ pathway [24].

The MMR pathway addresses base–base mismatches, insertions and deletion loops that are generated during replication. In the MMR pathway, the mismatch site is identified by MLH1, which binds to the base, followed by identification of the newly synthesized strand. A specific exonuclease removes the mismatched strand, followed by re-synthesis and ligation by DNA polymerase and ligase, respectively [25]. Quantitative reversed transcribed-PCR identified a higher expression of DNA repair genes, including several members of the MMR (*MSH2*, *MSH6*, *MLH1*, *PMS2*), BER (AAG and APEX) and MGMT (O_6-methylguanine methyltransferase), in CD34+ (stem) cells compared to the terminally differentiated CD34− counterparts. However, these differences were not observed if those cells are induced to proliferate by cytokines [26].

Another important mechanism to maintain genomic stability is the Fanconi anemia (FA) pathway. FA pathway deficiency generally leads to high cancer susceptibility and FA patients display pronounced hypersensitivity to DNA-damaging agents such as cross-linkers and IR exposure. The FA pathway coordinates a complex response to genotoxic agents involving HR, NER, and translesion synthesis. A key step in the activation of the FA pathway is the ubiquitination of FANCD2 protein, leading to formation of DNA repair structures [27]. Recently, it was shown that the FA pathway is downregulated upon differentiation of THP-1 and HL-60 leukemia cells into macrophages. During differentiation, a significant reduction of mRNA and proteins of most components of the FA complex was detected, which leaded to deficiency of FA pathway activation due to lack of FANCD2 monoubiquitination [28]. In these cases, however, the reduction on FA pathway was accompanied by an increase of DSB repair through NHEJ [28].

Furthermore, in a study comparing hematopoietic stem and differentiated cells, a variation of DNA repair capacity and expression of DNA repair genes was observed during differentiation of these cells treated with alkylating agent melphalan or ethylnitrosourea. The rate of removal of DNA adducts, the resealing of repair gaps and the resistance to DNA-reactive drugs were higher in stem (CD34+ 38−) than in mature (CD34−) or progenitor (CD34+ 38+) cells from the same individual [29].

3. DNA damage response in stem cells

Besides higher DNA repair capacity, AS cells count with additional protection mechanisms. Many AS cells are usually quiescent, remaining at the G0 phase of the cell cycle, which minimizes the chance of replication error. In addition, those cells display a low metabolic activity and reduced number of mitochondria and consequently decreased ROS production. For example, hepatic and hematopoietic stem cells contain low numbers of mitochondria and display low oxygen consumption [30,31]. Furthermore, in contrast to differentiated cells that rely primarily on mitochondrial respiration, AS cells generate energy mainly through anaerobic glycolysis [32,33]. As expected, the use of the anaerobic glycolytic pathway confers a cytoprotective advantage to AS cells in view of the fact that mitochondrial respiration generates large amounts of DNA damage induced by ROS. In combination those mechanisms provide short-term benefits in terms of DNA damage [34] (Fig. 1).

Cell proliferation requires progression through the G1 and G2 checkpoints ensuring duplication of viable and healthy cells. If cells are exposed to genotoxic agents during DNA synthesis, the G1 checkpoint is activated, leading to a transient delay of the S phase progression for proper repair of the lesions [35,36]. Once the DNA damage has occurred, the cell initiates the process of DNA damage response (DDR), which comprises a complex of proteins that function as sensors, transducers and effectors. Thus, following DSB induction, a complex cascade of reactions is triggered to arrest the cell cycle and recruit DNA repair factors. The ataxia telangiectasia mutated (ATM) kinase and the ataxia telangiectasia related (ATR) kinase lead to cell cycle arrest, after DSBs are sensed by other proteins like RPA or the 9–1–1 complex [37] by phosphorylating the protein kinases CHK1 and CHK2. These DNA damage transducers then slow down or arrest the cell cycle by decreasing the activity of cyclin-dependent kinases (CDK), which gives the cell time to DNA repair before replication continues [38]. While ATM and DNA-PKcs play an important role in the response to DSBs, ATR

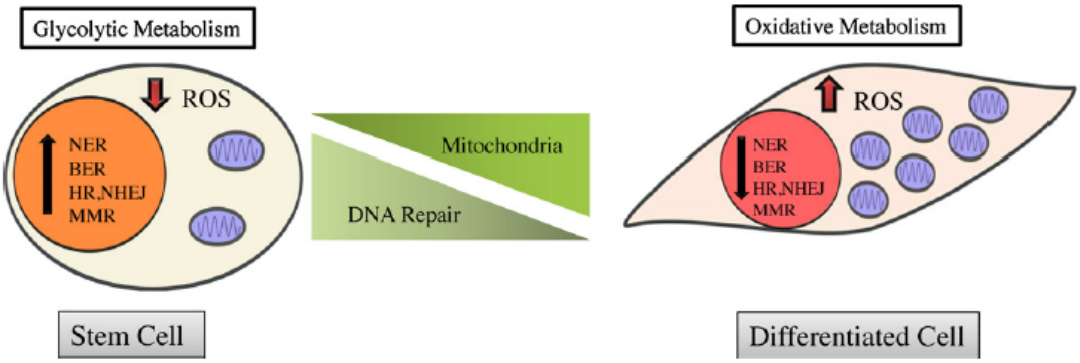


Fig. 1. Increased mitochondrial oxidation and reduced DNA repair upon stem cell differentiation. Stem cells display high DNA repair capacity and a low number of mitochondria, and rely on glycolysis for their energy needs. Mitochondrial oxidation is suppressed, resulting in reduced mitochondrial ATP production and ROS release. During differentiation, cellular remodeling occurs, leading to increase in mitochondrial mass, mitochondrial oxidation, and ROS production. Fully differentiated cells display reduced activity of the major DNA repair mechanisms, which may lead to genetic instability.

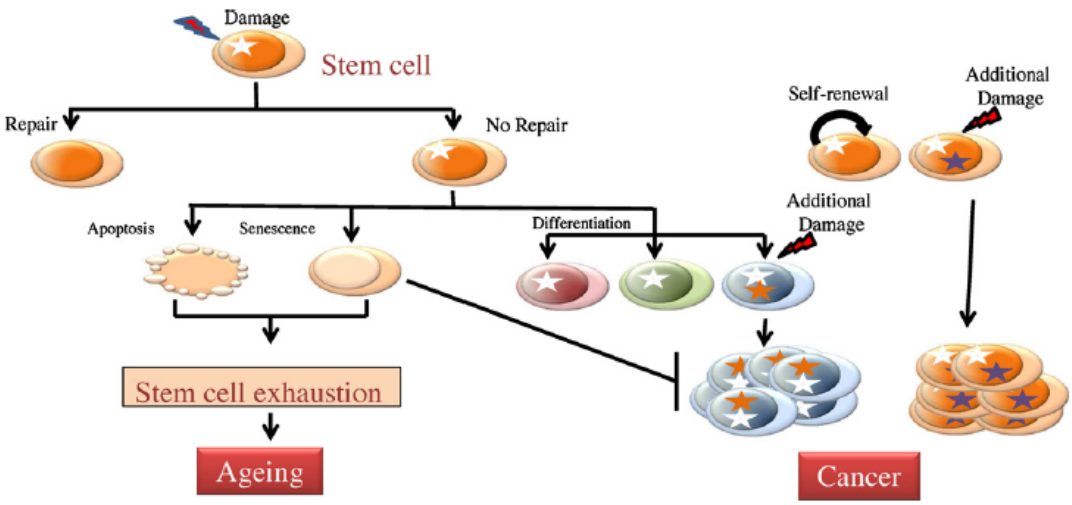


Fig. 2. The consequences of DNA damage in stem cells. DNA damage response (DDR) is activated following DNA damage in stem cells, leading to DNA repair, apoptosis or senescence. Over the lifetime of an organism, apoptosis and senescence may lead to exhaustion of the SC pool and to aging. If DNA is not properly repaired, SCs accumulate mutations, which may be propagated within the SC population through self-renewal and passed on to daughter cells during SC differentiation. Mutations that confer a selective advantage in SCs may generate a pool of fast-growing cells that, with the accumulation of more mutations over time, leads eventually to the development of drug-resistant cancer.

controls the responses to a much broader spectrum of DNA damage, including lesions that interfere with DNA replication, such as SSBs and stalled DNA replication forks [39]. Besides, ATM and ATR signaling also increase DNA repair by inducing, recruiting and activating repair proteins by modulating post-transcriptional modifications like phosphorylation or SUMOylation [40].

The well-orchestrated action of these proteins has several possible outcomes. One of the consequences of DDR is the arrest of the cell-cycle progression aiming the DNA damage resolution and ultimately cell survival [41,42]. Alternatively, if repair of the lesion is impossible, the cell may be driven to senescence, be eliminated by apoptosis or (in the case of stem cells) proceed to differentiation (Fig. 2).

In fact, several studies have demonstrated a direct link between reduced DNA repair capacity and loss of genomic integrity leading to differentiation or impaired function (self-renewal) of AS cells [43]. Mutations in genes related to NHEJ (ligase IV and Ku80), NER (XPD) or telomere maintenance (mTR) were associated with impairment of hematopoietic stem cell function, e.g., decreased self-renewal and age-dependent loss of bone marrow cellularity and erythropoiesis [44]. Reese et al. have found that Msh2$^{-/-}$ murine hematopoietic SCs accumulate genomic damage leading to loss of repopulating capacity, confirming that MMR machinery is required for maintenance of stem cell function [45]. Also mouse hematopoietic SCs lacking functional FANCD1 and BRCA2 exhibited marked proliferation and self-renewing defect [46]. Moreover, it has been shown that loss of stem cell function is not limited to nuclear DNA damage, hence neural stem cells subjected to mitochondrial DNA damage compromise their self-renewal ability and shift their differentiation direction toward an astrocytic lineage [47].

The fate of cells following DNA damage is directly related to the severity of the insult and the rate of repair, and is specially determined by the duration and degree of the activation of p53 signaling. Thus, the faster the damaged DNA is repaired, the weaker is the activation of p53, preventing cellular apoptosis. The sensitivity to DNA damage and p53-induced apoptosis varies greatly among AS cells [48,49]. For example, hair-follicle-bulge AS cells have been shown to rely on two mechanisms for increasing their resistance to cell death induced by IR exposure: a higher level of expression of the anti-apoptotic gene *Bcl-2* and activation of p53 for a shorter period. Of note, p53 attenuation is due to a higher activity of NHEJ repair mechanism displayed by those stem cells [24].

If the DNA damage escapes DDR or is misrepaired, mutations may accumulate in the stem cell pool, generating genetic instability. The mutated genome may then be propagated and amplified either horizontally (by the self-renewal of stem cells) or vertically (to downstream progeny through differentiation). Mutations that confer a selective advantage to stem cells or progenitor cells have the possibility of being further amplified through the process of clonal expansion. Over time, this large pool of cells may acquire additional mutations that, in turn, may eventually lead to tumorigenesis [50]. Therefore, robust DNA repair efficiency is crucial for the prevention of aging and diseases such as cancer (Fig. 2).

4. Cancer stem cells: the dark side of DNA repair

Because AS cells are long-lived, there is a relatively high probability that a given AS cell will acquire the mutation(s) necessary for the transformation process. AS cells and malignant cells both possess an important common feature: the unlimited capacity for cell division [51]. Cancer stem (CS) cells are a small population of cells within tumors that have the potential for indefinite self-renewal and differentiation [52]. CS cells are characterized by the ability to "recapitulate the generation of a continuously growing tumor" [53]; i.e., they are capable of initiating a tumor in immune-compromised mice, and the growing tumor, following a series of transplantations, is able to recapitulate the heterogeneity of the primary tumor.

CS cells are important in cancer biology because, like other stem cells, they are able to persist for the lifetime of the organism. In practical terms, they are resistant to radiotherapy and chemotherapy [54,55]. Resistance to anticancer treatment, in the case of glioma stem (GS) cells, is related to the activation of pathways that are linked to cell proliferation, such as the phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K)–Akt pathway. Akt inhibitors are capable of sensitizing GS cells to chemotherapeutic agents and IR exposure [56,57]. Enhanced activation of DNA damage checkpoints may contribute to the increased resistance of CS cells to genotoxic agents; e.g., GS cells, in comparison to differentiated cells, display higher

activation of the checkpoint effector proteins checkpoint kinase-1 (Chk 1) and checkpoint kinase-2 (Chk 2) in response to IR [58]. However, the role of DNA repair pathways in the resistant phenotype of CS cells remains controversial because some groups did not observe increased DNA repair capacity in CS cells [9,59].

Many studies are being performed to determine the molecular markers of CS cells and to elucidate the biological mechanisms that are responsible for their increased resistance to radiotherapy and chemotherapy. Hopefully, it may be possible in the near future to manipulate CS cells to increase their sensitivity to anticancer therapy, thereby increasing the efficiency of treatment protocols [60].

5. The intimate relationships between DNA repair, stem cells and aging

Over the lifetime of an organism, stem cell elimination and senescence eventually lead to stem cell exhaustion and consequent aging. Thus, the hallmark of aging is the loss of regenerative capacity of tissue-specific stem cells, resulting from the depletion of the stem cell pool (through either apoptosis or differentiation following DNA damage) and ultimately to the impairment of tissue and organ functions. There is abundant evidence that the accumulation of cellular damage over a lifetime is the primary cause of age-dependent stem cell decline [61–64]. Inherited defects in DNA repair mechanisms cause progeroid or accelerated aging symptoms [65]. Cockayne syndrome, xeroderma pigmentosum (in some cases), Werner syndrome, Hutchinson–Gilford progeria syndrome, ataxia telangiectasia, trichothiodystrophy, and Rothmund–Thomson syndrome are some of the diseases most clearly related to DNA repair defects [66–68]. DNA damage generated spontaneously by the byproducts of cell metabolism (e.g., ROS), induces increased cell death when DNA repair is faulty, which may lead to tissue (e.g., neuronal tissue) degeneration and reduced cell renewal capacity of stem cells. The results of studies of NER deficiency syndromes indicate that the DNA repair of damage induced by oxidative stress is defective in cells from patients with symptoms related to developmental problems, neurodegeneration or progeria, but not in cells from patients with mutation in the same gene who do not present such symptoms [69,70]. Curiously, cells from patients with a mutation in the gene *XPC*, who do not present a clinical phenotype related to neurodegeneration or progeria, were also reported to be defective in their ability to repair DNA damage induced by oxidative stress [71]. In fact, there is evidence that the complex XPC-HR23B stimulates the activity of OGG1, the glycosylase responsible for recognizing and initiating the repair of 8-oxoGua, one of the most abundant oxidized bases [72]. These controversial results indicate that oxidatively generated damage is necessary but not sufficient for the more severe symptoms related to progeria observed in these patients. Further studies regarding the possible occurrence of such differences in stem cells are important to clarify not only the consequences of genotoxic damage in the aging process but also the role of the aging-related protective effects of stem cells.

Consistent with the DNA damage-based theory of aging, some knockout mice for genes related to DNA repair present symptoms related to neurological diseases and premature aging [64,73]. Under genotoxic stress, the hematopoietic stem cells of NER or NHEJ deficient mice displayed increased apoptosis levels and reduced proliferation and self-renewal, leading to functional exhaustion [74]. Proteins of NER and BER are also responsible for protecting DNA damage in mitochondria, which may ultimately lead to aging: the NER proteins CSA and CSB were also found to be targeted to mitochondria after oxidative stress, as well as they were shown to interact with the BER glycosylase OGG1. The absence of one of these proteins leads to loss of subcutaneous fat by apoptosis caused by accumulation of damage in mtDNA, one of the major characteristics of aging both in normal and progeroid-affected organisms [75]. Other relevant factor may include the induction of autophagy by CSB protein to remove damaged mitochondria, as a consequence, CSB defective cells exhibit mitochondrial dysfunction and increased metabolism [76].

A recent study showed that muscle-derived stem/progenitor (MDSP) cells from old or progeroid mice (ERCC1$^{-/-}$ mice) had reduced proliferation and differentiation potential [77]. A single injection of MDSP cells derived from young wild-type mice was able to restore the proliferation and differentiation of ERCC1$^{-/-}$ MDSP cells, and transplantation of MDSP cells increased the lifespan of ERCC1$^{-/-}$ mice more than 3-fold. The transplanted MDSP cells improved the health and lifespan of progeroid mice even though limited donor cell engraftment was detected, suggesting that the cells exerted their therapeutic effect through secreted factors. Consistent with this concept, a parabiotic pairing between a young and an old mouse, in which the two mice shared a single circulatory system, revealed that young systemic molecular signaling enhanced the proliferation and activation of aged myogenic progenitor cells [78].

The lifespan increase observed in ERCC1$^{-/-}$ mice following the transplantation of MDSP cells from a younger mouse may seem inconsistent with the damage-based theory of aging. However, it is reasonable to speculate that the secreted factors that contribute to the inhibition of age-related phenotypes and to a prolonged lifespan direct or indirectly promote antioxidant effects. ROS, the natural by-products of oxidative energy metabolism, are often considered to be the major endogenous source of DNA damage related to aging [79]. Thus, a cell with an induced antioxidant defense might undergo less DNA damage, resulting in enhanced genomic stability and ultimately in greater longevity.

6. Embryonic stem cells have the highest DNA repair capacity

ES cells are defined by two remarkable properties: the ability to undergo indefinite self-renewal and the potential to differentiate into all of the tissues of the organism. Genomic instability and mutations in ES cells can compromise their ability to generate multiple cell types and lineages. Germ line cells may also be affected; i.e., the progeny derived from the original mutated ES cells may carry the mutation. In view of these potentially catastrophic effects of mutation, it is not surprising that ES cells possess powerful systems for maintaining their genomic integrity.

Regardless of enormous progress in the field of pluripotent stem cells, still there is a lack of knowledge related to their DNA repair capacities as compared to differentiated cells. In addition, most of the available data on DNA repair has been obtained using mouse, as opposed to human ES cells as models. Maynard et al. demonstrated that human ES cells display more efficient DNA repair than do somatic cells in response to various DNA damaging agents (hydrogen peroxide [H_2O_2], UV-C, IR and psoralen). The alkaline comet assay revealed that after exposure to 20 J/m^2 UV-C radiation, the two human ES cell lines tested showed more rapid repair kinetics than fibroblasts, indicating a more efficient NER activity [80]. Microarray analysis revealed that human ES cells have higher expression of several DNA repair genes, including some related to BER and DSB repair, when compared to human ES-differentiated cells. Thus, when human ES cells or its differentiated counterpart were treated with H_2O_2 the protein levels of OGG1 and APE1 were increased in the human ES cells. In accordance, the level of 8-oxoG lesions was lower in human ES cells than in fibroblasts due to a more efficient repair of oxidatively generated lesions [80].

Moreover, a higher level of proteins involved in MMR (MLH-1, MSH-2, MSH-6), HR (MRE11, NBS1, and RAD52) and NHEJ (XRCC4 and ligase IV) was detected in ES cells, when compared to

differentiated cell lines [81]. Consistent with these findings, human ES cells, in comparison with neural progenitors (NPs) or astrocytes, were shown to repair DSBs more efficiently and in an ATR-dependent HR manner. It was observed an elevated basal expression of RAD51 in the human ES cells (NP and astrocytes express 50% and 10% of Rad51 levels detected in ES cells, respectively). Also, after treatment with 2 Gy of IR, ES cells display efficient resolution of RAD51 foci, an indication of activation of HR [82]. In a different study, the NHEJ activity was investigated and although human ES cells showed lower NHEJ activity, the accuracy of repair in the ES cells was 1.4-fold and 2.6-fold higher when compared with NPs and astrocytes, respectively. While NHEJ is the predominant pathway in somatic cells for the repair of DSBs, HR is preferentially used in mouse and human ES cells [82,83]. However, when it comes to DNA repair capacity, differences were observed between mouse and human ES cells. As an example, mouse ES cells failed to rejoin half of the DSBs produced by high doses of IR exposure, while human ES cells were able to rapidly repair IR-induced DSBs [84]. Moreover, the NHEJ mechanism of human ES cells differs from that of somatic cells in that it is independent of ATM, DNA-PKcs and PARP, but dependent on XRCC4 [85]. However, recent observations showed that DNA-PKcs and NHEJ can participate in the repair of DSBs induced by IR exposure during late G2 in human ES cells [86]. Therefore, upon differentiation of human ES cells, the use of NHEJ to repair DSBs progressively increases, whereas the fidelity of repair decreases.

ES cells rely on two distinct mechanisms to preserve their genomic integrity. First, the cells display reduced levels of ROS, increased expression of antioxidants and higher activity and fidelity of repair mechanisms. Second, ES cells that are unable to repair their damaged DNA are eliminated from the stem cell population through differentiation or apoptosis [33]. Human ES cells display very low levels of mitochondrial mass and oxidative phosphorylation and obtain energy preferentially through non-oxidative glycolysis [87]. Mitochondrial proliferation and transcription increase significantly during the differentiation process [88,89] (Fig. 1), suggesting that mitochondrial activity plays an important role in the balance between self-renewal and differentiation in ES cells [90,91]. In addition, reduced expression levels of antioxidants and DNA repair genes and increased DNA damage were observed in spontaneously differentiated human ES cells [92].

The cell cycle of human ES cells is shorter than that of somatic cells. Human ES cells cycle through the same four phases (G1, S, G2, and M), but the duration of the G1 phase is much shorter and the transition from the G1 to S phase is facilitated by increased expression of CDK4 and cyclin D2 [93]. The unique kinetics of the G1 phase, and the partial deficiency of G1/S checkpoint, in ES cells allow damaged cells to progress into the S phase, in which the DNA damage is amplified, leading to cell death. Premature differentiation and senescence are alternative outcomes of DNA damage repair that are considered to exert a beneficial effect by restricting the accumulation of defective cells in the stem cell compartments. From an evolutionary perspective, the DDR-enforced differentiation of stem or precursor cells may therefore help to preserve the genomic integrity of a cell type, tissue, organism, or species. Following genotoxic stress, the tumor suppressor p53 is stabilized and activated, as in other cells, thereby preventing the accumulation of genetic mutations by inducing cell cycle arrest and DNA repair. In cases of severe or excessive DNA damage, p53 may induce apoptosis or senescence to eliminate potentially tumorigenic cells [94]. p53, acting as a transcription factor, may also directly repress the expression of important genes related to pluripotency, such as *nanog* [95]. Such repression is one of the major links between DNA damage and loss of pluripotency leading to cell differentiation.

7. DNA repair efficiencies in induced pluripotent stem cells and in embryonic stem cells are equivalent

iPS cells are obtained via the acquisition by fully differentiated cells of de novo pluripotency upon the overexpression of a defined set of transcriptional factors [5]. Human iPS cells share several characteristics with human ES cells, including self-renewal, differentiation into cell types of all three germ layers and the capacity to form teratomas when injected into immune-compromised mice [96]. iPS cells therefore have a wide range of potential medical applications. They represent a rejection-free tissue source for regenerative medicine and avoid the ethical restrictions or concerns regarding the use of human embryonic cells. iPS cells can be obtained from a variety of human tissues and serve as powerful tools for the elucidation of disease development and progression (so-called "disease in a dish" modeling) and for drug screening [97,98]. It is therefore crucial to confirm that iPS cells possess robust DNA repair mechanisms to ensure their genomic integrity for purposes of safe use in both disease modeling and cellular therapy strategies.

Because the development of human iPS cells is quite recent, few studies have addressed the DNA repair processes of these cells. A study comparing ES and iPS cells showed that their stress defense mechanisms are remarkably similar [99]. Similarly to ES cells, the DDR of iPS cells occurs in the absence of the G1/S checkpoint, and the cells undergo G2/M cell cycle arrest followed by efficient DSB repair resulting from high expression of DNA damage signaling and DSB repair genes [81]. The expression levels of DNA repair-related genes and of the NHEJ, HR, BER, MMR, and NER pathways were equivalent in iPS and ES cells and were generally higher in comparison with differentiated counterparts [81]. Another study showed that both human iPS and ES cells repaired DSBs very efficiently but expression levels of RAD51 and Ku70 were higher in iPS than in ES cells [100]. In spite of their active repair responses, human ES cells were found to be highly sensitive to IR exposure [101]. Human iPS cells responded in a comparable fashion following IR exposure, undergoing cell cycle arrest at the G2 phase through activation of ATM signaling and repairing DSBs by HR [81]. These findings demonstrate that iPS cells rely on highly efficient repair mechanisms to ensure genetic stability and indicate that DNA repair pathways are reprogrammed in the process of generating iPS cells.

Because reprogramming is not a fully controlled event, it is necessary to evaluate DNA repair capacities in every iPS cell line generated to characterize their genomic stability status. Recent studies have shown that iPS cells bear not only significant differences in their DNA repair capacities but also defects at both the genetic and epigenetic levels. Gore et al. demonstrated that at least half of the protein-coding point mutations present in twenty-two iPS cell lines analyzed were acquired during the reprogramming process, independently of the reprogramming method used [102]. Lister et al. studied the epigenetic alterations in some iPS cell lines and concluded that cells that were incompletely reprogrammed or possessed defects in methylation and histone modification patterns transmitted these alterations to their differentiated progeny at a high frequency [103]. In a recent study, an iPS cell line displayed a normal spectral karyotype but showed microsatellite instability and reduced DNA repair capacities in three out of four DNA repair pathways examined, indicating that incomplete reprogramming may lead to variability of DNA repair pathways [104]. These findings highlight the need to address not only the karyotype stability (as is the common current practice) but also the DNA repair capacities and to perform a complete analysis of both the genome and the methylome of each iPS cell line prior to its use in research or therapy.

Because many of the genes involved in the self-renewal potential of stem cells are also linked to pluripotency, cell cycle and reprogramming (i.e., oncogene c-Myc and tumor suppressor p53) [51], there are important concerns regarding the tumorigenic potential of iPS cells. Both human ES cells and iPS cells are able to form teratomas when injected into immune-compromised mice [105], and iPS cells have a slightly higher potential than ES cells in this regard [106]. The teratomas derived from iPS cells showed malignant features such as high mitotic rate and invasiveness [107] independently of the cell origin [108].

7.1. Cellular therapy using iPS cells

The milestone study by Takahashi et al. in 2007 [96] initiated a new era of regenerative medicine using human iPS cells. These cells offer the prospect of generating unlimited quantities of cells for autologous transplantation, with potential therapeutic application to a broad range of disorders [109]. For this purpose, iPS cell lines could be generated from a patient's somatic cells, corrected in vitro with the wild-type version of the gene, differentiated into the desired cell type and then transplanted back into the patient [110].

In spite of significant recent advances in the field, the reprogramming of somatic to iPS cells is an inefficient process. One alternative method for improving iPS cell generation is to suppress p53 activity in the differentiated cells [111,112]. Abrogation of this tumor suppressor gene was shown to allow efficient reprogramming even of cells with pre-existing DNA damage. Apparently this is due to the lack of DDR and decreased apoptosis induction in cells lacking p53. As a result, the impairment of p53 activity leads to the generation of iPS cells that carry persistent DNA damage and chromosomal abnormalities [113]. p53 thus ensures genomic integrity during reprogramming at the cost of reduced efficiency of the process. The fact that c-Myc is a well-known oncogene is also an important concern. Some studies have demonstrated the possibility of developing iPS cell lines without c-Myc [114,115]. Although the reprogramming occurred at a reduced frequency, these iPS cells did not induce tumor formation when injected in mice.

Other important factors regarding the efficiency and safety of iPS cells for therapy are the source of the somatic cells and the reprogramming methodology. Several studies have shown that different somatic cells have differing de-differentiation capacities, in terms of both the efficiency and the "end products" of the reprogramming process [116]. For example, mouse liver cells needed a smaller virus titer to be reprogrammed than did mouse fibroblasts [117]. Recent epigenetic studies of iPS cell lines showed that the cells harbor an epigenetic memory that makes them more easily differentiated into one or another cell type depending on the original somatic cell type. Each cell type contained residual methylation signatures that favored their differentiation into lineages related to the donor cell type [118].

The use of viral vectors and random integrative systems is undesirable for gene targeting because of their carcinogenic potential. Non-viral vectors, transient expression plasmids, proteins and even miRNAs are currently being tested and represent important strategies for obtaining iPS cell lines for regenerative medicine purposes [116,119–121].

7.2. iPS cell therapy for patients with DNA repair deficiencies

Several human pathologies are associated with DNA repair deficiencies. Some of these diseases, such as xeroderma pigmentosum (XPA-G), Cockayne syndrome (CSA-B), and ataxia telangiectasia (ATM), are candidates for gene therapy because the disease results from the loss of function of a single gene. The clinical features vary greatly among the DNA repair deficiency syndromes; symptoms include increased frequency of skin cancer, neurodegeneration and premature aging [122]. There is no cure or therapy to date for any of the syndromes mentioned above [123]. Xeroderma pigmentosum patients are NER deficient and therefore highly susceptible to skin cancer when exposed to sunlight [124]. Because of the accessibility of the skin and the fact that XP is a monogenic disease, XP patients are potentially good candidates for cellular therapy. In a recent study, a genetically corrected skin of an XP-C patient was obtained using a retrovirus to transfer the wild-type *XP-C* gene into keratinocytes [125]. However, there was concern regarding the use of an integrative virus-based strategy in terms of possible tumorigenicity. The generated skin also lacked melanocytes and was therefore unable to recapitulate the original skin color. The development of improved strategies for the cellular therapy of XP patients remains an urgent priority.

The generation of disease-free keratinocytes or even reconstituted skin from differentiated iPS cells may be established as an alternative approach for the regeneration and repair of damaged skin in XP patients. Until very recently, there were no protocols for the differentiation of iPS cells into multipotent keratinocytes. However, an exciting recent study demonstrated that functional keratinocytes could be obtained from mouse iPS cells through the sequential application of retinoic acid, bone morphogenetic protein-4 and growth on collagen IV-coated plates [126]. In another study, melanocytes were generated when iPS cell culture was supplemented with Wnt3a, SCF, and ET-3 [127]. Moreover, zinc finger nuclease technology has also emerged as a safe and efficient alternative to gene correction [128]. These findings are important steps toward autologous cellular therapy using iPS cells for the correction of many skin diseases in humans. XP fibroblasts, for example, could be genetically engineered to obtain full gene correction and reprogrammed into iPS cells, followed by differentiation into fibroblasts, keratinocytes, and melanocytes, to reconstitute a functional skin (Fig. 3).

7.3. Can a DNA repair deficient cell generate an iPS cell?

A breakthrough in cellular therapy for DNA repair deficient patients was achieved in 2009, when iPS cells were generated from corrected FA cells [129]. Fanconi anemia is a rare, multigenic disease caused by deficiency of the FA pathway and is commonly associated with progressive bone marrow failure and increased susceptibility to cancer [130]. In that study, FA-corrected iPS cells were differentiated into disease-free hematopoietic progenitors of the myeloid and erythroid lineages. However, the fact that Fanconi deficient fibroblasts could not be reprogrammed without prior genetic correction at that time raised the question of whether it was possible to obtain iPS cells from DNA repair deficient cells. This question was answered recently by Müller et al., who succeeded in reprogramming FA cells from different complementation groups from both mouse models and human patients. They were able to generate iPS cells from FA fibroblasts of FA-A and FA-C mouse models and also from FA-A, FA-C, FA-G and FA-D2 human fibroblasts (although at a much lower frequency). In the case of the mouse FA-A iPS cells, the frequency of iPS generation was greatly enhanced after correction of the deficiency using a FANCA retrovirus. The correction of the human fibroblasts prior to reprogramming yielded cells that had a normal karyotype and were capable of differentiating into erythroid and myeloid cell lineages, suggesting the feasibility of this approach for future therapeutic development [131].

Another study revealed that the XPC complex (XPC-RAD23B-CENTN2) acts as an Oct4/Sox2 co-activator in ES cells and plays an important role in pluripotency maintenance and differentiation of ES cells as well as in reprogramming of iPS cells. Downregulation of either XPC or RAD23B induced differentiation of mouse ES cells and promoted apoptosis, and low levels of XPC greatly reduced

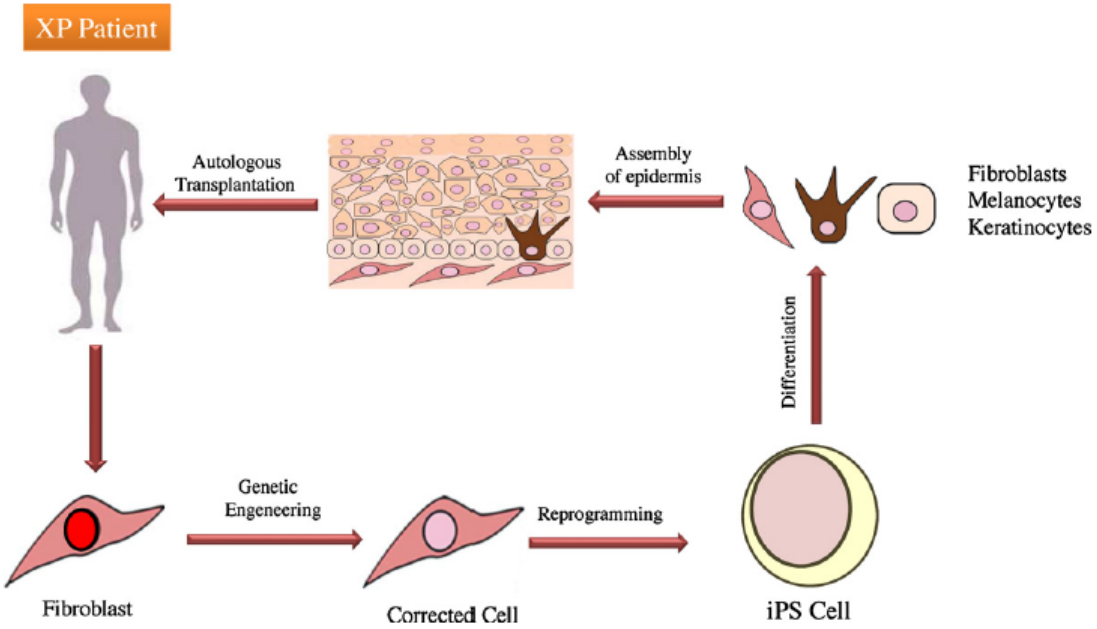


Fig. 3. An example of potential cellular therapy for XP patients using iPS cells. NER deficient adipocytes obtained via a liposuction procedure are corrected by homologous recombination (e.g., using zinc finger endonucleases). Disease-free cells are reprogrammed using non-viral vectors (e.g., microRNA, siRNA, protein factors, small molecules) followed by differentiation into fibroblasts, melanocytes and keratinocytes to reconstitute a functional skin. Autologous transplantation of disease-free skin to UV-exposed areas of xeroderma pigmentosum (XP) patients reduces clinical symptoms and tumor development.

reprogramming efficiency [132]. Interestingly, these effects of XPC on reprogramming are independent of its role in NER pathway. These findings showed that a functional XPC complex is crucial for obtaining iPS cells and that gene correction is required prior to reprogramming.

It should be noted that the above study was performed in mouse cells and that XP-C patients do not express the *XPC* gene. These patients have a high propensity to develop skin cancer but not developmental or neurological abnormalities, which would be expected if XPC was a key factor for the pluripotency maintenance of ES cells. This observation suggests that *XPC* deficiency is necessary but not sufficient for the impairment of ES cell or AS cell functionality. Because *XPC* deficiency promotes the differentiation and apoptosis of stem cells, one can speculate that XP-C patients may have a reduced stem cell pool.

Primary CSB fibroblasts were also successfully used to generate iPS cells [133]. However, these cells displayed increased oxidative stress and the accumulation of oxidatively generated DNA damage, which may be responsible for the increased rate of cell death in comparison with DNA repair proficient cells. CSB thus appears to play an important role in the maintenance of genomic integrity during the genetic reprogramming of pluripotent cells; this role may be relevant to the premature aging phenotype of these patients.

The results described here suggest potential problems from compromised DNA repair pathways during the reprogramming of adult cells into iPS cells. Pre-existing or new unrepaired DNA damage may impair transcriptional and replication processes and/or affect mitochondrial metabolism, thereby hampering the generation of these pluripotent cells. Continuing studies of these cells offer unique opportunities to investigate the effects of DNA repair processes on stem cells in general and how these processes affect human aging.

8. Concluding remarks

Genetic integrity is important for normal cell metabolism in general. Faulty DNA repair mechanisms may lead to increased cell death, resulting in a need for tissue regeneration, or increased mutation, which can generate tumors. Pluripotent stem cells are particularly susceptible to DNA damage, and DNA repair mechanisms are therefore crucial for maintaining the genomic stability of these cells. The elimination of the stem cell pool by DNA lesions reduces the ability of an organism to regenerate damaged tissues, leading to developmental problems, tissue degeneration and premature aging. Persistent mutations in stem cells not only reduce the ability of these cells to restore damaged tissues but also generate tumor cells that display a high flexibility to adapt to a variety of microenvironments in the body and to resist therapy.

Stem cells have attracted strong scientific interest in recent decades, particularly because of their potential therapeutic application. DNA repair studies have revealed, not surprisingly, that stem cells have a much greater capacity to address DNA damage than do their differentiated counterparts. Oxidative metabolism also appears to be lower in stem cells, providing protection from oxidative radicals. Cells that carry unrepaired lesions can be dangerous for stem cell therapy. To safely and reliably provide cells for therapeutic and research purposes, it is crucial to ensure that their genomic stability is robust. In the case of iPS cells, the reprogramming process requires an additional surveillance step at the level of epigenetic variation. The tumorigenic potential of stem cells is a major concern, and future studies should focus on ways to reduce such potential. CS cells play important roles in tumor responses to classical therapies, particularly chemotherapy. The multipotent features of CS cells and their ability to cope with DNA damage require further investigation.

Our understanding of the processes related to tissue degeneration, developmental problems, and premature aging observed in patients who suffer from defects in DNA damage repair and responses is still nebulous. There are many indications that stem cells are directly related to these syndromes, but the underlying mechanisms remain unclear. Our ability to generate iPS cells in the laboratory will provide tools to answer some of the fundamental questions involved. Experiments using these cells will reveal how

intricately linked the DNA repair and reprogramming processes are.

In conclusion, more research comparing stem cells and differentiated tissues, in vitro, and whenever possible in vivo, is needed to understand the nature, extent and consequences of the incomplete repair or faulty responses to DNA damage within an organism. These studies are essential for more effective use of stem cells in human therapy.

Conflict of interest statement

The authors declare no conflicts of interest.

Acknowledgments

This work is financially supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP, São Paulo, Brazil) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, Brasília, DF, Brazil). CRRR and LKL have fellowships from FAPESP.

References

[1] S. Lagerwerf, M.G. Vrouwe, R.M. Overmeer, M.I. Fousteri, L.H.F. Mullenders, DNA damage response and transcription, DNA Repair 10 (2011) 743–750.
[2] C.L. Peterson, J. Côté, Cellular machineries for chromosomal DNA repair, Genes Dev. 18 (2004) 602–616.
[3] P. Huertas, DNA resection in eukaryotes: deciding how to fix the break, Nat. Struct. Mol. Biol. 17 (2010) 11–16.
[4] J.H. Hoeijmakers, Genome maintenance mechanisms for preventing cancer, Nature 411 (2001) 366–374.
[5] K. Takahashi, S. Yamanaka, Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors, Cell 126 (2006) 663–676.
[6] J. Kenyon, S.L. Gerson, The role of DNA damage repair in aging of adult stem cells, Nucleic Acids Res. 35 (2007) 7557–7565.
[7] R.M.A. Costa, V. Chiganças, R.S. Galhardo, H. Carvalho, C.F.M. Menck, The eukaryotic nucleotide excision repair pathway, Biochimie 85 (2003) 1083–1099.
[8] S.C. Shuck, E.A. Short, J.J. Turchi, Eukaryotic nucleotide excision repair: from understanding mechanisms to influencing biology, Cell Res. 18 (2008) 64–72.
[9] G. Frosina, The bright and the dark sides of DNA repair in stem cells, J. Biomed. Biotechnol. 2010 (2010) 845396.
[10] T. Nouspikel, P.C. Hanawalt, Terminally differentiated human neurons repair transcribed genes but display attenuated global DNA repair and modulation of repair gene expression, Mol. Cell. Biol. 20 (2000) 1562–1570.
[11] T. Nouspikel, P.C. Hanawalt, Impaired nucleotide excision repair upon macrophage differentiation is corrected by E1 ubiquitin-activating enzyme, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 103 (2006) 16188–16193.
[12] T. Nouspikel, DNA repair in differentiated cells: some new answers to old questions, Neuroscience 145 (2007) 1213–1221.
[13] T.P. Nouspikel, N. Hyka-Nouspikel, P.C. Hanawalt, Transcription domain-associated repair in human cells, Mol. Cell. Biol. 26 (2006) 8722–8730.
[14] D.M. Wilson, V.A. Bohr, The mechanics of base excision repair, and its relationship to aging and disease, DNA Repair 6 (2007) 544–559.
[15] G.A. Hildrestrand, D.B. Diep, D. Kunke, N. Bolstad, M. Bjørås, S. Krauss, et al., The capacity to remove 8-oxoG is enhanced in newborn neural stem/progenitor cells and decreases in juvenile mice and upon cell differentiation, DNA Repair 6 (2007) 723–732.
[16] V. Rolseth, E. Rundén-Pran, L. Luna, C. McMurray, M. Bjørås, O.P. Ottersen, Widespread distribution of DNA glycosylases removing oxidative DNA lesions in human and rodent brains, DNA Repair 7 (2008) 1578–1588.
[17] G. Hildrestrand, C. Neurauter, D. Diep, C. Castellanos, S. Krauss, M. Bjoras, et al., Expression patterns of Neil3 during embryonic brain development and neoplasia, BMC Neurosci. 10 (2009) 45.
[18] L. Narciso, P. Fortini, D. Pajalunga, A. Franchitto, P. Liu, P. Degan, et al., Terminally differentiated muscle cells are defective in base excision DNA repair and hypersensitive to oxygen injury, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 104 (2007) 17010–17015.
[19] L. Krejci, V. Altmannova, M. Spirek, X. Zhao, Homologous recombination and its regulation, Nucleic Acids Res. 40 (13) (2012) 5795–5818.
[20] A.J. Hartlerode, R. Scully, Mechanisms of double-strand break repair in somatic mammalian cells, Biochem. J. 423 (2009) 157–168.
[21] M.R. Lieber, The mechanism of double-strand DNA break repair by the nonhomologous DNA end-joining pathway, Annu. Rev. Biochem. 79 (2010) 181–211.
[22] M.R. Lieber, Y. Ma, U. Pannicke, K. Schwarz, Mechanism and regulation of human non-homologous DNA end-joining, Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 4 (2003) 712–720.
[23] W.C. Prall, A. Czibere, M. Jäger, D. Spentzos, T.A. Libermann, N. Gattermann, et al., Age-related transcription levels of KU70, MGST1 and BIK in CD34+ hematopoietic stem and progenitor cells, Mech. Ageing Dev. 128 (2007) 503–510.
[24] P.A. Sotiropoulou, A. Candi, G. Mascre, S. De Clercq, K.K. Youssef, G. Lapouge, et al., Bcl-2 and accelerated DNA repair mediates resistance of hair follicle bulge stem cells to DNA-damage-induced cell death, Nat. Cell Biol. 12 (2010) 572–582.
[25] P. Modrich, Mechanisms in eukaryotic mismatch repair, J. Biol. Chem. 281 (2006) 30305–30309.
[26] I. Casorelli, E. Pelosi, M. Biffoni, A.M. Cerio, C. Peschle, U. Testa, et al., Methylation damage response in hematopoietic progenitor cells, DNA Repair 6 (2007) 1170–1178.
[27] A.D. D'Andrea, M. Grompe, The Fanconi anaemia/BRCA pathway, Nat. Rev. Cancer 3 (2003) 23–34.
[28] W.-T. Lu, K. Lemonidis, R.M. Drayton, T. Nouspikel, The Fanconi anemia pathway is downregulated upon macrophage differentiation through two distinct mechanisms, Cell Cycle 10 (2011) 3300–3310.
[29] T.U. Bracker, B. Giebel, J. Spanholtz, U.R. Sorg, L. Klein-Hitpass, T. Moritz, et al., Stringent regulation of DNA repair during human hematopoietic differentiation: a gene expression and functional analysis, Stem Cells 24 (2006) 722–730.
[30] K. Ito, A. Hirao, F. Arai, S. Matsuoka, K. Takubo, I. Hamaguchi, et al., Regulation of oxidative stress by ATM is required for self-renewal of haematopoietic stem cells, Nature 431 (2004) 997–1002.
[31] J. Rehman, Empowering self-renewal and differentiation: the role of mitochondria in stem cells, J. Mol. Med. 88 (2010) 981–986.
[32] K. Ito, A. Hirao, F. Arai, K. Takubo, S. Matsuoka, K. Miyamoto, et al., Reactive oxygen species act through p38 MAPK to limit the lifespan of hematopoietic stem cells, Nat. Med. 12 (2006) 446–451.
[33] J.M. Facucho-Oliveira, J.C. St John, The relationship between pluripotency and mitochondrial DNA proliferation during early embryo development and embryonic stem cell differentiation, Stem Cell Rev. 5 (2009) 140–158.
[34] K. Naka, T. Muraguchi, T. Hoshii, A. Hirao, Regulation of reactive oxygen species and genomic stability in hematopoietic stem cells, Antioxid. Redox Signal. 10 (2008) 1883–1894.
[35] J. Bartek, J. Lukas, Chk1 and Chk2 kinases in checkpoint control and cancer, Cancer Cell 3 (2003) 421–429.
[36] K.H. Wrighton, DNA repair: time to switch, Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 10 (2009) 371.
[37] C.S. Eichinger, S. Jentsch, 9-1-1: PCNA's specialized cousin, Trends Biochem. Sci. 36 (2011) 563–568.
[38] S.P. Jackson, J. Bartek, The DNA-damage response in human biology and disease, Nature 461 (2009) 1071–1078.
[39] J. Smith, L.M. Tho, N. Xu, D.A. Gillespie, The ATM-Chk2 and ATR-Chk1 pathways in DNA damage signaling and cancer, Adv. Cancer Res. 108 (2010) 73–112.
[40] M.S.Y. Huen, J. Chen, The DNA damage response pathways: at the crossroad of protein modifications, Cell Res. 18 (2008) 8–16.
[41] J. Rouse, S.P. Jackson, Interfaces between the detection, signaling, and repair of DNA damage, Science 297 (2002) 547–551.
[42] K.A. Bernstein, R. Rothstein, At loose ends: resecting a double-strand break, Cell 137 (2009) 807–810.
[43] M. Simonatto, L. Latella, P.L. Puri, DNA damage and cellular differentiation: more questions than responses, J. Cell. Physiol. 213 (2007) 642–648.
[44] A. Nijnik, L. Woodbine, C. Marchetti, S. Dawson, T. Lambe, C. Liu, et al., DNA repair is limiting for haematopoietic stem cells during ageing, Nature 447 (2007) 686–690.
[45] J.S. Reese, L. Liu, S.L. Gerson, Repopulating defect of mismatch repair—deficient hematopoietic stem cells, Blood 102 (2003) 1626–1633.
[46] S. Navarro, N.W. Meza, O. Quintana-Bustamante, J.A. Casado, A. Jacome, K. McAllister, et al., Hematopoietic dysfunction in a mouse model for Fanconi anemia group D1, Mol. Ther. 14 (2006) 525–535.
[47] W. Wang, Y. Esbensen, D. Kunke, R. Suganthan, L. Rachek, M. Bjørås, et al., Mitochondrial DNA damage level determines neural stem cell differentiation fate, J. Neurosci. 31 (2011) 9746–9751.
[48] C. Blanpain, M. Mohrin, P.A. Sotiropoulou, E. Passegu, DNA-damage response in tissue-specific and cancer stem cells, Cell Stem Cell. 8 (2011) 16–29.
[49] P. Fortini, C. Ferretti, B. Pascucci, L. Narciso, D. Pajalunga, E.M.R. Puggioni, et al., DNA damage response by single-strand breaks in terminally differentiated muscle cells and the control of muscle integrity, Cell Death Differ. (2012), http://dx.doi.org/10.1038/cdd.2012.53 (Epub ahead of print).
[50] P.K. Mandal, C. Blanpain, D.J. Rossi, DNA damage response in adult stem cells: pathways and consequences, Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 12 (2011) 198–202.
[51] T. Reya, S.J. Morrison, M.F. Clarke, I.L. Weissman, Stem cells, cancer, and cancer stem cells, Nature 414 (2001) 105–111.
[52] R.W. Cho, M.F. Clarke, Recent advances in cancer stem cells, Curr. Opin. Genet. Dev. 18 (2008) 48–53.
[53] M.F. Clarke, J.E. Dick, P.B. Dirks, C.J. Eaves, C.H.M. Jamieson, D.L. Jones, et al., Cancer stem cells—perspectives on current status and future directions: AACR workshop on cancer stem cells, Cancer Res. 66 (2006) 9339–9344.
[54] D.J. Barnes, J.V. Melo, Primitive, quiescent and difficult to kill: the role of non-proliferating stem cells in chronic myeloid leukemia, Cell Cycle 5 (24) (2006) 2862–2866.
[55] H. Clevers, The cancer stem cell: premises, promises and challenges, Nat. Med. 17 (2011) 313–319.
[56] M.-A. Westhoff, J.A. Kandenwein, S. Karl, S.H.K. Vellanki, V. Braun, A. Eramo, et al., The pyridinylfuranopyrimidine inhibitor PI-103, chemosensitizes glioblastoma cells for apoptosis by inhibiting DNA repair, Oncogene 28 (2009) 3586–3596.
[57] G.D. Kao, Z. Jiang, A.M. Fernandes, A.K. Gupta, A. Maity, Inhibition of phosphatidylinositol-3-OH kinase/Akt signaling impairs DNA repair in glioblastoma cells following ionizing radiation, J. Biol. Chem. 282 (2007) 21206–21212.

[58] X. Wang, V.C.H. Lui, R.T.P. Poon, P. Lu, R.Y.C. Poon, DNA damage mediated s and g(2) checkpoints in human embryonal carcinoma cells, Stem Cells 27 (2009) 568–576.
[59] S. Bao, Q. Wu, R.E. McLendon, Y. Hao, Q. Shi, A.B. Hjelmeland, et al., Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response, Nature 444 (2006) 756–760.
[60] L.E. Ailles, I.L. Weissman, Cancer stem cells in solid tumors, Curr. Opin. Biotechnol. 18 (2007) 460–466.
[61] L.J. Niedernhofer, G.A. Garinis, A. Raams, A.S. Lalai, A.R. Robinson, E. Appeldoorn, et al., A new progeroid syndrome reveals that genotoxic stress suppresses the somatotroph axis, Nature 444 (2006) 1038–1043.
[62] Y. Park, S.L. Gerson, DNA repair defects in stem cell function and aging, Annu. Rev. Med. 56 (2004) 495–508.
[63] T.B.L. Kirkwood, Understanding the odd science of aging, Cell 120 (2005) 437–447.
[64] L.J. Niedernhofer, Nucleotide excision repair deficient mouse models and neurological disease, DNA Repair 7 (2008) 1180–1189.
[65] P. Hasty, J. Campisi, J. Hoeijmakers, H. van Steeg, J. Vijg, Aging and genome maintenance lessons from the mouse? Science 299 (2003) 1355–1359.
[66] A.A. Freitas, J.P. de Magalhães, A review and appraisal of the DNA damage theory of ageing, Mutat. Res. 728 (2011) 12–22.
[67] K. Diderich, M. Alanazi, J.H.J. Hoeijmakers, Premature aging and cancer in nucleotide excision repair-disorders, DNA Repair 10 (2011) 772–780.
[68] P.R. Musich, Y. Zou, DNA-damage accumulation and replicative arrest in Hutchinson–Gilford progeria syndrome, Biochem. Soc. Trans. 39 (2011) 1764–1769.
[69] T. Nardo, R. Oneda, G. Spivak, B. Vaz, L. Mortier, P. Thomas, et al., A UV-sensitive syndrome patient with a specific CSA mutation reveals separable roles for CSA in response to UV and oxidative DNA damage, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 106 (2009) 6209–6214.
[70] T. Stevnsner, M. Muftuoglu, M.D. Aamann, V.A. Bohr, The role of Cockayne syndrome group B (CSB) protein in base excision repair and aging, Mech. Ageing Dev. 129 (2008) 441–448.
[71] S.N. Kassam, A.J. Rainbow, Deficient base excision repair of oxidative DNA damage induced by methylene blue plus visible light in xeroderma pigmentosum group C fibroblasts, Biochem. Biophys. Res. Commun. 359 (2007) 1004–1009.
[72] M. D'Errico, E. Parlanti, M. Teson, B.M.B. de Jesus, P. Degan, A. Calcagnile, et al., New functions of XPC in the protection of human skin cells from oxidative damage, EMBO J. 25 (2006) 4305–4315.
[73] B. Schumacher, G.A. Garinis, J.H.J. Hoeijmakers, Age to survive: DNA damage and aging, Trends Genet. 24 (2008) 77–85.
[74] D.J. Rossi, D. Bryder, J. Seita, A. Nussenzweig, J. Hoeijmakers, I.L. Weissman, Deficiencies in DNA damage repair limit the function of haematopoietic stem cells with age, Nature 447 (2007) 725–729.
[75] Y. Kamenisch, M. Fousteri, J. Knoch, A.K. von Thaler, B. Fehrenbacher, H. Kato, T. Becker, M.E. Dollé, R. Kuiper, M. Majora, M. Schaller, G.T. van der Horst, H. van Steeg, M. Röcken, D. Rapaport, J. Krutmann, L.H. Mullenders, M. Berneburg, Proteins of nucleotide and base excision repair pathways interact in mitochondria to protect from loss of subcutaneous fat, a hallmark of aging, J. Exp. Med. 207 (2010) 379–390.
[76] M. Scheibye-Knudsen, M. Ramamoorthy, P. Sykora, S. Maynard, P.-C. Lin, R.K. Minor, et al., Cockayne syndrome group B protein prevents the accumulation of damaged mitochondria by promoting mitochondrial autophagy, J. Exp. Med. 209 (2012) 855–869.
[77] M. Lavasani, A.R. Robinson, A. Lu, M. Song, J.M. Feduska, B. Ahani, et al., Muscle-derived stem/progenitor cell dysfunction limits healthspan and lifespan in a murine progeria model, Nat. Commun. 3 (2012) 608.
[78] I.M. Conboy, M.J. Conboy, A.J. Wagers, E.R. Girma, I.L. Weissman, T.A. Rando, Rejuvenation of aged progenitor cells by exposure to a young systemic environment, Nature 433 (2005) 760–764.
[79] R.S. Balaban, S. Nemoto, T. Finkel, Mitochondria, oxidants, and aging, Cell 120 (2005) 483–495.
[80] S. Maynard, A.M. Swistowska, J.W. Lee, Y. Liu, S.-T. Liu, A.B. Da Cruz, et al., Human embryonic stem cells have enhanced repair of multiple forms of DNA damage, Stem Cells 26 (2008) 2266–2274.
[81] O. Momcilovic, L. Knobloch, J. Fornsaglio, S. Varum, C. Easley, G. Schatten, DNA damage responses in human induced pluripotent stem cells and embryonic stem cells, PLoS ONE 5 (2010) e13410.
[82] B.R. Adams, S.E. Golding, R.R. Rao, K. Valerie, Dynamic dependence on ATR and ATM for double-strand break repair in human embryonic stem cells and neural descendants, PLoS ONE 5 (2010) e10001.
[83] E.D. Tichy, R. Pillai, L. Deng, L. Liang, J. Tischfield, S.J. Schwemberger, G.F. Babcock, P.J. Stambrook, Mouse embryonic stem cells but not somatic cells, predominantly use homologous recombination to repair double-strand DNA breaks, Stem Cells Dev. 19 (2010) 1699–1711.
[84] C.A. Bañuelos, J.P. Banáth, S.H. MacPhail, J. Zhao, C.A. Eaves, M.D. O'Connor, et al., Mouse but not human embryonic stem cells are deficient in rejoining of ionizing radiation-induced DNA double-strand breaks, DNA Repair 7 (2008) 1471–1483.
[85] B.R. Adams, A.J. Hawkins, L.F. Povirk, K. Valerie, ATM-independent, high-fidelity nonhomologous end joining predominates in human embryonic stem cells, Aging 2 (2010) 582–596.
[86] K.S. Bogomazova AN, M.A. Lagarkova, L.V. Tskhovrebova, M.V. Shutova, Error-prone nonhomologous end joining repair operates in human pluripotent stem cells during late G2, Aging 3 (2011) 584–596.
[87] J.C. St John, A. Amaral, E. Bowles, J.F. Oliveira, R. Lloyd, M. Freitas, et al., The analysis of mitochondria and mitochondrial DNA in human embryonic stem cells, Methods Mol. Biol. 331 (2006) 347–374.
[88] Y.M. Cho, S. Kwon, Y.K. Pak, H.W. Seol, Y.M. Choi, D.J. Park, et al., Dynamic changes in mitochondrial biogenesis and antioxidant enzymes during the spontaneous differentiation of human embryonic stem cells, Biochem. Biophys. Res. Commun. 348 (2006) 1472–1478.
[89] C.-T. Chen, Y.-R.V. Shih, T.K. Kuo, O.K. Lee, Y.-H. Wei, Coordinated changes of mitochondrial biogenesis and antioxidant enzymes during osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells, Stem Cells 26 (2008) 960–968.
[90] J.C. St John, J. Ramalho-Santos, H.L. Gray, P. Petrosko, V.Y. Rawe, C.S. Navara, et al., The expression of mitochondrial DNA transcription factors during early cardiomyocyte in vitro differentiation from human embryonic stem cells, Cloning Stem Cells 7 (2005) 141–153.
[91] T. Lonergan, C. Brenner, B. Bavister, Differentiation-related changes in mitochondrial properties as indicators of stem cell competence, J. Cell. Physiol. 208 (2006) 149–153.
[92] G. Saretzki, T. Walter, S. Atkinson, J.F. Passos, B. Bareth, W.N. Keith, et al., Downregulation of multiple stress defense mechanisms during differentiation of human embryonic stem cells, Stem Cells 26 (2008) 455–464.
[93] K.A. Becker, P.N. Ghule, J.A. Therrien, J.B. Lian, J.L. Stein, A.J. van Wijnen, et al., Self-renewal of human embryonic stem cells is supported by a shortened G1 cell cycle phase, J. Cell. Physiol. 209 (2006) 883–893.
[94] T. Zhao, Y. Xu, p53 and stem cells: new developments and new concerns, Trends Cell Biol. 20 (2010) 170–175.
[95] T. Lin, C. Chao, S. Saito, S.J. Mazur, M.E. Murphy, E. Appella, et al., p53 induces differentiation of mouse embryonic stem cells by suppressing Nanog expression, Nat. Cell Biol. 7 (2005) 165–171.
[96] K. Takahashi, K. Tanabe, M. Ohnuki, M. Narita, T. Ichisaka, K. Tomoda, et al., Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors, Cell 131 (2007) 861–872.
[97] A.R. Muotri, Modeling epilepsy with pluripotent human cells, Epilepsy Behav. 14 (Suppl. 1) (2009) 81–85.
[98] M.C.N. Marchetto, B. Winner, F.H. Gage, Pluripotent stem cells in neurodegenerative and neurodevelopmental diseases, Hum. Mol. Genet. 19 (2010) R71–R76.
[99] L. Armstrong, K. Tilgner, G. Saretzki, S.P. Atkinson, M. Stojkovic, R. Moreno, et al., Human induced pluripotent stem cell lines show stress defense mechanisms and mitochondrial regulation similar to those of human embryonic stem cells, Stem Cells 28 (2010) 661–673.
[100] J. Fan, C. Robert, Y.-Y. Jang, H. Liu, S. Sharkis, S.B. Baylin, et al., Human induced pluripotent cells resemble embryonic stem cells demonstrating enhanced levels of DNA repair and efficacy of nonhomologous end-joining, Mutat. Res. 713 (2011) 8–17.
[101] O. Momcilović, S. Choi, S. Varum, C. Bakkenist, G. Schatten, C. Navara, Ionizing radiation induces ataxia telangiectasia mutated-dependent checkpoint signaling and G(2) but not G(1) cell cycle arrest in pluripotent human embryonic stem cells, Stem Cells 27 (2009) 1822–1835.
[102] A. Gore, Z. Li, H.-L. Fung, J.E. Young, S. Agarwal, J. Antosiewicz-Bourget, et al., Somatic coding mutations in human induced pluripotent stem cells, Nature 471 (2011) 63–67.
[103] R. Lister, M. Pelizzola, Y.S. Kida, R.D. Hawkins, J.R. Nery, G. Hon, et al., Hotspots of aberrant epigenomic reprogramming in human induced pluripotent stem cells, Nature 471 (2011) 68–73.
[104] L.Z. Luo, S. Gopalakrishna-Pillai, S.L. Nay, S.-W. Park, S.E. Bates, X. Zeng, et al., DNA repair in human pluripotent stem cells is distinct from that in non-pluripotent human cells, PLoS ONE 7 (2012) e30541.
[105] U. Ben-David, N. Benvenisty, The tumorigenicity of human embryonic and induced pluripotent stem cells, Nat. Rev. Cancer 11 (2011) 268–277.
[106] I. Gutierrez-Aranda, V. Ramos-Mejia, C. Bueno, M. Munoz-Lopez, P.J. Real, A. Mácia, et al., Human induced pluripotent stem cells develop teratoma more efficiently and faster than human embryonic stem cells regardless the site of injection, Stem Cells 28 (2010) 1568–1570.
[107] J.E. Ohm, P. Mali, L. Van Neste, D.M. Berman, L. Liang, K. Pandiyan, et al., Cancer-related epigenome changes associated with reprogramming to induced pluripotent stem cells, Cancer Res. 70 (19) (2010) 7662–7673.
[108] K. Miura, Y. Okada, T. Aoi, A. Okada, K. Takahashi, K. Okita, et al., Variation in the safety of induced pluripotent stem cell lines, Nat. Biotechnol. 27 (2009) 743–745.
[109] M.C.N. Marchetto, C. Carromeu, A. Acab, D. Yu, G.W. Yeo, Y. Mu, et al., A model for neural development and treatment of Rett syndrome using human induced pluripotent stem cells, Cell 143 (2010) 527–539.
[110] M. Galach, J. Utikal, From skin to the treatment of diseases—the possibilities of iPS cell research in dermatology, Exp. Dermatol. 20 (2011) 523–528.
[111] Y. Zhao, X. Yin, H. Qin, F. Zhu, H. Liu, W. Yang, et al., Two supporting factors greatly improve the efficiency of human iPSC generation, Cell Stem Cell. 3 (2008) 475–479.
[112] H. Hong, K. Takahashi, T. Ichisaka, T. Aoi, O. Kanagawa, M. Nakagawa, et al., Suppression of induced pluripotent stem cell generation by the p53–p21 pathway, Nature 460 (2009) 1132–1135.
[113] R.M. Marion, K. Strati, H. Li, M. Murga, R. Blanco, S. Ortega, et al., A p53-mediated DNA damage response limits reprogramming to ensure iPS cell genomic integrity, Nature 460 (2009) 1149–1153.
[114] M. Nakagawa, M. Koyanagi, K. Tanabe, K. Takahashi, T. Ichisaka, T. Aoi, et al., Generation of induced pluripotent stem cells without Myc from mouse and human fibroblasts, Nat. Biotechnol. 26 (2008) 101–106.

[115] M. Wernig, A. Meissner, J.P. Cassady, R. Jaenisch, c-Myc is dispensable for direct reprogramming of mouse fibroblasts, Cell Stem Cell. 2 (2008) 10–12.
[116] M.I. Lai, W.Y. Wendy-Yeo, R. Ramasamy, N. Nordin, R. Rosli, A. Veerakumarasivam, et al., Advancements in reprogramming strategies for the generation of induced pluripotent stem cells, J. Assist. Reprod. Genet. 28 (2011) 291–301.
[117] M. Stadtfeld, N. Maherali, D.T. Breault, K. Hochedlinger, Defining molecular cornerstones during fibroblast to iPS cell reprogramming in mouse, Cell Stem Cell. 2 (2008) 230–240.
[118] K. Kim, A. Doi, B. Wen, K. Ng, R. Zhao, P. Cahan, et al., Epigenetic memory in induced pluripotent stem cells, Nature 467 (2010) 285–290.
[119] D. Huangfu, K. Osafune, R. Maehr, W. Guo, A. Eijkelenboom, S. Chen, et al., Induction of pluripotent stem cells from primary human fibroblasts with only Oct4 and Sox2, Nat. Biotechnol. 26 (2008) 1269–1275.
[120] C.A. Sommer, M. Stadtfeld, G.J. Murphy, K. Hochedlinger, D.N. Kotton, G. Mostoslavsky, Induced pluripotent stem cell generation using a single lentiviral stem cell cassette, Stem Cells 27 (2009) 543–549.
[121] S. Yamanaka, H.M. Blau, Nuclear reprogramming to a pluripotent state by three approaches, Nature 465 (2010) 704–712.
[122] M.C.S. Moraes, J.B.C. Neto, C.F.M. Menck, DNA repair mechanisms protect our genome from carcinogenesis, Front. Biosci. 17 (2012) 1362–1388.
[123] K.M. Lima-Bessa, D.T. Soltys, M.C. Marchetto, C.F.M. Menck, Xeroderma pigmentosum: living in the dark but with hope in therapy, Drug Future 34 (2009) 665–672.
[124] J.E. Cleaver, Cancer in Xeroderma pigmentosum and related disorders of DNA repair, Nat. Rev. Cancer 5 (2005) 564–573.
[125] E. Warrick, M. Garcia, C. Chagnoleau, O. Chevallier, V. Bergoglio, D. Sartori, et al., Preclinical corrective gene transfer in xeroderma pigmentosum human skin stem cells, Mol. Ther. 20 (2011) 798–807.
[126] G. Bilousova, J. Chen, D.R. Roop, Differentiation of mouse induced pluripotent stem cells into a multipotent keratinocyte lineage, J. Invest. Dermatol. 131 (2011) 857–864.
[127] S. Ohta, Y. Imaizumi, Y. Okada, W. Akamatsu, R. Kuwahara, M. Ohyama, et al., Generation of human melanocytes from induced pluripotent stem cells, PLoS ONE 6 (2011) e16182.
[128] D. Hockemeyer, F. Soldner, C. Beard, Q. Gao, M. Mitalipova, R.C. DeKelver, et al., Efficient targeting of expressed and silent genes in human ESCs and iPSCs using zinc-finger nucleases, Nat. Biotechnol. 27 (2009) 851–857.
[129] A. Raya, I. Rodriguez-Piza, G. Guenechea, R. Vassena, S. Navarro, M.J. Barrero, et al., Disease-corrected haematopoietic progenitors from Fanconi anaemia induced pluripotent stem cells, Nature 460 (2009) 53–59.
[130] L.J. Niedernhofer, A.S. Lalai, J.H.J. Hoeijmakers, Fanconi anemia (cross)linked to DNA repair, Cell 123 (2005) 1191–1198.
[131] L.U.W. Müller, M.D. Milsom, C.E. Harris, R. Vyas, K.M. Brumme, K. Parmar, et al., Overcoming reprogramming resistance of Fanconi anemia cells, Blood 119 (2012) 5449–5457.
[132] Y.W. Fong, C. Inouye, T. Yamaguchi, C. Cattoglio, I. Grubisic, R. Tjian, A DNA repair complex functions as an Oct4/Sox2 coactivator in embryonic stem cells, Cell 147 (2011) 120–131.
[133] L.N. Andrade, J.L. Nathanson, G.W. Yeo, C.F.M. Menck, A.R. Muotri, Evidence for premature aging due to oxidative stress in iPSCs from Cockayne syndrome, Hum. Mol. Genet. 21 (2012) 3825–3834.

Anexo 2: Tabela com as sequências dos *primers* utilizados

Nome do oligonucleotídeo	**Sequência**
POLB Forward	5' -ACGTAAACTGGAAAAGATTCGGC-3'
POLB Reverse	5' -GCCCAATTCGCTGATGATGGTTC-3'
GAPDH Forward	5´-CAAGGCTGTGGGCAAGGT – 3´
GAPDH Reverse	5´-GGACCATGCCAGTGA-3´
hFR3 1 Forward	5'-GACACGGCTGTGTATTACTGTGC-3'
hFR3 2 Forward	5'-GACACGGCCGTGTATTACTGTGC-3'
hFR3 3 Forward	5'-GACACCGCCATGTATTACTGTGC-3'
hFR3 4 Forward	5'-GACACAGCCACATATTACTGTGC-3'
hFR3 5 Forward	5'-GACACAGCCGTGTATTACTGTAC-3'
hFR3 6 Forward	5'-GACACGGCCTTGTATTACTGTGC-3'
hiJH4-5 Reverse	5'-GTCGAACCAGTTGTCACATTGTG-3'

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

Aas PA, Otterlei M, Falnes PØ, Vågbø CB, Skorpen F, Akbari M, et al. Human and bacterial oxidative demethylases repair alkylation damage in both RNA and DNA. Nature 2003; 421: 859-63.

Aamann MD, Sorensen MM, Hvitby C, Berquist BR, Muftuoglu M, Tian J, et al. Cokayne syndrome group B protein promotes mitochondrial DNA stability by supporting the DNA repair association with the mitochondrial membrane. FASEB J 2010; 24: 2334-46.

Aamann MD, Hvitby C, Popuri V, Muftuoglu M, Lemminger L, Skeby CK, et al. Cockayne syndrome group B protein stimulates NEIL2 DNA glycosylase activity. Mech Ageing Dev 2014; 135: 1-14.

Adimoolam S, Ford JM. P53 and DNA damage-inducible expression of the xeroderma pigmentosum group C gene. Proc Natl Acad Sci 2002; 99(20): 12985-90.

Ahmad A, Robinson AR, Duensing A, van Drunen, Beverloo HB, Weisberg DB, et al. ERCC1-XPF endonuclease facilitates DNA double-strand break repair. Mol Cell Biol 2008; 28: 5082-92.

Ahmad A, Enzlin JH, Bhagwat NK, Wijgers N, Raams A, Appledoorn E, et al. Mislocalization of XPF-ERCC1 nuclease contributes to reduced DNA repair in XP-F patients. Plos Gen 2010; 6(3): e1000871.

Akhtar MJ, Ahamed M, Kumarc S, Siddiqui H, Patil G, Ashquin M, Ahmada I. Nanotoxicity of pure silica mediated through oxidant generation rather than glutathione depletion in human lung epithelial cells. Toxicol 2010; 276: 95-102.

Aleksandrov LB, Nik-Zainal S, Wedge DC, Aparicio AJR, Behjati S, Biankin AV, et al. Signatures of mutational processes in human cancer. Nature 2013; 500: 415-24.

Albertella MR, Green CM, Lehmann AR, O´Connor MJ. A role for polymerase eta in the cellular tolerance to cisplatin-induced damage. Cancer Res 2005; 65(21): 9799-806.

Allgayer J, Kitsera N, von der Lippen C, Epe B, Khobta A. Modulation of base excision repair of 8-oxoguanine by the nucleotide sequence. Nucleic Acids Res 2013; 41(18): 855-971.

Andressoo JO, Mitchell JR, de Wit J, Hoogstraten D, Volker M, Toussaint W, et al. An Xpd mouse model for the combined xeroderma pigmentosum/Cockayne syndrome exhibiting both cancer predisposition and segmental progeria. Cancer Cell 2006; 10(2): 121-32.

Araki M, Masutani C, Takemura M, Uchida A, Sugasawa K, Kondoh J, et al. Centrosome protein centrin 2/caltractin 1 is part of the xeroderma pigmentosum group C complex that initiates global genome nucleotide excision repair. J Biol Chem 2001; 276: 18665-72.

Arlett CF, Green MH, Rogers PB, Lehmann AR, Plowman PN. Minimal ionizing radiation sensitivity in a large cohort of xeroderma pigmentosum fibroblasts. Br J Radiol 2008; 81(961): 51-8.

Armelini MG, Muotri AR, Marchetto MCN, Lima-Bessa KM, Sarasin A, Menck CFM. Restoring DNA repair capacity of cells from the three distinct diseases by XPD gene-recombinant adenovirus. Cancer Gene Ther 2005; 12: 389-96.

Atkinson J, McGlynn P. replicative fork reversal and the maintenance of genoma stability. Nucleic Acids Res 2009; 37(11): 3475-92.

* De acordo com: *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver).

Bagg A, Kenyon CJ, Walker GC. Inducibility of a gene product required for UV and chemical mutagenesis in Escherichia coli. Proc Natl Acad Sci USA 1981; 78(9): 5749-53.

Ballmaier D, Epe B. DNA damage by bromate: mechanisms and consequences. Toxicoloy 2006; 221(2-3): 166-71.

Banerjee D, Mandal SM, Das A, Hegde ML, Das S, Bhakat KK, et al. Preferential repairo f oxidized base damage in the transcribed genes of mammalian cells. J Biol Chem 2011; 286(8): 6006-16.

Bardwell PD, Woo CJ, Wei K, Li Z, Martin A, Sack SZ, et al. Altered somatic hypermutation and reduced class-switch recombination in exonuclease 1-mutant mice. Nat Immunol 2004; 5(2):224–9.

Barckhausen C, Roos WP, Naumann SC, Kaina B. Malignant melanoma cells acquire resistance to DNA interstrand cross-linking chemotherapeutics by p53-triggered upregulation of DDB2/XPC-mediated DNA repair. Oncogene 2013; doi: 10.1038/onc.2013.141.

Barrett SF, Robbins JH, Tarone RE, Kraemer KH. Evidence for defective repair of cyclobutane pyrimidine dimmers with normal repair of other DNA photoproducts in a transcriptioanlly active gene transfected into Cokayne syndrome cells. Mutat Res 1991; 255(3): 281-91.

Bartsch H, Nair J. Oxidative stress and lipid peroxidation-derived DNA-lesions in inflammation driven carcinogenesis. Cancer Detec Prev 2004; 28: 385-91.

Bassett E, King NM, Bryant MF, Hector S, Pendyala L, Chaney SG, Cordeiro-Stone M. The role of DNA lolymerase eta in translesion synthesis past platinum-DNA adducts in human fibroblasts. Cancer Res 2004; 64: 6469-75.

Batista LF, Kaina B, Meneghini R, Menck CF. How DNA lesions art turned into powerful killing structures: insights from UV-induced apoptosis. Mutat Res 2009; 681(2-3): 197-208.

Bennett PV, Cintrons NS, Gros L, Laval J, Sutherland BM. Are endogenous clustered DNA damages induced in human cells? Free Radic Biol Med 2004; 37(4): 488-99.

Bergink S, Toussaint W, Luijsterburg MS, Dinant C, Alekseev S, Hoeijmakers JH, et al. Recognition of DNA damage by XPC coincides with disruption of the XPC-RAD23 complex. J Cell Biol 2012; 196(6): 681-88.

Bergoglio V, Boyer AS, Walsh E, Naim V, Legube G, Lee MY, et al. DNA synthesis by Pol η promotes fragile site stability by preventing under-replicated DNA in mitosis. J Cell Biol 2013; 201(3): 395-408.

Bernardes de Jesus BM, Bjoras M, Coin F, Egly JM. Dissectoin of the molecular defects caused by pathogenic mutations in the DNA repair factor XPC. Mol Cell Biol 2008; 28: 7225-35.

Bernier J, Hall EJ, Giaccia A. Radiation oncology: a century of achievements. Nat Rev Cancer 2004; 4: 737-47.

Berquist BR, Wilson DM III. Pathways for repairing and tolerating the spectrum of oxidative DNA lesions. Cancer Lett 2012; 327(1-2): 61-72.

Berra CM, de Oliveira CS, Garcia CCM, Rocha CR, Lerner LK, Lima LCA, et al. Nucleotide excision repair activity on DNA damage induced by photoactivated methylene blue. Free Radic Biol Med 2013; 61C: 343-56.

Bétermier M, Bertrand P, Lopez B. Is non-homologous end-joining really an inherently error-prone process? Plos Gen 2014; 10(1): e1004086.

Bétous R, Rey L, Wang G, Pillaire MJ, Pujet N, Selves J, et al. Role of TLS DNA polymerases eta and kappa in processing naturally occurring structured DNA in human cells. Mol Carcinog 2009; 48(4): 369-78.

Bienko M, Green CM, Sabbioneda S, Crosetto N, Matic I, Hibbert RG, et al. Regulation of translesion synthesis DNA polymerase eta by monoubiquitination. Mol Cell 2010; 37(3): 396-407.

Biertümpfel C, Zhao Y, Kondo Y, Ramón-Maiques S, Gregory M, Lee JY, et al. Structure and mechanism of human DNA polymerase eta. Nature 2010; 465(7301): 1044-8.

Blazquez-Castro A, Stockert JC, Sanz-Rodriguez F, Zamarron A, Juarranz A. Differential photodynamic response of cultured cells to methylene blue and toluidine blue: role of dark redox processes. Photochem Photobiol Sci 2009; 8(3): 371-76.

Bohr VA, Smith CA, Okumoto DS, Hanawalt PC. DNA repair in an active gene: removal of pyrimidine dimmers from the DHFR gene of CHO cells is much more efficient than in the genome overall. Cell 1985; 40(2): 359-69.

Bohr VA, Ottersen OP, Tønjum T. Genome instability and DNA repair in brain, ageing and neurological disease. Neuroscience 2007; 145: 1183-86.

Boiteaux S, Gajewski E, Laval J, Dizdaroglu M. Substrate specificity of the Escherichia coli Fpg protein (formamidopyrimidine-DNA glycosylase): excision of purine lesions in DNA produced by ionizing radiation or photosensitization. Biochemistry 1992; 31(1): 106-10.

Botta E, Nardo T, Lehmann AR, Egly JM, Pedrini AM, Stefanini M. Reduced level of the repair/transcription factor TFIIH in trichothiodystrophy. Hum Mol Genet 2002; 11(23): 2919-28.

Botta E, Offman J, Nardo T, Ricotti R, Zambruno G, Sansone D, et al. Mutations in the C7orf11 (TTDN1) gene in six nonphotosensitive trichothiodystrophy patients: no obvious genotype-phenotype relationships. Hum Mutat 2007; 28(1): 92-6.

Boyer AS, Grgurevic S, Cazaux C, Hoffmann JS. The human specialized DNA polymerase and non-B DNA: vital relationships to preserve genome integrity. J Mol Biol 2013; 425(23): 4767-81.

Bowden NA, Ashton KA, Avery-Kiejda KA, Zhang XD, Hersey P, Scott RJ. Nucleotide excision repair gene expression after Cisplatin treatment in melanoma. Cancer Res 2010; 70(20): 7918-26.

Bradford PT, Goldstein AM, Tamura D, Khan SG, Ueda T, Boyle J, et al. Cancer and neurologic degeneration in xeroderma pigmentosum: long-term follow-up characterizes the role of DNA repair. J Med Genet 2011; 48(3): 168-76.

Brettel K, Byrdin M. Reaction mechanisms of DNA photolyase. Curr Opin Struct Biol 2010; 20(6): 693-701.

Brooks PJ. The case for 8,5'-cyclopurine-2'-deoxynucleosides as endogenous DNA lesions that cause neurodegeneration in Xeroderma Pigmentosum. Neuorscience 2007; 145: 1407-17.

Brooks BP, Thompson AH, Bishop RJ, Clayton JA, Chan CC, Tsilou ET, et al. Ocular manifestations of xeroderma pigmentosum: long-term follow-up highlights the role of DNA repair in protection from sun damage. Ophtalmology 2013; 120(7): 1324-36.

Brooks PJ. Blinded by the UV light: how the focus on transcription-coupled NER has distracted from understanding the mechanisms of Cockayne syndrome neurologic disease. DNA Repair (Amst) 2013; 12(8): 656-71.

Brosh RM. DNA helicases involved in DNA repair and their roles in cancer. Nat Rev Cancer 2013; 13: 542-58.

Broughton BC, Steingrimsdottir H, Weber CA, Lehmann AR. Mutations in the xeroderma pigmentosum group D DNA repair/transcription gene in patients with trichothiodistrophy. Nat Genet 1994; 7(2): 189-94.

Broughton BC, Thompson AF, Harcourt SA, Vermeulen W, Hoeijmakers JH, Botta E, et al. Molecular and cellular analysis of the DNA repair defect in a patient with xeroderma pigmentosum complementation group D who has the clinical features of xeroderma pigmentosum and Cockayne syndrome. Am J Hum Gen 1995; 56: 167-74.

Broyde S, Wan L, Rechkoblit O, Geacintov NE, Patel DJ. Lesion processing: high-fidelity versus lesion-bypass DNA polymerases. Trends Biochem Sci 2008; 33(5): 209-19.

Buechner CN, Heil K, Michels G, Carell T, Kisker C, Tessmer I. Strand-specific recognition of DNA damages by XPD provides insights into nucleotide excision repair substrate versatility. J Biol Chem 2014; 289(6): 3613-24.

Burhans WC, Heintz NH. The cell cycle is a redox cycle: linking phase-specific targets to cell fate. Free Radic Biol Med 2009; 47(9): 1282-93.

Cadet J, Sage E, Douki T. Ultraviolet radiation-mediated damage to cellular DNA. Mutat Res 2005; 571: 3-17.

Cadet J, Ravanat JL, TavernaPorro M, Menoni H, Angelov D. Oxidatively generated complex DNA damage: Tandem and clustered lesions. Cancer Lett 2012; 327: 5-15.

Callegari AJ, Kelly TJ. Shedding light on the DNA damage checkpoint. Cell Cycle 2007; 6(6): 660-6.

Canugovi C, Misiak M, Ferrarelli LK, Croteau DL, Bohr VA. The role of DNA repair in brain related disease pathology. DNA Repair (Amst) 2013; 12(8): 578-87.

Cejas P, Casado E, Belda-Iniesta C. Implications of oxidative stress and cell membrane lipid peroxidation in human cancer. Cancer Causes Control 2004; 15: 707-19.

Chaibub SCW. High incidence of Xeroderma Pigmentosum in a countryside community in the state of Goiás, Brazil. Surg Cosm Dermatol 2013; 3(1): 1-3.

Chan FK, Shisler J, Bixby JG, Felices M, Zheng L, Appel M, et al. A role for tumor necrosis factor receptor-2 and receptor-integrating protein in programmed necrosis and antiviral responses. J Biol Chem 2003; 278(51): 51613-21.

Charlet-Berguerand N, Feuerhahn S, Kong SE, Ziserman H, Conaway JW, Conaway R, Egly JM. RNA polymerase II bypass of oxidative DNA damage is regulated by transcription elongation factors. EMBO J 2006; 25: 5481-91.

Chaves I, Pokorny R, Byrdin M, Hoang N, Ritz T, Brettel K, et al. The cryptochromes: blue light photoreceptors in plants and animals. Ann Rev Plant Biol 2011; 62: 335-64.

Check E. Retracted papers damage work on DNA repair. Nature 2005; 435(7045): 1015.

Chen JH, Hales CN, Ozanne SE. DNA damage, cellular senescence and organismal ageing: causal or correlative? Nucleic Acids Res 2007; 35(22): 7417-28.

Chen YW, Cleaver JE, Hatahet Z, Honkanen RE, Chang JY, Yey Y, Chou KM. Human DNA polymerase eta activity and translocation is regulated by phosphorylation. Proc Natl Acad Sci USA 2008; 105(43): 16578-83.

Choi JY, Lim S, Kim EJ, Jo A, Guengerich FP. Translesion synthesis across abasic lesions by human B-family and Y-family DNA polymerases α, δ, η, ι, κ, and REV1. J Mol Biol 2010; 404(1): 34-44.

Chiganças V, Lima-Bessa KM, Stary A, Menck CFM, Sarasin A. Defective transcription/repair factor IIH recruitment to specific UV lesions in trichothiodystrophy syndrome. Cancer Res 2008; 68: 6074-83.

Cleaver JE. Defective repair replication of DNA in xeroderma pigmentosum. Nature 1968; 218 (5142): 652-6.

Cleaver JE, Afzal V, Feeney L, McDowell M, Sadinsky W, Volpe JP, et al. Increased ultraviolet sensitivity and chromosomal instability related to p53 function in the Xeroderma Pigmentosum variant. Cancer Res 1999; 59: 1102-08.

Cleaver JE, Revet I. Clinical implications of the basic defects in Cockayne syndrome and xeroderma pigmentosum and the DNA lesions responsible for cancer, neurodegereration and aging. Mech Ageing Dev 2008; 129: 492-7.

Cleaver JE, Lam ET, Revet I. Disorders of nucleotide excision repair: the genetic and molecular basis of heterogeneity. Nat Rev Genetics 2009; 10: 756-68.

Cleaver JE, Bezrookove V, Revet I, Huang EJ. Conceptual developments in the causes of Cockayne syndrome. Mech Ageing Dev 2013; 134: 284-90.

Cockayne EA. Dwarfism with retinal atrophy and deafness. Arch Dis Child 1936; 11(61): 1-8.

Coin F, Marinoni JC, Rodolfo C, Friburg S, Perdini AM, Egly JM. Mutations in the XPD helicase gene result in XP and TTD phenotypes, preventing interaction between XPD and the p44 subunit of TFIIH. Nat Genet 1998; 20(2): 184-8.

Coin F, Oksenych V, Egly JM. Distinct roles for the XPB/p52 and XPD/p44 subcomplexes of TFIIH in damaged DNA opening during nucleotide excision repair. Mol Cell 2007; 26: 245-56.

Compe E, Malerba M, Soler L, Marescaux J, Borrelli E, Egly JM. Neurological defects in trichothiodystrophy reveal a coactivator function of TFIIH. Nat Neurosci 2007; 10(11): 1414-22.

Compe E, Egly JM. TFIIH: when transcription met DNA repair. Nat Rev Mol Cel Biol 2012; 13: 343-54.

Conour JE, Graham WV, Gaskins HR. A combined in vitro/bioinformatic investigation of redox regulatory mechanisms governing cell cycle progression. Physiol Genomics 2004; 18(2): 196-205.

Cooper PK, Nouspikel T, Clarkson SG, Leadon SA. Defective transcription-coupled repair of oxidative base damage in Cokayne syndrome patients from XP group G. Science 1997; 275(5302): 990-3. Retraction in: Cooper PK, Nouspikel T, Clarkson SG. Science 2005; 308(5729): 1740.

Cordeiro-Stone M, Makhov AM, Zaritskaya LS, Griffith JD. Analysis of DNA replication forks encountering a pyrimidine dimer in the template to the leading strand. J Mol Biol 1999; 189(5): 1207-18.

Costa RAP, Romagna CD, Pereira JL, Souza-Pinto NC. The role of mitochondrial DNA damage in the citotoxicity of reactive oxygen species. J Bioenerg Biomembr 2011; 43: 25-9.

Costa RMA, Chiganças V, Galhardo RS, Carvalho H, Menck CFM. The eukaryotic nucleotide excision repair pathway. Biochimie 2003; 85: 1083-99.

Cramers P, Verhoeven EE, Filon AR, Rockyx DA, Santos SJ, van der Leer AA, et al. Impaired repair of ionizing radiation-induced DNA damage in Cockayne syndrome cells. Radiat Res 2011; 175(4): 432-43.

Curtin N. DNA repair dysregulation from cancer driver to therapeutic target. Nat Rev Cancer 2012; 12: 801-17.

Daley JM, Sung P. 53BP1, BRCA1 and the choice between recombination and end joining at DNA double-strand breaks. Mol Cell Biol 2014; 34(8): 1380-8.

David SS, O'shea VL, Kundu S. Base-excision repair of oxidative DNA damage. Nature 2007; 447(7147): 941-50.

Dazard JE, Gal H, Amariglio N, Rechavi G, Domany E, Givol D. Genome-wide comparison of human keratinocyte and squamous cell carcinoma responses to UVB irradiation: implications for skin and epithelial cancer. Oncogene 2003; 22(19): 2993-3006.

Daya-Grosjean L, Sarasin A. The role of UV induced lesions in skin carcinogenesis: an overview of oncogene and tumor suppressor gene modifications in xeroderma pigmentosum skin tumors. Mutat Res 2005; 571(1-2): 43-56.

Deans AJ, West SC. DNA interstrand crosslink repair and cancer. Nature Rev Cancer 2011; 11: 467-80.

De Boer J, Donker I, de Wit J, Hoeijmakers JHJ, Weeda G. Disruption of the mouse xeroderma pigmentosum group D DNA repair/basal transcription results in preimplantation lethality. Cancer Res 1998a; 58: 89-94.

De Boer J, de Wit J, van Steeg H, Berg RJ, Morreau H, Visser P, et al. A mouse model for the basal transcription/DNA repair syndrome trichothiodystrophy. Mol Cell 1998b; 1998: 1(7): 981-90.

De Boer J, Hoeijmakers JH. Nucleotide excision repair and human syndromes. Carcinogenesis 2000; 21 (3): 453-60.

De Laat WL, Appeldoorn E, Sugasawa K, Weterings E, Jaspers NG, Hoeijmakers JH. DNA-binding polarity of human replication protein A positions nucleases in nucleotide excision repair. Genes Dev 1999; 12 (16): 2598-609.

Debrabant B, Soerensen M, Flaschsbart F, Dato S, Mengel-From J, Stevnser T, et al. Human longevity and variation in DNA damage response and repair: study of the contribution of sub-processes using competitive gene-set analysis. Eur J Human Genet 2014; doi 10.1038/ejhg.2013.299.

Delbos F, de Smet A, Faili A, Aoufouchi S, Weill JC, Reynaud CA. Contribution of DNA polymerase eta to immunoglobulin gene hypermutation in the mouse. J Exp Med 2005; 201(8); 1191-6.

Delbos F, Aoufouchi S, Faili A, Weill JC, Reynaud CA. DNA polymerase η is the sole contributor of A/T muodifications during immunoglobulin hene hypermutation in the mouse. JEM 2006; 204(1): 17-23.

D'Errico M, Parlanti E, Teson M, de Jesus BM, Degan P, Calgagnile A, et al. New functions of XPC in the protection of human skin cells from oxidative damage. EMBO J 2006; 25: 4305-15.

D'Errico M, Parlanti E, Teson M, Degan P, Lemma T, Calgagnile A, et al. The role of CSA in the response to oxidative damage in human cells. Oncogene 2007; 26: 4336-43.

D'Errico M, Pascucci B, Iorio E, van Houten B, Dogliotti E. The role of CSA and CSB protein in the oxidative stress reponse. Mech Ag Dev 2013; 134: 261-69.

De Souza-Pinto NC, Eide L, Hogue BA, Thybo T, Stevnsner T, Seeberg E, et al. Repairo f 8-oxodeoxyguanosine lesions on mitochondrial DNA depends on the oxoguanine DNA glycosylase (OGG1) gene and 8-oxoguanine accumulates in the mitochondrial DNA of OGG1-defective mice. Cancer Res 2001; 61(14): 5378-81.

Despras E, Daboussi F, Hyrien O, Marheineke K, Kannouche PL. ATR/Chk1 pathway is essential for resumption of DNA synthesis and cell survival in UV-irradiated XP variant cells. Hum Mol Genet 2010; 19(9): 1690-701.

Despras E, Delrieu N, Garandeau C, Ahmed-Seghir S, Kannouche PL. Regulation of the specialized DNA polymerase eta: revisiting the biological relevance of its PCNA- and ubiquitin-binding motifs. Environ Mol Mutagen 2012; 53(9): 752-65.

De Waard H, de Wit J, Andressoo JO, van Oostrom CT, Rijs B, Weimann A, et al. Different effects of CSA and CSB deficiency on sensitivity to oxidative DNA damage. Mol Cell Biol 2004; 24(18): 7941-8.

De Weerd-Kastelein EA, Keijzer W, Bootsma D. Genetic heterogeneity of xeroderma pigmentosum demonstrated by somatic cell hybridization. Nat New Biol 1972; 238(81): 80-3.

Diaz M, Flajnik MF. Evolution of somatic hypermutation and gene conversion in adaptative immunity. Immunol Rev 1998; 162: 13-24.

DiGiovanna JJ, Kraemer KH. Shining a light on xeroderma pigmentosum. J Invest Dermatol 2012; 132: 785-96.

Dvir A, Tan S, Conaway JW, Conaway RC. Promoter escape by RNA polymerase II. Formation of an escape-competent transcriptional intermediate is a prerequisite for exit of polymerase from the promoter. J Biol Chem 1997; 272: 28175-78.

Dizdaroglu M. Base-excision repair of oxidative DNA damage by DNA glycosylases. Mutat Res 2005; 591(1-2): 45-59.

Dizdaroglu M. Oxidatively induced DNA damage: Mechanisms, repair and disease. Cancer Lett 2012; 327: 26-47.

Domon M, Rauth AM. Cell cycle specific recovery from fractionated exposures of ultraviolet light. Radiat Res 1973; 55(1): 81-92.

Donahue BA, Yin S, Taylor JS, Reines D, Hanawalt P. Transcript cleavage by RNA polymerase II arrested by a cyclobutane pyrimidine dimer in the DNA template. Proc Natl Acad Sci USA 1994; 91, 8502-6.

Dröge W. Free radicals in the physiological control of cell function. Physiol Rev 2002; 82: 47-95.

Durando M, Tateishi S, Vaziri C. A non-catalytic role of DNA polymerase η in recruiting Rad18 and promoting PCNA monoubiquitination at stalled replication forks. Nucleic Acids Res 2013; 41(5): 3079-93.

El-Khamisy SF, Masutani M, Suzuki H, Caldecott KW. A requirement for PARP-1 for the assembly or stability of XRCC1 nuclear foci at sites of oxidative DNA damage. Nucleic Acids Res 2003; 31(19): 5526-33.

Elkind MM, Sutton H. Radiation response of mammalian cells gorwn in culture. 1. Repair of X-ray damage in surviving Chinese hamster cells. Radiat Res 1960; 13: 556-93.

Enk CD, Jacob-Hirsch J, Gal H, Verbovetski I, Amariglio N, Mevorach D, et al. The UVB-induced gene expression profile of human epidermis is different from that of cultured keratinocytes. Oncogene 2006; 25(18): 2601-14.

Epe B, Pflaum M, Boiteaux S. DNA damage induced by photosensitizers in cellular and cell-free systems. Mutat Res 1993; 299(3-4): 135-45.

Evans MD, Dizdaroglu M, Cooke MS. Oxidative DNA damage and disease: induction, repair and significance. Mutat Res 2004; 567: 1-61.

Faghri S, Tamura D, Kraemer KH, DiGiovanna JJ. Trichothiodystrophy: a systematic review of 112 published cases characterizes a wide spectrum of clinical manifestations. J Med Genet 2008; 45(10): 609-21.

Faili A, Stary A, Delbos F, Weller S, Aoufouchi S, Sarasin A, et al. A backup role of DNA polymerase kappa in Ig hypermutation only takes place in the complete absence of DNA polymerase eta. J Immunol 2009; 182(10): 6353-9.

Fan J, Wilson III DM. Protein-protein interaction and posttranslational modifications in mammalian base excision repair. Free Radical Biol Med 2005; 38: 1121-38.

Fan L, Fuss JO, Cheng QJ, Arvai AS, Hammel M, Roberts VA, et al. XPD helicase structures and activities: Insights into the cancer and aging phenotypes from XPD mutations. Cell 2008; 133: 789-800.

Fan L, Arvai AS, Cooper PK, Iwai S, Hanaoka F, Tainer JA. Conserved XPB core structure and motifs for DNA unwinding: implications for pathway selection of transcription or excision repair. Mol Cell 2006; 22(1): 27-37.

Fayaz SM, Suvanish-Kumar VS, Rajanikant GK. Necroptosis: who knew there were so many interesting ways to die? CNS Neurol Disord Drug Targets 2014; 13(1): 42-51.

Feaver WJ, Gileadi O, Li Y, Kornberg RD. CTD kinase associated with yeast RNA polymerase II initiation factor b. Cell 1991; 67: 1223-30.

Fousteri M, Vermeulen W, van Zeeland AA, Mullenders LH. Cockayne syndrome A and B proteins differentially regulate recruitment of chromatin remodeling and repair factors to stalled RNA polymerase II in vivo. Mol Cell 2006; 23(4): 471-82.

Friedberg EC. Suffering in silence: the tolerance of DNA damage. Nat Rev Mol Cell Biol 2005; 6(12): 943-53.

Friedberg EC, McDaniel LD, Schultz RA. The role of endogenous and exogenous DNA damage and mutagenesis. Curr Opin Gen Dev 2004; 14: 5-10.

Friedman JR, Nunnari J. Mitochondrial form and function. Nature 2014; 505: 335-43.

Fu D, Dudimah FD, Zhang J, Pickering A, Paneerselvam J, Palrasu M, et al. Recruitment of DNA polymerase eta by FANCD2 in early response to DNA damage. Cell Cycle 2013; 12(5): 803-9.

Fujimoto M, Leech SN, Theron T, Mori M, Fawcett H, Botta E, et al. Two new XPD patients compound heterozygous for the same mutation demonstrate diverse clinical features. J Invest Dermatol 2005; 125(1): 86-92.

Fukui K. DNA Mismatch Repair in Eukaryotes and Bacteria. J Nucleic Acids 2010; 2010: pii 260512.

Gabaldón T, Huynen MA. Shaping the mitochondrial proteome. Biochim Biophys Acta 2004; 1659: 212-20.

Gaillard PH, Wood RD. Activity of individual ERCC1 and XPF subunits in DNA nucleotide excision repair. Nucleic Acids Res 2001; 29: 872-79.

Galluzzi L, Kepp O, Krautwald S, Kroemer G, Linkermann A. Molecular mechanisms of regulated necrosis. Semin Cell Dev Biol 2014; pii: S1084-9521(14)00018-4. doi: 10.1016/j.semcdb.2014.02.006.

Garcia CC, Freitas FP, Sanchez AB, Di Mascio P, Medeiros MH. Elevated α-methyl-γ-hydroxy-1, N^2-propano-2´-deoxyguanosine levels in urinary samples from individuals exposed to urbana ir pollution. Chem Res Toxicol 2013; 26(11): 1602-4.

Garcia-Higuera I, Taniguchi T, Ganesan S, Meyn MS, Timmers C, Hejna J, et al. Interaction of the Fanconi anemia proteins and BRCA1 in a common pathway. Mol Cell 2001; 7(2): 249-62.

Georgakilas AG, O´Neill P, Stewart RT. Induction and repair of clustered DNA lesions: what do we know so far? Radiat Res 2013; 180(1): 100-9.

Giglia-Mari G, Sarasin A. TP53 mutations in human skin cancers. Hum Mutat 2003; 21(3): 217-28.

Giglia-Mari G, Coin F, Ranish JA, Hoogstraten D, Theil A, Wijgers N, et al. A new, tenth subunit of TFIIH is responsible for the DNA repair syndrome trichothiodystrophy group A. Nat Gen 2004; 36(7): 714-19.

Gopalakrishnan K, Low GK, Ting AP, Srikanth P, Slijepcevic P, Hande MP. Hydrogen peroxide induced genomic instability in nucleotide excision repair-deficient lymphoblastoid cells. Genome Integr 2010; 1(1): 16. doi: 10. 1186/2041-9414-1-16.

Graham Jr JM, Anyane-Yeboa K, Raams A, Appeldoorn E, Kleijer WJ, Garritsen VH, et al. Cerebro-oculo-facio-skeletal syndrome with a nucleotide excision-repair defect and a mutated XPD gene, with prenatal diagnosis in a triplet pregnancy. Am J Hum Genet 2001; 69(2): 291-300.

Gregg SQ, Robinson AR, Niedernhofer LJ. Physiological consequences of defects in ERCC1-XPF DNA repair endonuclease. DNA Repair 2011; 10: 781-91.

Guo C, Kosarek-Stancel JN, Tang TS, Friedberg EC. Y-family DNA polymerases in mammalian cells. Cell Mol Life Sci 2009; 66(14): 2363-81.

Guo J, Hanawalt PC, Spivak G. Comet-FISH with strand-specific probes reveals transcription-coupled repair of 8-oxoGuanine in human cells. Nucleic Acids Res 2013; 41(16): 7700-12.

Haince JF, McDonald M, Rodrigue A, Déry U, Masson JY, Hendzel MJ, Poirier GG. PARP-1 dependent kinetics of recruitment of MRE11 and NBS1 proteins to multiple DNA damage sites. J Biol Chem 2008; 283(2): 1197-208.

Halliwell B, Gutteridge JMC. Free radicals in biology and medicine. 2007. 4th ed. Oxford: Oxford University Press.

Hamel BC, Raams A, Schuitema-Dijkstra AR, Simons P, van der Burgt I, Jaspers NG, Kleijer WJ. Xeroderma pigmentosum-Cockayne syndrome complex: a further case. J Med genet 1996; 33(7): 607-10.

Hanahan B, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: The next generation. Cell 2011; 144: 646-74.

Hanawalt PC, Spivak G. Transcription-coupled DNA repair: two decades of progress and surprises. Nat Rev Mol Cell Biol 2008; 9(12): 958-70.

Haracska L, Yu SL, Johnson RE, Prakash L, Prakash S. Efficient and accurate replication in the presence of 7,8-dihydro-8-oxoguanine by DNA polymerase eta. Nat Genet 2000a. 25:458–61.

Haracska L, Prakash S, Prakash L. Replication past O(6)-methylguanine by yeast and human DNA polymerase eta. Mol Cell Biol 2000b; 20:8001–7.

Hashimoto S, Egly JM. Trichothiodystrophy view from the molecular basis of DNA repair/transcription factor TFIIH. Hum Mol Genet 2009; 18(R2): R224-30.

Hazra TK, Hill JW, Izumi T, Mitra S. Multiple DNA glycosylases for repair of 8-oxoguanine and their potential in vivo functions. Prog Nucleic Acid Res Mol Biol 2001; 68: 193-205.

Hazra TK, Das A, Das S, Choudhury S, Kow YW, Roy R. Oxidative DNA damage repair in mammalian cells: A new perspective. DNA Repair (Amst) 2007; 6(4): 470-80.

Hayashi M. Oxidative stress in developmental brain disorders. Neuropathology 2009; 29(1): 1-8.

Hayashi M, Niwa-Saito N, Tanuma N, Kubota M. Brain vascular changes in Cockayne syndrome. Neuropathology 2012; 32: 113-17.

Hebra F, Kaposi M. On diseases of the skin. 1874. London: Sytenham Society.

Helleday T, Petermann E, Lundin C, Hodgson B, Sharma RA. DNA repair pathways as targets for cancer therapy. Nature Rev Cancer 2008; 8: 193-204.

Hirai Y, Kodama Y, Moriwaki S, Noda A, Macphee DG, Kodama K, et al. Heterozygous individuals bering a founder mutation in the XPA DNA repair gene comprise nearly 1% of the Japanese population. Mutat Res 2006; 601: 171-78.

Ho TV, Schärer OD. Translesion DNA synthesis polymerases in DNA interstrand cross-link repair. Environ Mol Mutagen 2010; 51(6): 552-66.

Hoeijmakers JH. Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. Nature 2001; 411: 366-74.

Holstege FC, vander Vliet PC, Timmers HT. Opening of an RNA polymerase II promoter occurs in two distinct steps and requires the basal transcription factors IIE and IIH. EMBO J 1996; 15(7): 1666-77.

Horibata K, Iwamoto Y, Kuraoka I, Jaspers NG, Kurimasa A, Oshimura M, et al. Complete absence of Cockayne syndrome group B gene product gives rise to UV-sensitive syndrome but no Cokayne syndrome. Proc Natl Acad Sci USA 2004; 101(43): 15410-5.

Hsieh P. Molecular mechanisms of DNA mismatch repair. Mutat Res 2001; 486: 71-87.

Hsieh P, Yamane K. DNA mismatch repair: Molecular mechanism, cancer, and ageing. Mech Ag Dev 2008; 129: 391-407.

Huang TT, Nijman SM, Mirchandani KD, Galardy PJ, Cohn MA, Haas W, Gygi SP, et al. Regulation of monoubiquitinated PCNA by DUB autocleavage. Nat Cell Biol 2006; 8(4): 339-47.

Hwang BJ, Ford JM, Hanawalt PC, Chu G. Expression of the p48 xeroderma pigmentosum gene is p53-dependent and is involved in global genomic repair. Proc Natl Acad Sci USA 1999; 96(2): 424-8.

Itin PH, Sarasin A, Pittelkow MR. Trichothiodystrophy: Update on the sulfur-deficient brittle hair syndromes. J Am Acad Dermatol 2001; 44(6): 891-920.

Ito S, Kuraoka I, Chymkowitch P, Compe E, Takedachi A, Ishigami C, et al. XPG stabilizes TFIIH, allowing transactivation of nuclear receptors: implications for Cockayne syndrome in XP-G/CS patients. Mol Cell 2007; 26: 231-43.

Ito S, Tan LJ, Andoh D, Narita T, Seki M, Hirano Y, et al. MMXD, a TFIIH-independent XPD-MMS19 protein complex involved in chromosome segregation. Mol Cell 2010; 39: 632-40.

Jaarsma D, van der Pluijm, Waard MC, Haasdijk ED, Brandt R, Vermeij M, et al. Age-related neuronal degeneration: complementary roles of nucleotide excision repair and transcription-coupled repair in preventing neuropathology. Plos Genet 2011; 7(12): e1002405.

Jaarsma D, van der Pluijm I, van der Horst GTJ, Hoeijmakers JHJ. Cockayne syndrome pathogenesis: Lessons from mouse models. Mech Ag Dev 2013; 134: 180-95.

Jamison JM, Gilloteaux J, Taper HS, Calderon PB, Summers JL. Autoschizis: a novel cell death. Biochem Pharmacol 2002; 63(10); 1773-83.

Jaspers NG, Raams A, Silengo MC, Wijgers N, Niedernhofer LJ, Robinson AR, et al. First reported patient with human ERCC1 deficiency has cerebro-oculo-facio-skeletal syndrome with a mild defect in nucleotide excision repair and severe developmental failure. Am J Hum Genet 2007; 80(3): 457-66.

Jeppesen DK, Bohr VA, Stevnsner T. DNA repair deficiency in neurodegeneration. Prog Neurobiol 2011; 94(2): 166-200.

Johnson RE, Kondratick CM, Prakash L. hRAD30 mutations in the variant form of xeroderma pigmentosum. Science 1999; 285: 263-5.

Kaina B, Christmann M, Naumann S, Roos WP. MGMT: Key node in the battle against genotoxicity, carcinogenicity and apoptosis induced by alkylating agents. DNA Repair 2007; 6: 1079-99.

Kakarougkas A, Jeggo PA. DNA DSB repair pathway choice: an orchestrated handover mechanism. Br J Radiol 2014; 87(1035): 20130685.

Kamenisch Y, Fousteri M, Knoch J, von Thaler AK, Fehrenbacher B, Kato H, et al. Proteins of nucleotide and base excision repair pathways interact in mitochondria to protect from loss of subcutaneous fat, a hallmark of aging. J Exp Med 2010; 207(2): 379-90.

Kamiuchi S, Saijo M, Citterio E, de Jager M, Hoeijmakers JHJ, Tanaka K. Translocation of Cockayne syndrome group A protein to the nuclear matrix: possible relevance to transcription-coupled DNA repair. Proc Natl Acad Sci USA 2002; 99: 201-6.

Kannouche PL, Wing J, Lehmann AR. Interaction of human DNA polymerase eta with monoubiquitinated PCNA: a possible mechanism for the polymerase switch in response to DNA damage. Mol Cell 2004; 14(4): 491-500.

Kassam SN, Rainbow AJ. UV-inducible base excision repair of oxidative damaged DNA in human cells. Mutagenesis 2009; 24(1): 75-83.

Kathe SD, Shen GP, Wallace SS. Single-strand breaks in DNA but not oxidative DNA base damages block transcriptional elongation by RNA polymerase II in HeLa cell nuclear extracts. J Biol Chem 2004; 279(18): 18511-20.

Kaushik Tiwari M, Rogers FA. XPD-dependent activation of apoptosis in response to triplex-induced DNA damage. Nucleic Acids Res 2013; 41(19): 8979-94.

Kawamoto T, Araki K, Sonoda E, Yamashita YM, Harada K, Kikuchi K, et al. Dual roles for DNA polymerase eta in homologous DNA recombination and translesion DNA synthesis. Mol Cell 2005; 20(5): 793-9.

Kawanishi S, Murata M. Mechanisms of DNA damage induced by bromate differs from general types of oxidative stress. Toxicology 2006; 221(2-3): 172-8.

Keim C, Kazadi D, Rothschild G, Basu U. Regulation of AID, the B-cell genome mutator. Genes Dev 2013; 27(1): 1-17.

Khobta A, Epe B. Repair of oxidatively generated DNA damage in Cockayne syndrome. Mech Ag Dev 2013; 134: 253-60.

Kim JM, Kee Y, Gurtan A, D'Andrea AD. Cell cycle-dependent chromatin loading of the Fanconi anemia core complex by FANCM/FAAP24. Blood 2008; 111: 5215-22.

Kitsera N, Stathis D, Lühnsdorf B, Müller H, Carrell T, Epe B, Khobta A. 8-Oxo-7,8-dihydroguanine in DNA does not constitute a barrier to transcription, but is converted into transcription-blocking damage by OGG1. Nucleic Acids Res 2011; 39(14): 5926-34.

Kleijer WJ, Laugel V, Berneburg M, Nardo T, Fawcett H, Gratchev A, et al. Incidence of DNA repair deficiency disorders in western Europe: Xeroderma pigmentosum, Cockayne syndrome and trichothiodystrophy. DNA Repair 2008; 7:744-50.

Klug AR, Harbut MB, Lloyd RS, Minko IG. Replication bypass of N2-deoxyguanosine interstrand cross-links by human DNA polymerases η and ι. Chem Res Toxicol 2012; 25(3): 755-62.

Klungland A, Höss M, Gunz D, Constantinou A, Clarkson SG, Doetsch PW, et al. Base excision repair of oxidative damage activated by XPG protein. Mol Cell 1999a; 3(1): 33-42.

Klungland A, Rosewell I, Hollenbach S, Larsen E, Daly G, Epe B, et al. Accumulation of premutagenic DNA lesions in mice defective in removal of oxidized base damage. Proc Natl Acad Sci USA 1999b; 96(23): 13300-5.

Kobayashi J, Iwabuchi K, Miyagawa K, Sonoda E, Suziki K, Takata M, Tauchi H. Current topics in DNA double-strand break repair. J Radiat Res Tokyo 2008; 49(2): 93-103.

Koob M, Laugel V, Durand M, Fothergill H, Dalloz C, Sauvanaud F, et al. Neuroimaging in Cockayne syndrome. Am J Neuroradiol 2010; 31: 1623-30.

Koole W, van Schendel R, Karambelas AE, van Heteren JT, Okihara KL, Tijsterman M. A polymerase theta-dependent repair pathway suppresses extensive genomic instability at endogenous G4 DNA sites. Nat Commun 2014; 5:3216. doi: 10.1038/ncomms4216.

Kraemer KH, Lee MM, Scotto J. Xeroderma pigmentosum. Cutaneous, ocular, and neurologic abnormalities in 830 published cases. Arch Dermatol 1987; 123(2): 241-50.

Kraemer KH, DiGiovanna JJ, Moshell AN, Tarone RE, Peck GL. Prevention of skin cancer in xeroderma pigmentosum with the use of oral isotretinoin. N Engl J Med 1988; 318(25): 1633-7.

Kraemer KH, Levy DD, Parris CN, Gozukara EM, Moriwaki S, Adelberg S, Seidman MM. Xeroderma pigmentosum and related disorders: examining the linkage between defective DNA repair and cancer. J Invest Dermatol 1994; 103(5 Suppl): 96S-101S.

Kraemer KH, Patronas NJ, Schiffmann R, Brooks BP, Tamura D, DiGiovanna JJ. Xeroderma pigmentosum, trichothiodystrophy and Cockayne syndrome: a complex genotype-phenotype relationship. Neuroscience 2007; 145: 1388-1396.

Kroemer G, Dallaporta B, Resche-Rigon M. The mitochondrial death/life regulator in apoptosis and necrosis. Annu Rev Phyisiol 1998; 60: 619-42.

Krokan HE, Bjørås M. Base excision repair. Cold Spring Harb Perspect Biol 2013; 5(4): a012583.

Kubota Y, Nash RA, Klungland A, Schar P, Barnes DE, Lindahl T. Reconstitution of DNA base excision repair with purified human proteins: interaction between DNA polymerase beta and the XRCC1 protein. EMBO J 1996; 15: 6662-70.

Kulkarni A, Wilson DM III. The involvement of DNA-damage and –repair defects in neurological dysfunction. Am J Hum Genet 2008; 82(3): 539-66.

Kusumoto R, Masutani C, Iwai S, Hanaoka F. Translesion synthesis by human DNA polymerase eta across thymine glycol lesions. Biochemistry 2002; 41: 6090-9.

Lai JP, Liu YC, Alimchandani M, Liu Q, Aung PP, Matsuda K, et al. The influence of DNA repair on neurological degeneration, cachexia, skin cancer and internal neoplasms: autopsy report of four xeroderma pigmentosum patients (XP-A, XP-C and XP-D). Acta Neuropathol Commun 2013; 1(1): 4. doi: 10.1186/2051-5960-1-4.

Lambeth JD. NOX enzymes and the biology of reactive oxygen. Nat Rev Immunol 2004; 4: 181-9.

Lane N, Martin W. The energetics of genome complexity. Nature 2010; 467: 929-34.

Lange S, Takata K, Wood R. DNA polymerases and cancer. Nat Rev Cancer 2011; 11: 96-110.

Larochelle S, Merrick KA, Terret ME, Wohlbold L, Barboza NM, Zhang C, et al. Requirements for Cdk7 in the assembly of Cdk1/cyclin B and activation of Cdk2 revealed by chemical genetics in human cells. Mol Cell 25: 839-50, 2007.

Larsen E, Kwon K, Coin F, Egly JM, Klungland A. Transcription activities at 8-oxoG lesions in DNA. DNA Repair (Amst) 2004; 3(11): 1457-68.

Laugel V. Cockayne syndrome: The expanding clinical and mutational spectrum. Mech Ag Dev 2013; 134: 161-70.

Laugel V, Dalloz C, Durand M, Sauvanaud F, Kristensen U, Vincent MC, et al. Mutation update for the CSB/ERCC6 and CSA/ERCC8 genes involved in Cockayne syndrome. Hum Mutat 2010; 31(2): 113-26.

LeClerc JE, Borden A, Lawrence CW. The thymine-thymine pyrimidine-pyrimidone(6,4) ultraviolet light photoproduct is highly mutagenic and specifically induces 3´ thymine-to-cytosine transitions in Escherichia coli. Proc Natl Acad Sci 1991; 88(21): 9685-9.

Lee DH, Pfeifer GP. Translesion synthesis of 7,8-dihydro-8-oxo-2'-deoxyguanosine by DNA polymerase eta *in vivo*. Mutat Res 2008; 641(1-2): 19-26.

Lee KM, Kim CD, Lee JS, Lee Y, Yang JM, Seo YJ, et al. Identification of genes responding to ultraviolet B irradiation in HaCaT keratinocytes cultured in vitro. J Dermatol Sci 2005; 40(3): 212-4.

Lehmann AR. The xeroderma pigmentosum group D (XPD) gene: one gene, two functions, three diseases. Genes Dev 2001; 15: 15-23.

Lehmann AR. DNA repair-deficient diseases, xeroderma pigmentosum, Cockayne syndrome and trichothiodystrophy. Biochimie 2003; 85 (11): 1101-11.

Lehmann AR. XPD structure reveals its secrets. DNA Repair 2008; 7: 1912-15.

LePage F, Kwoh EE, Avrutskaya A, Gentil A, Leadon SA, Sarasin A, Cooper PK. Transcription-coupled repair of 8-oxoguanine: requirement for XPG, TFIIH, and CSB and implications for Cockayne syndrome. Cell 2000; 101(2): 159-71. Retraction in: LePage F, Kwoh EE, Avrutskaya A, Gentil A, Leadon SA, Sarasin A, Cooper PK. Cell 2005; 123(4): 711.

Lehmann AR, Kirk-Bell S, Mayne L. Abnormal kinetics of DNA synthesis in ultraviolet light-irradiated cells from patients with Cokayne's syndrome. Cancer Res 1979; 39(10): 4237-41.

Li H, Zhang XP, Liu F. Coordination between p21 and DDB2 in the cellular response to UV radiation. PLoS One 2013; 8(11): e80111.

Lieber MR. The mechanism of double-strand DNA break repair by the nonhomologous DNA end-joining pathway. Annu Rev Biochem 2010; 79: 181-211.

Lima-Bessa KM, Chiganças V, Stary A, Kannouche P, Sarasin A, Armelini MG, et al. Adenovirus mediated transduction of the human DNA polymerase cDNA. DNA Repair (Amst) 2006; 5(8): 925-34.

Lima-Bessa KM, Soltys DT, Marchetto MC, Menck CFM. Xeroderma Pigmentosum: living in the dark but with hope in therapy. Drugs of the Future 2009; 34(8): 665-72.

Limoli CL, Giedzinski E, Bonner WM, Cleaver JE. UV-induced replication arrest in the xeroderma pigmentosum variant leads to DNA double-strand breaks, gamma-H2AX formation, and Mre11 relocalization. Proc Natl Acad Sci USA 2002; 99(1): 233-8.

Lin MT, Beal MF. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurodegenerative diseases. Nature 2006; 443(7113): 787-95.

Lindahl T. Instability and decay of the primary structure of DNA. Nature 1993; 362: 709-15.

Lindahl T, Nyberg B. Rate of depurination of native deoxyribonucleic acid. Biochemistry 1972; 11(19): 3610-8.

Liu D, Croteau DL, Souza-Pinto N, Pitta M, Tian J, Wu C, et al. Evidence that OGG1 glycosylase protects neurons against oxidative DNA damage and cell death under schemic conditions. J Cereb Blood Flow Metab 2011; 31(2): 680-92.

Liu G, Chen X. DNA Polymerase η, the product of the Xeroderma Pigmentosum Variant gene and a target of p53, modulates the DNA damage checkpoint and p53 activation. Mol Cell Biol 2006; 26(4): 1398-413.

Liu H, Rudolf J, Johnson KA, McMahon SA, Oke M, Carter L, et al. Structure of the DNA repair helicase XPD. Cell 2008; 133: 801-812.

Ljungman M, Lane DP. Transcription – guarding the genome by sensing DNA damage. Nat Rev Cancer 2004; 4(9): 727-37.

Lombard DB, Chua KF, Mostoslaysky R, Franco S, Gostissa M, Alt FW. DNA repair, genome stability and aging. Cell 2005; 120: 497-512.

Longo NS, LipskyY PE. Why do B cells mutate their immunoglobulin receptors? Trends Immunol 2006; 27: 374-380.

Lu H, Fisher RP, Bailey P, Levine AJ. The CDK-7-cycH-p36 complex of transcription factor IIH phosphorylates p53, enhancing its sequence-specific DNA binding activity in vitro. Mol Cell Biol 1997; 17(10): 5923-34.

Lukas J, Lukas C, Bartek J. More than just a focus: The chromatin response to DNA damage and its role in genome integrity maintenance. Nat Cell Biol 2011; 13(10): 1161-9.

McCulloch SD, Kunkel TA. The fidelity of DNA synthesis by eukaryotic replicative and translesion synthesis polymerases. Cell Res 2008; 18: 148-61.

McCulloch SD, Kokoska RJ, Garg P, Burgers PM, Kunkel TA. The efficiency and fidelity of 8-oxo-guanine bypass by DNA polymerases δ and η. Nucleic Acids Res 2009; 37(9): 2830-40.

McIlwraith MJ, Vaisman A, Liu Y, Fanning E, Woodgate R, West SC. Human DNA polymerase eta promotes DNA synthesis from strand invasion intermediates of homologous recombination. Mol Cell 2005; 20(5): 783-92.

Malik S, Bagla S, Chaurasia P, Duan Z, Bhaumik SR. Elongating RNA polymerase II is dissassembled trough specific degradation of its largest but not other subunits in response to DNA damage *in vivo*. J Biol Chem 2008; 283: 6897-905.

Mao Z, Bozzella M, Seluanov A, Gorbunova V. Comparison of nonhomologous end joining and homologous recombination in human cells. DNA Repair (Amst) 2008; 7(10): 1765-71.

Mareddy S, Reddy J, Babu S, Balan P. Xeroderma Pigmentosum: Man deprived of his right to light. ScientificWorldJournal 2013; 2013: 534752.

Marnett LJ. Oxy radicals, lipid peroxidation and DNA damage. Toxicology 2002; 181-182: 219-22.

Matsuda T, Bebenek K, Masutani C, Hanaoka F, Kunkel TA. Low fidelity DNA synthesis by human DNA polymerase-eta. Nature 2000; 404(6781): 1011-13.

Masutani C, Sugasawa K, Yanagisawa J, Sonoyama T. Purification and cloning of a nucleotide excision repair complex involving the xeroderma pigmentosum group C protein and a human homologue of yeast RAD23. EMBO J 1994; 13: 1831-43.

Masutani C, Kusumoto R, Yamada A, Dohmae N, Yokoi M, Yuasa M, et al. The XPV (xeroderma pigmentosum variant) gene encodes human DNA polymerase eta. Nature 1999; 399: 700-4.

Masutani C, Kusumoto R, Iwai S, Hanaoka F. Mechanisms of accurate translesion synthesis by human DNA polymerase eta. EMBO J 2000; 19(12):3100-9.

Maynard S, Schurman SH, Harboe C, de Souza-Pinto NC, Bohr VA. Base excision repair of oxidative DNA damage and association with cancer and aging. Carcinogenesis 2009; 30(1): 2-10.

Meira LB, Graham Jr JM, Greenberg CR, Busch DB, Doughty AT, Ziffer DW, et al. Manitoba aboriginal kindred with original cerebro-oculo-facio-skeletal syndrome has a mutation in the Cockayne syndrome group B (CSB) gene. Am J Hum Genet 2000; 66(4): 1221-8.

Mellish KJ, Cox RD, Vernon DI, Griffiths J, Brown SB. In vitro photodynamic activity of a series of methylene blue analogues. Photochem Photobiol 2002; 75(4): 392-7.

Mellon I, Spivak G, Hanawalt PC. Selective removal of transcription-blocking DNA damage from the transcribed strand of the mammalian DHFR gene. Cell 1987; 51, 241-49.

Menck CF. Shining a light on photolyases. Nat Genet 2002; 32(3): 338-9.

Menck CF, Munford V. DNA repair diseases: What do they tell us about cancer and aging? Genet Mol Biol 2014; 37(1 suppl): 220-33.

Menck CF, Armelini MG, Lima-Bessa KM. On the search for skin gene therapy strategies of xeroderma pigmentosum disease. Curr Gene Ther 2007; 7(3): 163-74.

Minko IG, Kozekov ID, Harris TM, Rizzo CJ, Lloyd RS, Stone MP. Chemistry and biology of DNA containing 1,N^2-deoxyguanosine adducts of the α,β-unsaturated aldehydes acrolein, crotonaldeyhde, and 4-hydroxynonenal. Chem Res Toxicol 2009; 22: 759-78.

Mirchandani KD, McCaffrey RM, D'Andrea AD. The Fanconi anemia core complex is required for efficient point mutagenesis and Rev1 foci assembly. DNA Repair 2008; 7: 902-11.

Modrich P. Mechanisms in eukaryotic mismatch repair. J Biol Chem 2006; 281(41): 30305-9.

Mogi S, Oh DH. Gamma-H2AX formation in response to interstrand crosslinks requires XPF in human cells. DNA Repair (Amst) 2006; 5(6): 731-40.

Moldovan GL, Madhavan MV, Mirchandani KD, McCaffrey RM, Vinciguerra P, D'Andrea AD. DNA polymerase POLN participates in cross-link repair and homologous recombination. Mol Cell Biol 2010; 30(4): 1088-96.

Moraes MC, Neto JB, Menck CF. DNA repair mechanisms protect our genome from carcinogenesis. Front Biosci (Landmark Ed) 2012a; 17: 1362-88.

Moraes MC, de Andrade AQ, Carvalho H, Guecheva T, Agnoletto MH, Henriques JH, et al. Both XPA and DNA polymerase eta are necessary for the repair of doxorubicin-induced DNA lesions. Cancer Lett 2012b; 314(1): 108-18.

Moser J, Kool H, Giakzidis I, Caldecott K, Mullenders LHF, Fousteri MI. Sealing of chromosomal DNA nicks during nucleotide excision repair requires XRCC1 and DNA ligase IIIα in a cell-cycle-specific manner. Mol Cell 2007; 27: 311-23.

Moustacchi E, Ehmann UK, Friedberg EC. Defective recovery of semi-conservative DNA synthesis in xeroderma pigmentosum cells following split-dose ultraviolet irradiation. Mutat Res 1978; 62(1): 159-71.

Muftuoglu M, de Souza-Pinto NC, Dogan A, Aamann M, Stevsner T, Rybanska I, et al. Cokayne syndrome group B protein stimulates repair of formamidopyrimidines by NEIL1 DNA glycosylase. J Biol Chem 2009; 284(14): 9270-9.

Mulder JE, Bondy GS, Mehta R, Massey TE. Up-regulation of nucleotide excision repair in mouse lung and liver following chronic exposure to aflatoxin B1 and its dependence on p53 genotype. Toxicol Appl Pharmacol 2014; 275(2): 96-103.

Murai M, Enokido Y, Inamura N, Ynoshino M, Nakatsu Y, van der Horst GT, et al. Early postnatal ataxia and abnormal cerebellar development in mice lacking Xeroderma pigmentosum Group A and Cockayne syndrome Group B DNA repair genes. Proc Natl Acad Sci USA 2001; 98(23): 13379-84.

Muraro NI, Pírez N, Ceriano MF. The circadian system: plasticity at many levels. Neuroscience 2013; 247: 280-93.

Nakabayashi K, Amann D, Ren Y, Saarialho-Kere U, Avidan N, Gentles S, et al. Identification of C7orf11 (TTDN1) gene mutations and genetic heterogeneity in nonphotosensitive trichothiodystrophy. Am J Hum Genet 2005; 76(3): 510-6.

Nakazawa Y, Sasaki K, Mitsutake N, Matsuse M, Shimada M, Nardo T, et al. Mutations in UVSSA cause UV-sensitive syndrome and impair RNA polymerase IIo processing in transcription-coupled nucleotide-excision repair. Nat Genet 2012; 44(5): 586-92.

Nance MA, Berry SA. Cockayne syndrome: review of 140 cases. Am J Med Genet 1992; 42: 68-84.

Nardo T, Oneda R, Spivak G, Vaz B, Mortier L, Thomas P, et al. A UV-sensitive patient with a specific CSA mutation reveals separable roles for CSA in response to UV and oxidative DNA damage. Proc Natl Acad Sci USA 2009; 106 (15): 6209-14.

Neeley WL, Essigmann JM. Mechanisms of formation, genotoxicity, and mutation of guanine oxidation products. Chem Res Toxicol 2006; 19(4): 491-505.

Ng JM, Vermeulen W, van der Horst GT, Bergink S, Sugasawa K, Vrieling H, Hoeijmakers JH. A novel regulation mechanism of DNA repair by damage-induced and RAD23-dependent stabilization of xeroderma pigmentosum group C protein. Genes Dev 2003; 17: 1630-45.

Niederhofer LJ, Odjik H, Budzowska M, van Drunen E, Maas A, Theil AF, et al. The structure-specific endonuclease ERCC1-XPF is required to resolve DNA interstrand cross-link-induced double-strand breaks. Mol Cell Biol 2004; 24: 5776-87.

Nishiwaki Y, Kobayashi N, Imoto K, Iwamoto TA, Sugiura S, Liu YC, et al. Trichothiodystrophy fibroblasts are deficient in the repair of ultraviolet-induced cyclobutane pyrimidine dimmers and (6-4)photoproducts. J Invest Dermatol 2004; 122(2): 526-32.

Nishiwaki T, Kobayashi N, Iwamoto T, Yamamoto A, Sugiura S, Liu YC, et al. Comparative study of nucleotide excision repair defects between XPD-mutated fibroblasts derived from trichothiodystrophy and xeroderma pigmentosum patients. DNA Repair (Amst) 2008; 7(12): 1990-8.

Nohmi T. Environmental stress and lesion-bypass polymerases. Annu Rev Microbiol 2006; 60: 231-53.

Nouspikel T. DNA repair in differentiated cells: some new answers to old questions. Neuroscience 2007; 145(4): 1213-21.

Offman J, Jina N, Theron T, Pallas J, Hubank M, Lehmann A. Transcriptional changes in trichothiodystrophy cells. DNA Repair (Amst) 2008; 7(8): 1364-71.

Ogi T, Lehmann AR. The Y-family DNA polymerase κ (pol κ) functions in mammalian nucleotide-excision repair. Nature Cell Biol 2006; 8: 640-42.

Ogi T, Limsirichaikul S, Overmer RM, Volker M, Takenaka K, Cloney R, et al. Three DNA polymerases, recruited by different mechanisms, carry out NER repair synthesis in human cells. Mol Cell 2010; 37: 714-27.

Opletalova K, Bourillon A, Yang W, Pouvelle C, Armier J, Despras E, et al. Correlation of phenotype/genotype in a cohort of 23 xeroderma pigmentosum-variant patients reveals 12 new disease-causing POLH mutations. Hum Mutat 2014; 35(1): 117-28.

Osenbroch PØ, Auk-Emblem P, Halsne R, Strand J, Forstrøm RJ, van der Pluijm I, Eide L. Accumulation of mitochondrial DNA damage and bioenergetic dysfunction in CSB defective cells. FEBS J 2009; 276(10): 2811-21.

O´Sullivan CC, Moon DH, Kohn EC, Lee JM. Beyond breast and ovarian cancers: PARP inhibitors for BRCA mutation-associated and BRCA-like solid tumors. Front Oncol 2014; 4:42.

Ortolan TG, Menck CF. UVB-induced cell death signaling is associated with G1-S progression and transcription inhibition in primary human fibroblasts. PLoS One 2013; 8(10): e76936.

Parlanti E, D'Errico M, Degan P, Calcagnile A, Zijno A, van der Pluijm I, et al. The cross talk between pathways in the repair of 8-oxo-7,8-dihydroguanine in mouse and human cells. Free Rad Biol Med 2012; 53(11): 2171-7.

Pascucci B, Lemma T, Iorio E, Giovannini S, Vaz B, Iavarone I, et al. An altered redox balance mediates the hypersensitivity of Cockayne syndrome primary fibroblasts to oxidative stress. Aging Cell 2012; 11(3): 520-9.

Patel AG, Sarkaria JN, Kaufmann SH. Nonhomologous end joining drives poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) inhibitor lethality in homologous recombination-deficient cells. Proc Natl Acad Sci USA 2011; 108(8): 3406-11.

Pegg AE. Repair of O(6)-alkylguanine by alkyltransferases. Mutat Res 2000; 462: 83-100.

Petermann E, Ziegler M, Oei SL. ATP-dependent selection between single nucleotide and long patch base excision repair. DNA Repair (Amst) 2003; 2: 1101-14.

Petta TB, Nakajima S, Zlatanou A, Despras E, Couve-Privat S, Ishenko A, et al. Human DNA polymerase iota protects cells against oxidative stress. EMBO J 2008; 27(21): 2883-95.

Pettijohn D, Hanawalt P. Evidence for repair-replication of ultraviolet damaged DNA in bacteria. J Mol Biol 1964; 9: 395-410.

Pfaffl, MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. Nucleic Acids Res 2001; 29(9): e45.

Phung QH, Winter DB, Cranston A, Tarone RE, Bohr VA, Fischel R, Gearhart PJ. Increased hypermutation at G and C nucleotides in immunoglobulin variable genes from mice deficient in the MSH2 mismatch repair protein. J Exp Med 1998; 187: 1745–51.

Pipas JM. SV40: Cell transformation and tumorigenesis. Virology 2009; 384(2): 294-303.

Pitsikas P, Lee D, Rainbow AJ. Reduced host cell reactivation of oxidative DNA damage in human cells deficient in the mismatch repair gene hMSH2. Mutagenesis 2007; 22(3): 235-43.

Pizzimenti S, Ciamporcero E, Daga M, Pettazzoni P, Arcaro A, Cetrangolo G, et al. Interaction of aldehydes derived from lipid peroxidation and membrane proteins. Front Physiol 2013; 4:242.

Pollitt RJ, Jenner FA, Davies M. Siblings with mental and physical retardation and trichorrhexis nodosa with abnormal amino acid composition of the hair. Arch Dis Child 1968; 43: 211-6.

Prakash S, Johnson RE, Prakash L. Eukaryotic translesions synthesis DNA polymerases: Specificity of structure and function. Annu Rev Biochem 2005; 74: 317-53.

Protić-Sabljić M, Seetharam S, Seidman MM, Kraemer KH. An SV40-transformed xeroderma pigmentosum group D cell line: establishment, ultraviolet sensitivity, transfection efficiency and plasmid mutation induction. Mutat Res 1986; 166: 287-94.

Purnell MR, Whish WJ. Novel inhibitors of poly(ADP-ribose) synthetase. Biochem J 1980; 185(3): 775-7.

Queille S, Drougard C, Sarasin A, Daya-Grosjean L. Effects of XPD mutations on ultraviolet-induced apoptosis in relation to skin cancer-proneness in repair-deficient syndromes. J Invest Dermatol 2001; 117(5): 1162-70.

Quinet A, Vessoni AT, Rocha CR, Gottifredi V, Biard D, Sarasin A, et al. Gap-filling and bypass at the replication fork are both active mechanisms for tolerance of low-dose ultraviolet-induced DNA damage in the human genome. DNA Repair (Amst) 2014; 14: 27-38.

Rapin I, Lindenbaum Y, Dickson DW, Kraemer KH, Robbins JH. Cockayne syndrome and xeroderma pigmentosum: DNA repair disorders with overlaps and paradoxes. Neurology 2000; 55: 1442-9.

Räschle M, Knipscheer P, Enoui M, Angelov T, Sun J, Griffith JD, et al. Mechanism of replication-coupled DNA interstrand crosslink repair. Cell 2008; 134(6): 969-80.

Ravanat JL, Di Mascio P, Martinez GR, Medeiros MD, Cadet J. Singlet oxygen induces oxidation of cellular DNA. J Biol Chem 2001; 275(51): 40601-4.

Ravichandran KS, Lorenx U. Engulfment of apoptotic cells: signals for a good meal. Nat Rev Immunol 2007; 7(12): 964-74.

Reardon JT, Mu D, Sancar A. Overproduction, purification, and characterization of the XPC subunit of the human DNA-repair excision nuclease. J Biol Chem 1996; 271: 19451-56.

Reardon JT, Ge H, Gibbs E, Sancar A, Hurwitz J, Pan ZQ. Isolation and characterization of two human transcription factor IIH (TFIIH)-related complexes: ERCCS/CAK and TFIIH. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1998; 93: 6482-87.

Reardon JT, Sancar A. Recognition and repair of the cyclobutane thymine dimer, a major cause of skin cancers, by the human excision nuclease. Genes Dev 2003; 17: 2539-51.

Revet I, Feeney L, Tang AA, Huang EJ, Cleaver JE. Dysmyelination not demyelination causes neurological symptoms in preweaned mice in a murine model of Cockayne syndrome. Proc Natl Acad Sci USA 2012; 109(12): 4627-32.

Rey L, Sidorova JM, Puget N, Boudsocq F, Biard DS, Monnat RJ Jr, et al. Human DNA polymerase eta is required for common fragile site stability during unperturbed DNA replication. Mol Cell Biol 2009; 29(12): 3344-54.

Riou L, Eveno E, van Hoffen A, van Zeeland A, Sarasin A, Mullenders LHF. Differential repair of the two major UV-induced photolesions in trichothiodystrophy fibroblasts. Cancer Res 2004; 64: 889-94.

Robbins JH, Kraemer KH, Ltzner MA, Festoff BW, Coon HG. Xeroderma pigmentosum. An inherited disease with sun sensitivity, multiple cutaneous neoplasms, and abnormal DNA repair. Ann Intern Med 1974; 80(2): 221-48.

Robertson AB, Klungland A, Rognes T, Leiros I. Base excision repair: the long and short of it. Cell Mol Life Sci 2009; 66: 981-93.

Roerink SF, van Schendel R, Tijsterman M. Polymerase theta-mediated end joining of replication-associated DNA breaks in C. elegans. Genome Res 2014; Mar 10. Epub ahead of print.

Rohs R, Sklenar H. Methylene blue binding to DNA with alternating GC base sequence: continuum treatment of salt effects. Indian J Biochem Biophys 2001; 38(1-2): 1-6.

Rocha CR, Lerner LK, Okamoto OK, Marchetto MC, Menck CF. The role of DNA repair in the pluripotency and differentiation of human stem cells. Mutat Res 2013; 752(1): 25-35.

Rouleau M, Patel A, Hendzel MJ, Kaufmann SH, Poirier GG. PARP inhibition: PARP1 and beyond. Nat Rev Cancer 2010; 10(4): 293-301.

Ryter SW, Kim HP, Hoetzel A, Park JW, Nakahira K, Wang X, Choi AM. Mechanisms of cell death in oxidative stress. Antioxid Redox Signal 2007; 9(1): 48-89.

Saffi J, Agnoletto MH, Guecheva TN, Batista LF, Carvalho H, Henriques JA, et al. Effect of the anti-neoplastic drug doxorubicin on XPD-mutated DNA repair-deficient human cells. DNA Repair (Amst) 2010; 9(1): 40-7.

Sage E, Harrison L. Clustered DNA lesion repair in eukaryotes: relevance to mutagenesis and cell survival. Mutat Res 2011; 711(1-2): 123-33.

Sage E, Girard PM, Francesconi S. Unravelling UVA-induced mutagenesis. Photochem Photobiol Sci 2012; 11: 74-80.

Saijo M. The role of Cockayne syndrome group A (CSA) protein in transcription-coupled nucleotide excision repair. Mech Ag Dev 2013; 134: 196-201.

Sale JE, Lehmann AR, Woodgate R. Y-family DNA polymerases and their role in tolerance of cellular DNA damage. Nat Rev Mol Cell Biol 2012; 13: 141-52.

Sancar A, Lindsey-Boltz LA, Unsal-Kacmaz K, Linn S. Molecular mechanisms of mammalian DNA repair and the DNA damage checkpoints. Annu Rev Biochem 2004; 73: 39-85.

Sarasin A. SOS response in mammalian cells. Cancer Invest 1985; 3(2): 163-74.

Sarasin A, Goze A, Devoret R, Moulé Y. Induced reactivity of UV-damaged phage gamma in E. coli K12 host cells treated with aflatoxin B1 metabolites. Mutat Res 1977; 42(2): 205-14.

Sarasin A, Hanawalt PC. Carcinogens enhance survival of UV-irradiated simian virus 40 in treated monkey kidney cells: induction of a recovery pathway? Proc Natl Acad Sci 1978; 75(1): 346-50.

Sarasin A, Blanchet-Bardon C, Renault G, Lehmann A, Arlett C, Dumez Y. Prenatal diagnosis in a subset of trichothiodystrophy patients defective in DNA repair. Br J Dermatol 1992; 127(5): 485-91.

Saribasak H, Gearhardt PJ. Does DNA repair occur during somatic hypermutation? Semin Immunol 2012; 24(4): 287-92.

Sebesta M, Burkovics P, Juhasz S, Zhang S, Szabo JE, Lee MY, et al. Role of PCNA and TLS polymerases in D-loop extension during homologous recombination in humans. DNA Repair (Amst) 2013; 12(9): 691-8.

Sedgwick B, Bates PA, Paik J, Jacobs SC, Lindahl T. Repair of alkylated DNA: recent advances. DNA Repair (Amst) 2007; 6: 429-42.

Schlacher K, Goodman MF. Lessons from 50 years of SOS DNA-damage-induced mutagenesis. Nat Rev Mol Cell Biol 2007; 8(7): 587-94.

Schmickel RD, Chu EH, Trosko JE, Chang CC. Cockayne syndrome: a cellular sensitivity to ultraviolet light. Pediatrics 1977; 60(2): 135-9.

Schneider JE, Price S, Maidt L, Gutteridge JM, Floyd RA. Methylene blue plus visible light mediates 8-hydroxy 2´-deoxyguanosine formation in DNA preferentially over strand breakage. Nucleic Acids Res 1990; 18(3): 631-5.

Schuch AP, da Silva Galhardo R, de Lima-Bessa KM, Schuch NJ, Menck CF. Development of a DNA-dosimeter system for monitoring the effects of solar-ultraviolet radiation. Photochem Photobiol Sci 2009; 8(1): 111-20.

Schuch AP, Menck CF. The genotoxic effects of DNA lesions induced by artificial UV-radiation and sunlight. J Photochem Photobiol B 2010; 99: 111-6.

Schwertmann P, Lagarou A, Dekkers DH, Raams A, van der Hoek C, Laffeber C, et al. UV-sensitive syndrome protein UVSSA recruits USP7 to regulate transcription-coupled repair. Nat Genet 2012; 44(5): 598-602.

Schwertmann P, Vermeulen W, Marteijn JA. UVSSA and USP7, a new couple in transcription-coupled DNA repair. Chromosoma 2013; 122: 275-84.

Sepe S, Payan-Gomez C, Milanese C, Hoeijmakers JH, Mastroberardino PG. Nucleotide excision repair in chronic neurodegenerative diseases. DNA Repair (Amst) 2013; 12(8): 568-77.

Shachar S, Ziv O, Avkin S, Adar S, Wittschieben J, Reissner T, et al. Two-polymerase mechanisms dictate error-free and error-prone translesion DNA synthesis in mammals. EMBO J 2009; 28: 383-93.

Sharma S, Helchowski CM, Canman CE. The roles of DNA polymerases ξ and the Y-family DNA polymerases in promoting or preventing genome instability. Mutat Res 2012; 743-744: 97-110.

Shen YH, Chen BR, Cherng SH, Chueh PJ, Tan X, Lin YW, et al. Cisplatin transiently up-regulates hHR23 expression through enhanced translational efficiency in A549 adenocarcinoma cells. Toxicol Lett 2011; 205(3): 341-50.

Shibutani S, Takeshita M, Grollman AP. Insertion of specific bases during DNA synthesis past the oxidation-damaged base 8-oxodG. Nature 1991; 349(6308): 431-4.

Soltys DT, Rocha CR, Lerner LK, de Souza TA, Munford V, Cabral F, et al. Novel XPG (ERCC5) mutations affect DNA repair and cell survival after ultraviolet but not oxidative stress. Hum Mutat 2013; 34(3): 481-9.

Soufir N, Ged C, Bourillon A, Austerlitz F, Chemin C, Stary A, et al. A prevalent mutation with founder effect in xeroderma pigmentosum group C from north Africa. J Invest Dermatol 2010; 130: 1537-42.

Spivak G, Hanawalt PC. Host cell reactivation of plasmids containing axoidative DNA lesions is defective in Cockayne syndrome but normal in UV-sensitive syndrome fibroblasts. DNA Repair (Amst)2006; 5(1): 13-22.

Stefanini M, Lagomarsini P, Giliani S, Nardo T, Botta E, Peserico A, et al. Genetic heterogeneity of the excision repair defect associated with trichothiodystrophy. Carcinogenesis 1993; 14: 1101-5.

Stefanini M, Botta E, Lanzafame M, Orioli D. Trichothiodystrophy: From basis mechanisms to clinical implications. DNA Repair 2010; 9: 2-10.

Staresincic L, Fagbemi AF, Enzlin JH, Gourdin AM, Wijgers N, Dunand-Sauthier I, et al. Coordination of dual incision and repair synthesis in human nucleotide excision repair. EMBO J 2009; 28(8): 1111-20.

Stevnsner T, Muftuoglu M, Aamann MD, Bohr VA. The role of Cockayne Sydrome group B (CSB) protein in base excision repair and aging. Mech Ageing Develop 2008; 129: 441-8.

Sugasawa K, Ng JM, Masutani C, Maekawa T, Uchida A, van der Spek PJ, et al. Two human homologs of Rad23 are functionally interchangeable in complex formation and stimulation of XPC repair activity. Mol Cell Biol 1997; 17: 6924-31.

Sugasawa K, Ng JM, Masutani C, Iwai S, van der Spek PJ, Eker AP, et al. Xeroderma pigmentosum group C protein complex is the initiator of global genome nucleotide excision repair. Mol Cell 1998; 2: 223-32.

Sugasawa K, Okamoto T, Shimizu Y, Masutani C, Iwai S, Hanaoka F. A multistep damage recognition mechanism for global genomic nucleotide excision repair. Genes Dev 2001; 15: 507-21.

Swanson AL, Wang J, Wang Y. Accurate and efficient bypass of 8,5´-cyclopurine-2´-deoxynucleosides by humand and yeast DNA polymerase η. Chem Res Toxiocol 2012; 25(8): 1682-91.

Taira K, Kaneto S, Nakano K, Watanabe S, Takahashi E, Arimoto S, et al. Distinct pathways for repairing mutagenic lesions induced by methylating and ethylating agents. Mutagenesis 2013; 28(3): 341-50.

Takayama K, Salazar EP, Lehmann AR, Stefanini M, Thompson LH, Weber CA. Defects in the repair and transcription gene ERCC2 in the cancer-prone disorder xeroderma pigmentosum group D. Cancer Res 1995; 55: 5656-63.

Takeuchi H, Rünger TM. Longwave UV light induces the aging-associated progerin. J Invest Dermatol 2013; 133(7): 1857-62.

Tanioka M, Masaki T, Ono R, Nagano T, Otoshi-Honda E, Matsumura Y, et al. Molecular analysis of DNA polymerase eta gene in Japanese patients diagnosed as Xeroderma Pigmentosum Variant type. J Invest Der 2007; 127: 1745-51.

Tardivo JP, Wainwright M, Baptista MS. Local clinical phototreatment of herpes infection in São Paulo. Photodiagnosis Photodyn Ther 2012; 116: 89-94.

Taylor EM, Broughton BC, Botta E, Stefanini M, Sarasin A, Jaspers NG, et al. Xeroderma pigmentosum and trichothiodystrophy are associated with different mutations in the XPD (ERCC2) repair/transcription gene. Proc Natl Acad Sci USA 1997; 94: 8658-63.

Thornberry NA. Caspases: key mediators of apoptosis. Chem Biol 1998; 5(5): R97-103.

Todd P. Fractionated ultraviolet light irradiation of cultured Chinese hámster cells. Radiat Res 1973; 55(1): 93-100.

Todd P, Dalen H, Schroy CB. Survival of synchronized cultured human liver cells following single and fractionated exposures to ultraviolet light. Radiat Res 1977; 69(3): 573-82.

Tomicic MT, Reischmann P, Rasenberger B, Meise R, Kaina B, Christmann M. Delayed c-Fos activation in human cells triggers XPF induction and an adaptative response to UVC-induced DNA damage and cytotoxicity. Cell Mol Life Sci 2011; 68(10): 1785-98.

Tomkinson AE, Levin DS. Mammalian DNA ligases. Bioassays 1997; 19: 893-901.

Tornaletti S, Maeda LS, Kolodner RD, Hanawalt PC. Effect of 8-oxoguanine on transcription elongation by T7 RNA polymerase and mammalian RNA polymerase II. DNA Repair (Amst) 2004; 3(5): 483-94.

Totonchy MB, Tamura D, Pantell MS, Zalewski C, Bradford PT, Merchant SN, et al. Auditory analysis of xeroderma pigmentosum 1971-2012: hearing function, sun sensitivity and DNA repair defect predict neurological degeneration. Brain 2013; 136(Pt 1): 194-208.

Tsodikov OV, Ivanon D, Orelli B, Staresincic L, Shoshani I, Oberman R, et al. Structural basis for the recruitment of ERCC1-XPF to nucleotide excision repair complexes by XPA. EMBO J 2007; 26: 4768-76.

Tuite EM, Kelly JM. Photochemical interactions of methylene blue and analogues with DNA and other biological substrates. J Photochem Photobiol B 1993; 21(2-3): 103-24.

Tuo J, Jaruga P, Rodriguez H, Bohr VA, Dizdaroglu M. Primary fibroblasts of Cockayne syndrome patients are defective in cellular repair of 8-hydroxy-guanine and 8-hydroxyadenine resulting from oxidative stress. FASEB J 2003; 17: 668-74.

Turrens JF. Mitochondrial formation or reactive oxygen species. J Phisiol 2003; 522(2): 335-44.

Ueda T, Compe E, Catez P, Kraemer KH, Egly JM. Both XPD alleles contribute to the phenotype of compound heterozygote xeroderma pigmentosum patients. J Exp Med 2009; 206(13): 3031-46.

Vaisman A, Masutani C, Hanaoka F, Chaney SG. Efficient translesion replication past oxaliplatin and cisplatin GpG adducts by human DNA polymerase eta. Biochemistry 2000; 39: 4575–80.

Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MTD, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. Int J Biochem Cell Biol 2007; 39(1): 44-84.

Vandenabeele P, Galluzzi L, Vanden Berghe T, Kroemer G. Molecular mechanisms of necroptosis: an ordered cellular explosion. Nat Rev Mol Cell Biol 2010; 11(10): 700-14.

Vanden Berghe T, Linkermann A, Jouan-Lanhouet S, Walczak H, Vandenabeele P. Regulated necrosis: the expanding network of non-apoptotic cell death pathways. Nat Rev Mol Cell Biol 2014; 15(2): 135-47.

Van den Boom V, Citterio E, Hoogstraten D, Zotter A, Egly JM, van Capellen WA, et al. DNA damage stabilizes interaction of CSB with the transcription elongation machinery. J Cell Biol 2004; 166: 27-36.

Van de Ven M, Andressoo JO, van der Horst GTJ, Hoeijmakers JHJ, Mitchell JR. Effects of compound heterozygosity at the Xpd locus on cancer and ageing in mouse models. DNA Repair 2012; 11(11): 874-83.

Van Hoffen A, Natarajan AT, Mayne LV, van Zeeland AA, Mullenders LHF, Venema J. Deficient repair of the transcribed strand of active genes in Cockayne´s syndrome cells. Nucleic Acids Res 1993; 21: 5890-5.

Van Hoffen A, Kalle WH, de Jong-Versteeg A, Lehmann AR, van Zeeland AA, Mullenders LH. Cells from XP-D and XP-D-CS patients exhibit equally inefficient repair of UV-induced damage in transcribed genes but different capacity to recover UV-inhibited transcription. Nucleic Acids Res 1999; 27(14): 2898-904.

Vélez-Cruz R, Zadorin AS, Coin F, Egly JM. Sirt1 suppresses RNA synthesis after UV irradiation in combined xeroderma pigmentosum group D/Cockayne syndrome (XP-D/CS) cells. Proc Natl Acad Sci USA 2012; 110(3): E212-20.

Vélez-Cruz R, Egly JM. Cockayne syndrome group B (CSB) protein: At the crossroads of transcriptional networks. Mech Ag Dev 2013; 134: 234-42.

Victor VM, Rocha M, Espluges JV, De la Fuente M. Role of free radicals in sepsis: antioxidant therapy. Curr Pharm Des 2005; 11: 3141-58.

Volker M, Moné MJ, Karmakar P, van Hoffen A, Schul W, Vermeulen W, et al. Sequential assembly of the nucleotide excision repair factors in vivo. Mol Cell 2001; 8: 213-24.

Wainwright M, Phoenix DA, Rice L, Burrow SM, Waring J. Increased cytotoxicity in the methylene blue series via chromophore methylation. J Phtochem Photobiol B 1997; 40(3): 233-9.

Wainwright M, Amaral L. The phenothiazinium chromophore and the evolution of antimalarial drugs. Trop Med Int Health 2005; 10(6): 501-11.

Wallace SS. DNA glycosylases search for and remove oxidized DNA bases. Environ Mol Mutagen 54(9): 691-704.

Wang M, Wu W, Wu W, Rosidi B, Zhang L, Wang H, Iliakis G. PARP-1 and Ku compete for repair of DNA double strand breaks by distinct NHEJ pathways. Nucleic Acids Res 2006; 34(21): 6170-82.

Wang X, Fang H, Huang Z, Shang W, Hou T, Cheng A, Cheng H. Imaging ROS signaling in cells and animals. J Mol Med (Berl) 2013; 91: 917-27.

Wang W. Emergence of a DNA-damage response network consisting of Fanconi anaemia and BRCA proteins. Nat Rev Gen 2007; 8: 735-48.

Warrick E, Garcia M, Chagnoleau C, Chevallier O, Bergoglio V, Sartori D, et al. Preclinical corrective gene transfer in xeroderma pigmentosum human skin stem cells. Mol Ther 2012; 20(4): 798-807.

Waters LS, Minesinger BK, Willtrout ME, D'Souza S, Woodruff RV, Walker GC. Eukaryotic translesion polymerases and their roles and regulation in DNA damage tolerance. Microbiol Mol Biol Rev 2009; 73(1): 134-54.

Weeda G, Eveno E, Donker I, Vermeulen W, Chevallier-Lagente O, Taïeb A, et al. A mutation in the XPB/ERCC3 DNA repair transcription gene, associated with trichothiodystrophy. Am J Hum Genet 1997; 60(2): 320-9.

Weidenheim KM, Dickson DW, Rapin I. Neuropathology of Cockayne syndrome: evidence for impaired development, premature aging, and neurodegeneration. Mech Ageing Dev 2009; 130: 619-36.

Weigle JJ. Induction of mutations in a bacterial virus. Proc Natl Acad Sci USA 1953; 39(7): 628-36.

Weill JC, Reynaud CA. DNA polymerases in adaptative immunity. Nature Rev Immunol 2008; 8: 302-12.

Wiesendanger M, Kneitz B, Edelmann W, Scharff MD. Somatic hypermutation in MutS homologue (MSH)3-, MSH6- and MSH3/MSH6-deficient mice reveals a role for the MSH2-MSH6 heterodimer in modulating the base substitution pattern. J Exp Med 2000; 191(3): 579-84.

Williams JH, Phillips TD, Jolly PE, Stiles JK, Jolly CM, Aggarwal D. Human aflatoxicosis in developing countries: a review of toxicology, exposure, potential health consequences, and interventions. Am J Clin Nutr 2004; 80: 1106-22.

Wittschieben J, Shivji MK, Lalani E, Jacobs MA, Marini F, Gearhart PJ, et al. Disruption of the developmentally regulated Rev3l gene causes embryonic lethality. Curr Biol 2000; 10(19): 1217-20.

Wolski SC, Kuper J, Hänzelmann P, Truglio JJ, Croteau DL, van Houten B, Kisker C. Crystal structure of the FeS cluster-containing nucleotide excision repair helicase XPD. Plos Biol 2008; 6(6): e149.

Wood R. Mammalian Nucleotide Excision Repair Proteins and Interstrand Crosslink Repair. Environ Mol Mut 2010; 51: 520-6.

Wu L, Hickson ID. The Bloom´s syndrome helicase suppresses crossing over during homologous recombination. Nature 2003; 426: 870-4.

Xu C, Min J. Strcuture and function of WD40 domain proteins. Protein Cell 2011; 2(3): 202-14.

Xu-Welliver M, Pegg AE. Degradation of the alkylated form of the DNA repair protein, O(6)-alkylguanine-DNA-alkyltransferase. Carcinogenesis 2002; 23: 823-30.

Yamamoto A, Nakamura Y, Kobayashi N, Iwamoto T, Yoshioka A, Kuniyasu H, et al. Neurosn and astrocytes exhibit lower activities of global genome nucleotide excision repair than do fibroblasts. DNA Repair (Amst) 2007; 6(5): 649-57.

Yang CG, Garcia K, He C. Damage detection and base-flipping in direct DNA alkylation repair. Chembiochem 2009; 10(3): 417-23.

Yarosh D, Klein J, O'Connor A, Hawk J, Rafal E, Wolf P. Effect of topically applied T4 endonuclease V in liposomes on skin cancer in xeroderma pigmentosum: a randomized study. Xeroderma Pigmentosum Study Group. Lancet 2001; 357(9260): 926-9.

Yeiser B, Pepper ED, Goodman MF, Finkel SE. SOS-induced DNA polymerases enhance long-term survival and evolutionary fitness. Proc Natl Acad Sci USA 2002; 99(13): 8737-41.

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 2000; 275(13): 9870-5.

You C, Swanson AL, Dai X, Yuan B, Wang J, Wang Y. Translesion synthesis of 8,5´-cyclopurine-2´-deoxynucleosides by DNA polymerases η, ι, and ξ. J Biol Chem 2013; 288(40): 28548-56.

You JS, Wang M, Lee SH. Biochemical analysis of the damage recognition process in nucleotide excision repair. J Biol Chem 2003; 278: 7476-85.

Yuan J, Lipinski M, Degterev A. Diversity in the mechanisms of neuronal cell death. Neuron 2003; 40(2): 401-13.

Zeng X, Winter DB, Kasmer C, Kraemer KH, Lehmann AR, Gearhart PJ. DNA polymerase η is an A-T mutator in somatic hypermutation of immunoglobulin variable genes. Nature Immunol 2001; 2(6): 537-41.

Zhang X, Horibata K, Saijo M, Ishigami C, Ukai A, Kanno S, et al. Mutations in UVSSA cause UV-sensitive syndrome and destabilize ERCC6 in transcription-coupled DNA repair. Nat Genet 2012; 44(5): 593-7.

Zhou X, Khan SG, Tamura D, Ueda T, Boyle J, Compe E, et al. Abnormal XPD-induced nuclear receptor transactivation in DNA repair disorders: trichothiodystrophy and xeroderma pigmentosum. Eur J Hum Genet 2013; 21(8): 831-7.

Zlatanou A, Despras E, Braz-Petta T, Boubakour-Azzouz I, Pouvelle C, Stewart GS, et al. The hMsh2-hMsh6 complex acts in concert with monoubiquinated PCNA and Pol η in response to oxidative DNA damage in human cells. Mol Cell 2011; 43(4): 649-62.