

# Resposta a danos no DNA após exposição à luz ultravioleta: apagando o fogo antes do incêndio celular

DNA damage response following UV-light exposure: putting out the fire before cell collapse

Leonardo Carmo de Andrade Lima\*

Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

\*Contato: leolima11@gmail.com

**Resumo.** O DNA é uma molécula reativa e estima-se que mais de 20 mil lesões no DNA sejam induzidas de maneira endógena por dia por célula, além de outras induzidas por agentes exógenos como a luz ultravioleta, resultando em bloqueio físico das maquinarias de replicação e transcrição do DNA. Em resposta a lesões no DNA, células ativam respostas que promovem regulação do ciclo celular e reparo do DNA, evitando catástrofes durante a replicação ou na mitose. Caso a quantidade de danos ultrapasse a capacidade de reparo, as células podem induzir morte celular como último recurso. A importância das respostas ao dano no DNA é exemplificada por síndromes humanas, com fenótipo de envelhecimento precoce ou aumento de risco de câncer, e seu estudo poderá contribuir para o entendimento da tumorigênese e desenvolvimento de melhores terapias.

**Palavras-chave.** Luz ultravioleta; Reatividade do DNA; Reparo do DNA; Xeroderma pigmentosum; Tumorigênese; Mutagênese.

**Abstract.** DNA is a reactive molecule and it is estimated that more than 20 thousand lesions are induced endogenously per cell per day, besides other induced by exogenous agents such as ultraviolet light exposure, resulting in physical blockage of DNA replication and transcription machineries. In response to DNA damage, cells activate responses that promote cell cycle regulation and DNA repair, avoiding replication or mitosis catastrophe. If DNA damage exceeds DNA repair capacity, cells induce cell death as last resort. The importance of responses to DNA damage is exemplified by human syndromes with premature aging phenotype and increased risk of cancer, and their study could contribute to understanding of tumorigenesis and development of improved therapies.

**Keywords.** Ultraviolet light, DNA reactivity, DNA repair; Xeroderma pigmentosum; Tumorigenesis; Mutagenesis.

“Nós não consideramos o possível papel de... reparo [de DNA] embora... eu mais tarde vim a perceber que o DNA é tão precioso que provavelmente diversos mecanismos de reparo devam existir” – (Crick 1974)

## A reatividade do DNA e necessidade de reparo

Inicialmente, o DNA era percebido como uma macromolécula altamente estável, porém somente algum tempo depois que a estrutura da dupla-hélice foi desvendada por Watson e Crick é que foi compreendida a sua instabilidade natural, devido à sua estrutura química e reatividade com numerosa quantidade de agentes químicos e físicos. Curiosamente, muito antes da constatação de que DNA era o material hereditário das células, em 1944, já era conhecido que agentes ambientais como raios-X induziam mutações (Muller, 1927) e que células tinham habilidade inata de se recuperarem de irradiação com luz ultravioleta (UV), mesmo sem saber exatamente que tipo de dano era induzido em células (Hollander e Claus, 1936). O primeiro mecanismo de

recuperação celular – a fotorreativação – foi descrito em 1949 (Kelner, 1949), mas foi na década de 60 que foi desvendada a natureza da lesão no DNA provocada por luz UV e o mecanismo independente de luz – o reparo por excisão de nucleotídeos. Ao longo do tempo, outros tipos de danos no DNA, além dos induzidos por radiações, foram descritos reafirmando a alta reatividade da molécula de DNA e a necessidade de correção das lesões. A figura 1 resume trabalhos de destaque que contribuíram para o entendimento da resposta celular ao dano no DNA através de uma linha do tempo, adaptada da revisão de Ljungman, 2010.

Danos no DNA são alterações químicas da dupla-hélice que desafiam constantemente a estabilidade genômica, já que podem comprometer o metabolismo do DNA (replicação e transcrição) e resultarem em mutações pontuais, durante a fase S, ou em aberrações cromossômicas quando existem quebras no DNA. Assim, desempenham importante papel nos processos biológicos de tumorigênese e envelhecimento (Friedberg, 2003; Menck e Munford, 2014). Hoje

Recebido: 12jun14

Aceito: 16jan15

Publicado: 02fev15

Revisado por  
Carlos Ribeiro  
Vilela, Carolina de  
Oliveira Rodini e  
Anônimo

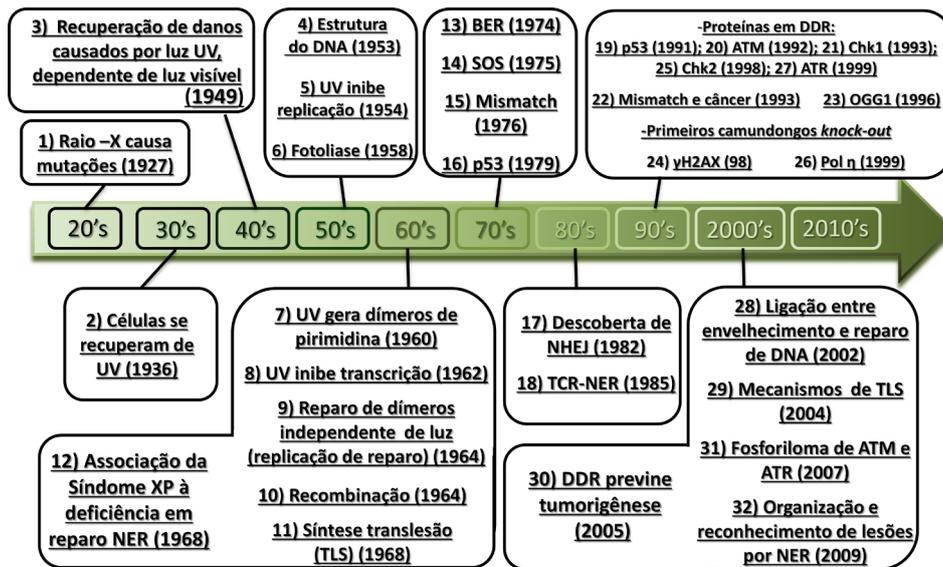


Figura 1. Linha do tempo com principais trabalhos e descobertas em relação à resposta ao dano no DNA. O número em parênteses corresponde ao ano de publicação do trabalho e foi adaptada da revisão de Ljungman, 2000. 1 - (Muller 1927); 2 - (Hollaender e Claus, 1936); 3 - (Kelner 1949); 4 - (Watson e Crick, 1953); 5 - (Kanazir e Errera, 1954); 6 - (RupertT et al., 1958); 7 - (Beukers e Berends, 1960); 8 - (Masters e Pardee, 1962); 9 - (Boyce e Howard-Flanders, 1964; Setlow e Carrier, 1964); 10 - (Holliday 1964); 11 - (Rupp e Howard-Flanders, 1968); 12 - (J E Cleaver 1968); 13 - (Lindahl 1974); 14 - (Witkin 1974); 15 - (Wagner e Meselson, 1976); 16 - (Lane e Crawford, 1979; Linzer e Levine, 1979); 17 - (Wilson et al., 1982); 18 - (Mellon et al., 1987); 19 - (Kastan et al. 1991); 20 - (Kastan et al. 1992); 21 - (Walworth et al., 1993); 22 - (Fishel et al. 1993); 23 - (van der Kemp et al. 1996); 24 - (Rogakou et al. 1998); 25 - (Matsuoka et al., 1998); 26 - (Masutani et al. 1999); 27 - (Tibbetts et al. 1999); 28 - (de Boer et al. 2002); 29 - (Kannouche et al., 2004); 30 - (Bartkova et al. 2005; Gorgoulis et al. 2005); 31 - (Matsuoka et al. 2007; Stokes et al. 2007); 32 - ( Sugasawa et al. 2009) .

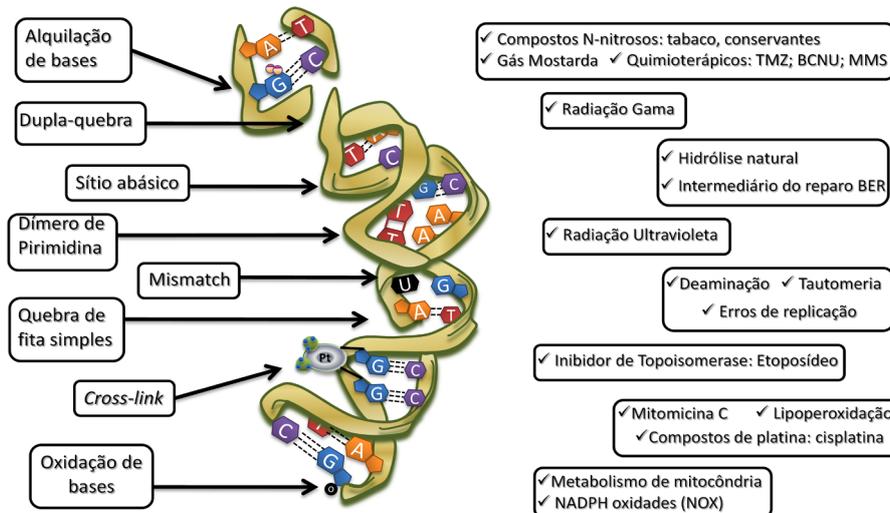


Figura 2. A reatividade da molécula do DNA. Representação da dupla hélice do DNA com principais tipos de lesão (à esquerda) e seus respectivos agentes causadores (à direita).

conhecemos diversas causas das modificações no DNA. Milhares de purinas são perdidas todos os dias, devido à depurinação espontânea do DNA, e as bases nitrogenadas são suscetíveis à deaminação (Lindahl, 1993). Agentes endógenos, como o metabolismo da mitocôndria e NADPH oxidases, geram espécies reativas de oxigênio como subproduto (Jaruga e Dizdaroglu, 1996) e afetam o DNA além de outras moléculas na célula, como lipídios de membrana. Esse processo de peroxidação lipídica da membrana é capaz de gerar outros compostos – aldeídos – também capazes de reagir com o DNA. Estima-se que mais de 20 mil lesões no DNA sejam induzidas de maneira endógena por dia em cada célula (Friedberg, 2006). Além disso, diferentes agentes exógenos, físicos e químicos, podem interagir e causar alterações na estrutura

do DNA, dentre os quais: luz UV, radiação ionizante, conservantes de alimentos, poluição atmosférica, fumaça de cigarro e quimioterápicos (Fig. 2).

### Luz UV e consequências dos fotoprodutos

A luz ultravioleta, por ser parte integrante da radiação solar, é o agente físico capaz de lesionar o DNA a que estamos mais expostos. A luz UV representa 45% do espectro solar, situa-se abaixo do comprimento de onda da luz visível e é subdividida didaticamente em três faixas de acordo com o comprimento de onda: UVA, com comprimento entre 320 e 400 nm; UVB, entre 280 e 320 nm e UVC, entre 100 e 280 nm. A camada de ozônio e a atmosfera terrestre absorvem toda luz UVC e grande parte de luz UVB (Rowland, 2006)

e, assim, o que atinge a superfície terrestre é luz UVA e uma fração de luz UVB. Por apresentar maior comprimento de onda, a luz UVA é menos energética e possui maior penetração na pele quando comparado com luz UVB (Fig. 3A). Porém, mesmo atingindo somente a epiderme, a luz UVB é a maior responsável pelo efeito biológico nocivo de luz UV sobre as células por ser mais absorvida pelas moléculas de DNA (absorção máxima em 260 nm – na faixa de UVC), causando 90% dos danos provocados pela luz solar (Woollons et al., 1997). Uma vez absorvida, a luz UV induz reações nas bases do DNA, gerando lesões conhecidas como fotoprodutos de DNA. Estes promovem grandes distorções na estrutura do DNA, o que compromete mecanismos vitais para a célula por promover um bloqueio físico das maquinarias de replicação e transcrição do DNA (Tornaletti, 2009).

Os fotoprodutos formados mais comuns são os dímeros de pirimidina ciclobutano (CPDs) e os fotoprodutos 6-4 pirimidina-pirimidona (6-4PPs). Os CPDs resultam de ligação covalente entre pirimidinas adjacentes da mesma cadeia de DNA pela formação de um anel de ciclobutano nas posições C-5 e C-6, enquanto os 6-4PPs são resultado da ligação covalente não cíclica entre duas pirimidinas adjacentes na mesma fita de DNA, entre as posições C-6 e C-4, sem formação de anel (Rastogi et al., 2010) (Fig. 3B). A proporção de fotoprodutos de DNA formados, tanto por luz UVC e UVB, é de 75% de CPD e 25% de 6-4PPs (Kobayashi et al., 2001; Schuch et al., 2009). Porém, enquanto CPD é formado de maneira aleatória na cromatina, 6-4PP apresentam diferente distribuição com formação preferencial em regiões entre nucleossomos (Mitchell et al., 1990). Os 6-4PP apresentam maior distorção na dupla-hélice e, apesar de serem menos abundantes, são removidos mais rapidamente do que CPDs

por mecanismos de reparo do DNA (Costa et al., 2003). O fotoproduto 6-4PP é praticamente todo removido em 6 h, enquanto que 50% de CPD ainda persiste 24 h após a irradiação com luz UV (Kobayashi et al., 2001). Assim, as duas lesões podem contribuir para induzir a morte celular, porém em células proficientes em reparo de DNA, o reparo rápido de 6-4PP faz com que CPDs contribuam mais com as complicações celulares (Lima-Bessa et al., 2008).

A replicação do DNA lesionado pode resultar em mutação pontual por substituição de bases. A luz UV induz um padrão de mutações, conhecido como assinatura mutacional da luz UV, com a conversão de uma citosina (C) em uma timina (T) em sítios dipirimídicos (Brash et al., 1991). Existem diferentes explicações para esse fenômeno, revisados por Ikehata e Ono, 2011. Polimerases com alta fidelidade são bloqueadas pelas lesões, mas as células dispõem de polimerases especializadas que conseguem transpor essas lesões, porém com tendência maior de incorporar erros. Essas polimerases tendem a adicionar adenina, independente da base na fita molde e assim, após duas rodadas de replicação, uma citosina pode ser convertida em uma timina (Fig. 3C). Foi observado também que CPD são induzidos em maior quantidade em 5-metilcitosina de sítios dipirimídicos. A citosina em um CPD é instável e facilmente sofre deaminação, se transformando em uracila (U). Porém, se uma 5-metilcitosina desaminar, esta será transformada em timina e mesmo uma replicação sem erros resultará em mutação pontual por substituição de base (Fig. 3C). Dessa forma, se as lesões não forem removidas antes do início da replicação, mutações pontuais poderão ser formadas e contribuir para o processo de carcinogênese, aumentando o risco de câncer de pele após exposição à luz UV.

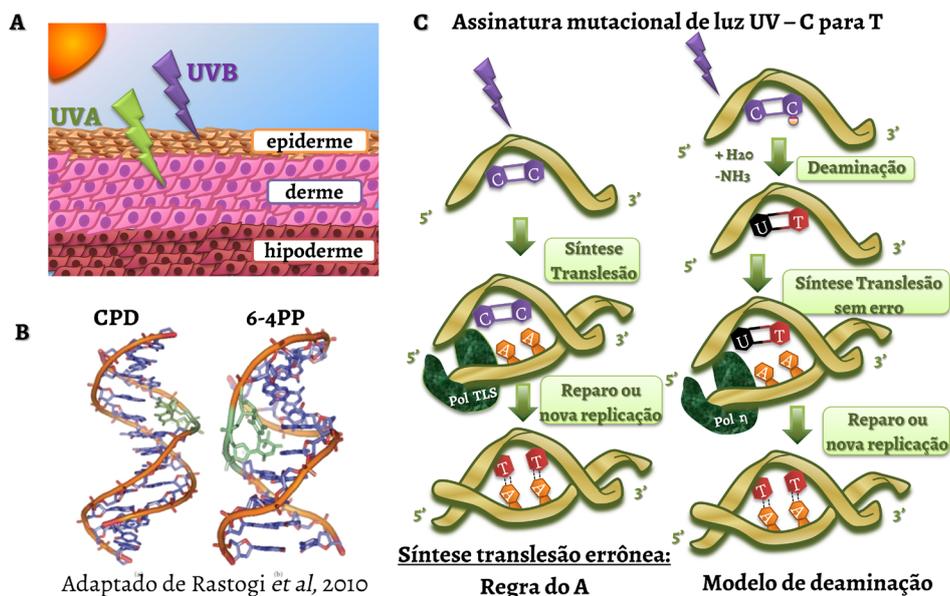


Figura 3. Luz UV: indução de danos no DNA e sua transformação em mutações pontuais. A) A Luz UVC é absorvida pela camada de ozônio de atmosfera terrestre. Da radiação solar que atinge a superfície, a porção de luz UVB possui menor penetração em relação à luz UVA, devido ao menor comprimento de onda e maior energia. B) Os dois principais fotoprodutos induzidos pela absorção de luz UV pela molécula de DNA são os dímeros de pirimidina ciclobutano (CPD) e os fotoprodutos 6-4 pirimidina-pirimidona (6-4PPs). Estruturas moleculares foram adaptadas da revisão de Rastogi, et al 2010. C) A replicação de dímeros pode resultar em mutações pontuais. A mutação de citosina para timina é a mais comum após irradiação com luz UV e é chamada de assinatura de UV. Dois modelos explicam como isso poderia acontecer: A inserção sempre de adenina oposta a um dímero por polimerases síntese translesão ou a replicação de uracila, resultado da desaminação da citosina em um dímero de pirimidina.

### Dímeros de pirimidina durante a transcrição

A transcrição da informação do DNA é responsável pela síntese de RNA e subsequentemente de proteína que coordenam o metabolismo, sendo essencial para o funcionamento e sobrevivência celular. Diferente da replicação do DNA, nenhuma RNA polimerase especializada em transpor o bloqueio gerado pelos fotoprodutos foi descoberta e, dessa forma, outras estratégias são usadas para continuar a transcrição durante todo o ciclo celular.

Foi visto na década de 80, em células de hamster, que o reparo de CPD é muito mais eficiente na fita transcrita do gene da diidrofolato redutase (DHFR) quando comparado a sequências de DNA ou genes não transcritos, levando à descoberta do reparo acoplado à transcrição (TCR – transcription coupled repair) (Bohr et al. 1985). Dessa forma, durante as fases em que não ocorre a duplicação do genoma - G0/G1 e G2/M - o reparo de DNA é focado na porção do genoma em que possam existir bloqueios de polimerase: nos genes ativos. Assim, a função do TCR é provavelmente remover obstruções para a RNA polimerase de maneira mais rápida, já que sinalização de morte por apoptose é induzida em células deficientes, onde o bloqueio da transcrição é persistente (Ljungman e Zhang, 1996).

### Dímeros durante a replicação – Síntese Translesão e mecanismos alternativos

Apesar de que mutações no DNA possam ser vantajosas ou neutras para a sobrevivência, a maior parte será deletéria e poderá comprometer controle da divisão celular, resultando em tumorigênese. Durante a fase S, todo o genoma está vulnerável a bloqueios e complicações decorrentes de lesões no DNA. Bloqueio da replicação pode levar ao colapso da forquilha, quebras no DNA e instabilidade genômica através de aberrações cromossômicas, como translocações e aneuploidias. Dessa forma, a estabilização e recuperação de forquilhas de replicação bloqueadas – mesmo sem a remoção das lesões no DNA – são essenciais para a integridade genômica e, assim, as vias de tolerância ao dano no DNA podem ser divididas em síntese translesão (TLS – translesion synthesis) e troca de fita molde (Template Switch) (Chang e Cimprich, 2009).

As polimerases replicativas com alta fidelidade, como Pol  $\alpha$ , Pol  $\delta$  e Pol  $\epsilon$ , pertencem à família B de DNA, mas são encontradas em células de mamíferos 8 polimerases com sítios catalíticos mais abertos e capazes de realizar a síntese translesão. Quatro delas pertencem à da família Y de DNA polimerases: Pol  $\eta$  (POLH), Pol  $\iota$  (POLI), Pol  $\kappa$  (POLK) e REV1; uma à família B de DNA polimerases: Pol  $\zeta$ , cuja subunidade catalítica é REV3L e duas à família A, com Pol  $\theta$  (POLQ) e Pol  $\nu$  (POLN) (Ghosal and Chen 2013), além da recém-descoberta DNA primase e polimerase TLS designada de PrimPol (Bianchi et al., 2013). As polimerases TLS possuem especificidade diferente para distintos danos no DNA. Por exemplo, Pol  $\eta$  insere preferencialmente duas adeninas opostas a um CPD de timinas (T<sup>A</sup>T), enquanto que Pol  $\kappa$  consegue transpor sem erros lesões em guanina induzidas por benzopireno. Polimerases TLS são consideradas propensas a erro de incorporação devido à maior frequência de erros em replicação do DNA não lesionado quando

comparado às polimerases clássicas da família B (McCulloch e Kunkel, 2008), entretanto, dependendo da polimerase TLS recrutada, a lesão pode ser replicada praticamente sem erro como Pol  $\eta$  tendo CPD de timinas (T<sup>A</sup>T) como molde (Johnson et al., 2000). A outra lesão gerada por luz UV, o dímero 6-4PP, possui uma distorção muito maior e não pode ser replicada por Pol  $\eta$  e estudos indicam que Pol  $\zeta$  e REV1 são necessárias para transpor essa lesão, porém com maior taxa de mutagênese (Nakajima et al., 2004).

Já a troca de fita molde utiliza proteínas de recombinação homóloga para temporariamente usar a cromátide-irmã não lesionada como molde de modo que seja possível transpor a lesão e continuar a replicação (Chang e Cimprich, 2009).

### Removendo dímeros – Reparo por Excisão de Nucleotídeos

A remoção dos fotoprodutos, nos humanos, é realizada somente pela via de reparo do DNA denominada de reparo por excisão de nucleotídeos (nucleotide excision repair - NER). Esta via é flexível e versátil, pois reconhece diferentes lesões que promovem distorções na dupla hélice do DNA (Nousspikel, 2009). Podemos dividir o NER em duas subvias pela diferença no reconhecimento da lesão. O primeiro é o reparo acoplado à transcrição, o qual se restringe a danos em fitas ativamente transcritas, com reconhecimento iniciado pelo bloqueio da RNA polimerase II e envolve as proteínas CSA, CSB, além da recém-descoberta UVSSA. O segundo é o reparo do genoma global, responsável pela remoção das lesões em regiões não transcritas do genoma, sendo o reconhecimento feito pelo complexo XPC-hHR23B e por DDB1-DDB2-CUL4A.

O caminho subsequente ao reconhecimento é igual para as duas vias e começa com a abertura da dupla hélice pelas helicases XPB e XPD, que fazem parte do complexo de transcrição TFIIH. Em seguida, as proteínas XPA e RPA se juntam e estabilizam o complexo e, no próximo passo, as endonucleases XPF cliva na extremidade 5' e a lacuna é preenchida pela polimerase replicativa, que utiliza como molde a fita complementar. Por fim, a endonuclease XPG cliva na extremidade 3', excisando o fragmento de 30 nucleotídeos e uma DNA ligase completa o reparo da lesão (Fig. 4) (Hana-walt e Spivak, 2008; Kamileri et al., 2012).

O reparo por excisão de nucleotídeos depende de mudanças na configuração da cromatina de tal forma que o reconhecimento e a excisão dos danos no DNA ocorrem de maneira eficiente. O complexo DDB1-DDB2-CUL4A representa um dos elos descobertos entre o reparo global e modificações pós-traducionais de histonas. A via de NER é mais eficiente em DNA nu em comparação com DNA em cromatina (Sugasawa et al., 1993) e é mais lenta em regiões de heterocromatina (Araki et al., 2000), mostrando que, além de regiões transcritas, outras porções do genoma podem ter diferença na remoção de danos no DNA, o que demonstra a importância do remodelamento da cromatina para o funcionamento do reparo de DNA.

Muitas proteínas de NER foram descobertas pela associação com algumas síndromes humanas raras com herança autossômica recessiva, dentre as quais se encontra o xero-

derma pigmentosum (XP). Pacientes com XP apresentam elevada fotossensibilidade, um aumento de quase 1000 vezes na frequência de tumores de pele em regiões expostas à luz solar e nos olhos, além disso, cerca de 30% dos pacientes desenvolvem anormalidades neurológicas. São descritos oito grupos de complementação para a síndrome XP: sete deles com mutações em genes cujos produtos proteicos estão diretamente envolvidos na cascata de NER (XP-A a XP-G) e um grupo variante (XP-V) com deficiência na polimerase de síntese translesão pol  $\eta$  (Cleaver et al., 1999a). A sensibilidade de células de pacientes XP correlaciona com a participação de diferentes proteínas na via de NER: célula de paciente XP-A (deficiente na proteína XPA) é a mais sensível à luz UVB, pois apresenta deficiência tanto da via global quanto da acoplada à transcrição, enquanto que células de paciente XP-C apresentam sensibilidade menor, já que a deficiência é só na via de reparo global. Célula de paciente XP-V não apresenta deficiência em NER, porém a deficiência na síntese translesão de pol  $\eta$  acarreta em uma ligeira sensibilidade (Fig. 5).

### Diante de tantas ameaças: Sinalização e controle do Ciclo Celular

Células em proliferação são em geral mais susceptíveis aos efeitos tóxicos de danos no DNA do que células quiescentes. Isso se deve às complicações dramáticas que podem acontecer com a replicação do DNA lesionado e durante a segregação cromossômica com quebras no DNA (Ljungman, 2010). As células ativam vias de resposta ao dano no DNA que promovem parada no ciclo celular, o qual resulta em mais tempo para que as enzimas de reparo de DNA limpem o genoma antes da síntese do DNA ou da segregação cromossômica (Harrison e Haber, 2006).

Em resposta a danos causados por luz UV, a quinase ATR (ataxia telangectasia and Rad3 related) é ativada e catalisa a fosforilação de centenas de proteínas-alvo. Uma estrutura no DNA é comum a diversos processos induzidos por danos no DNA e o responsável por estimular a atividade de ATR: DNA simples-fita (ssDNA – single stranded DNA) recoberto pelo heterotrímero RPA (replication protein A) (Cimprich e Cortez, 2008; Zou e Elledge, 2003). Células em fase G1 do ciclo celular geram ssDNA de 30 nucleotídeos como intermediário do processamento de NER e esta lacuna é estendida pela exonuclease Exo1 gerando ativação de ATR (Giannattasio et al., 2010; Hanasoge e Ljungman, 2007). Uma vez que o complexo com ATR estiver ativo na lesão do DNA, uma ampla variedade de substratos serão fosforilados, incluindo a Chk1 (checkpoint kinase 1 - Chk1). Uma vez ativada, esta proteína efetora induz uma rápida degradação de Cdc25A (Mailand, 2000), a qual inibe o complexo da Ciclina E/CDK2 (CDK2 - cyclin-dependent kinase 2) e é responsável pela transição entre G1/S. Além disso, o fator de transcrição p53 é fosforilado por ATR na serina 15, o que resulta em estabilização de p53 e aumento da transcrição de seus genes-alvo. Um alvo chave de p53 é a proteína p21, que atua como inibidor de Ciclina E/CDK2 e assim também promove parada do ciclo celular em G1 (Kastan e Bartek, 2004). Assim, Chk1-Cdc25A implementa uma resposta rápida e atrasa a transição G1/S em algumas horas, enquanto a prorrogação da parada em fase G1 é sustentada pelo mecanismo depen-

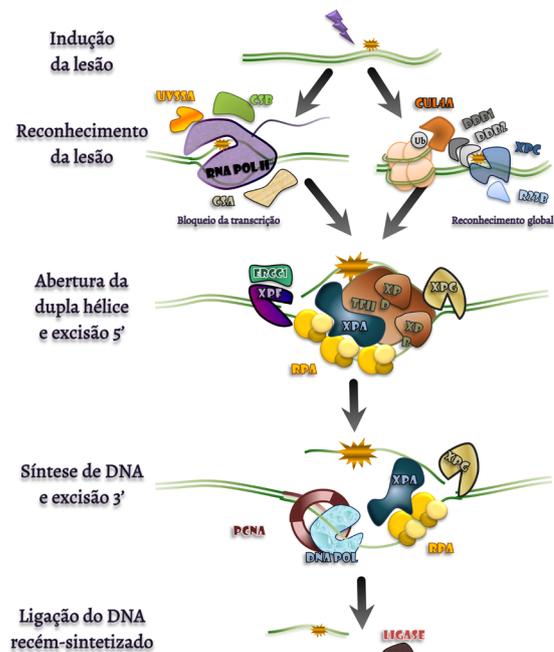


Figura 4. Modelo de reparo por excisão de nucleotídeos. O reconhecimento da lesão pode acontecer de duas formas: Bloqueio da RNA polimerase ou reconhecimento global através dos complexos de XPC e DDB1 e DDB2. Essas etapas envolvem remodelamento da cromatina, com modificação da histona, o que facilita o acesso à lesão. Em seguida TFIIF é recrutado, acontece a abertura da dupla-hélice e excisão da extremidade 5' por XPF-ERCC1. A síntese de novo do DNA preenche a lacuna e a extremidade 3' é excisada por XPG. Por fim, uma DNA ligase sela o DNA recém-sintetizado finalizando o reparo do DNA.

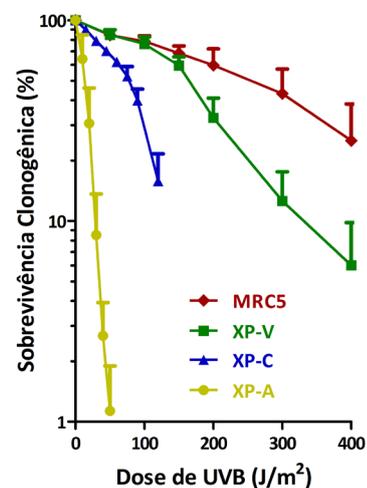


Figura 5. Sobrevivência de células mutantes em proteínas da via de reparo por excisão de nucleotídeos ou em síntese translesão, após irradiação com luz UVB. Dados próprios obtidos através de sobrevivência clonogênica em que barras de erro correspondem ao desvio padrão de três experimentos independentes. Células MRC5 são células selvagens e apresentam a menor sensibilidade à luz UVB. Células XP-V são deficientes em pol  $\eta$  (portanto, em síntese translesão), mas proficientes em reparo por excisão de nucleotídeos e são apenas um pouco mais sensíveis à luz UVB em relação a células selvagens. Já células XP-C, possuem deficiência somente no reconhecimento global de reparo por excisão de nucleotídeos pela mutação na proteína XPC e são mais sensíveis do que XP-V. porém a maior sensibilidade é observada na célula XP-A, devido à deficiência nas duas subvias de reparo por excisão de nucleotídeos.

dente de p53 (Fig. 6B). Em fase S, os fotoprodutos bloqueiam a maquinaria de replicação e isso gera desacoplamento entre a DNA polimerase e a helicase (Byun et al., 2005), o qual resulta no sinal para a ativação de ATR - ssDNA recoberto por RPA - e fosforilação de Chk1, que em fase S resultará em inibição de novas origens de replicação (Heffernan et al., 2002). Esse efeito é mais visível em células deficientes na ativação do ponto de parada de G1 (como por exemplo, deficientes em p53) e na síntese translesão de pol η, já que mais ssDNA será formado por mais bloqueios de forquilha de replicação, resultando em acúmulo de células em fase S (Fig. 6D). Células com deficiência na ativação do ponto de parada de G1, mas com síntese translesão normal, progredirão à fase G2 onde tanto lacunas opostas aos fotoprodutos (Callegari et al., 2010) quanto intermediários de NER ativarão ATR e resultarão em parada do ciclo celular em G2 (Fig. 6C).

**ATR: o bombeiro controlando o fogo no DNA**

O fosforiloma de ATR revelou 570 alvos de fosforilação após irradiação com luz UV, sendo 498 nunca antes descritos (Stokes et al., 2007). Entre esses alvos, muitos alvos envolvidos com a replicação do DNA (MCMs, RPA, RFC, TopBP1 e DNA polimerases como pol η), reforçando um papel importante no controle de origem de replicação, estabilidade da forquilha e recuperação da replicação. Além desses, muitos alvos estão relacionados a reparo do DNA como XPA (envolvida em NER), FANCD2 (envolvida em reparo de cross-link), BRCA1, 53BP1, WRN e BLM (envolvidas em recombinação homóloga) (Fig. 7). Porém, é mais impressionante o grande número de alvos em outras vias como sistema ubiquitina e proteassomo, processamento de RNA e reguladores transcricionais, matriz nuclear, remodelamento de cromatina, ritmo circadiano, diferenciação celular e desenvolvimen-

to. De fato o maior grupo fosforilado por ATR é um grupo de proteínas envolvidas em metabolismo de RNA - transcrição, processamento, estabilidade do RNAm - além de tradução de mRNAs.

O nocaute de ATR em modelos animais resulta em letalidade embrionária (Brown e Baltimore, 2000). Porém, através de modelos com nocaute condicional - eliminando ATR somente no animal adulto - ou com mutação em heterozigose foi possível constatar que a vida é muito estressante sem ATR, mesmo sem lesões exógenas. Com o modelo heterozigótico foi observado aumento de estresse replicacional durante a embriogênese - fase quando a proliferação é muito difundida - com aumento da fosforilação da histona H2AX e aumento de morte de células resultando em deformações (Murga et al., 2009). Com o nocaute condicional foi observado envelhecimento precoce no indivíduo adulto - pelos cinzas, osteoporose, cifose e fibrose - devido à perda de homeostase tecidual relacionada à incapacidade de renovação celular provocada pela redução de células tronco e progenitoras (Ruzankina et al., 2007). Assim, a função de ATR não é somente relacionada a resposta a danos no DNA causados por luz UV, mas também para responder a qualquer complicação durante a replicação. Regiões do genoma - mesmo sem danos externos - podem ser obstáculos à progressão da forquilha, como regiões altamente repetitivas que podem formar grampos e bloquear a replicação (Wells, 1996) ou colisões entre transcrição e replicação, principalmente em genes longos (Helmrich et al., 2011). De fato, ATR é responsável por evitar quebras através da regulação de sítios frágeis (Casper et al., 2002), em que são encontradas repetições CGG e AT, além de estruturas não-canônicas de DNA diferentes de DNA-B (Aguilera e Gómez-González, 2008).

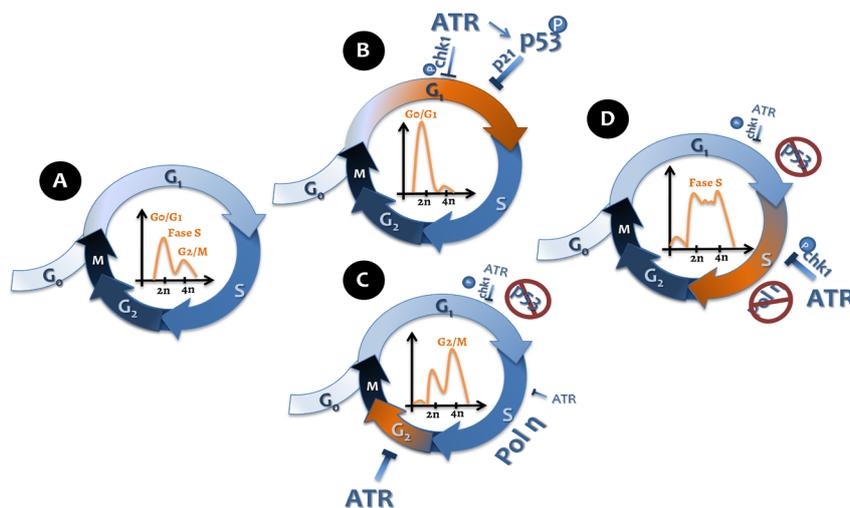


Figura 6. Resposta ao dano no DNA após exposição à luz UV: Integrando ciclo celular com tolerância e reparo do DNA. A) Fibroblasto normal de pele não irradiado tem progressão normal pelo ciclo celular. Ao centro, visualização do perfil do ciclo celular mostrando dois picos, correspondendo a G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> com 2N de DNA (em maior número por ser a fase da intérfase com maior tempo de duração) e G<sub>2</sub>/M com 4 N de DNA. B) Fibroblasto irradiado com luz UV tem ativação da quinase ATR e de p53, resultando em acúmulo de células em G<sub>1</sub> (ponto de parada em G<sub>1</sub>). C) Fibroblasto transformado (Ex. SV-40) não possui p53 ativo e, dessa forma, células irradiadas progredem com danos no DNA pelo ciclo celular através de síntese translesão, realizada principalmente por Pol η. Como neste caso as lesões no DNA persistem, a ativação de ATR provocará acúmulo de células em G<sub>2</sub>, antes que células entrem em mitose ainda com danos (ponto de parada em G<sub>2</sub>/M). D) Fibroblasto imortalizado (Ex. SV-40) que não possui p53 ativo e é deficiente em Pol η (células XP-V) possui bloqueio da replicação após irradiação com luz UV pela deficiência na síntese translesão. Dessa forma, ATR é ativado em fase S, provoca acúmulo de células nesta fase do ciclo (checkpoint intra-S) e resulta em maior morte celular, visualizado ao centro pelo aumento de células com conteúdo sub-G<sub>1</sub> de DNA.

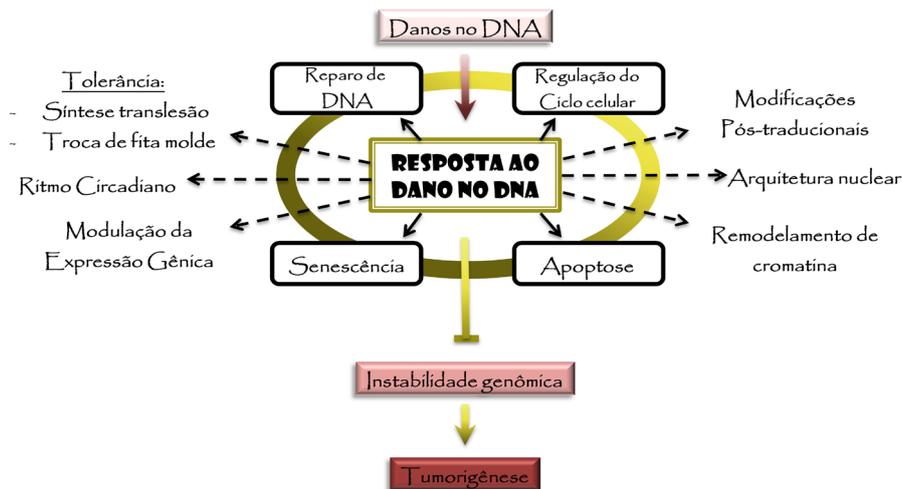


Figura 7. Danos no DNA resultam em uma ampla resposta celular, a qual diminui a instabilidade genômica e tumorigênese. Figura adaptada de Harper e Elledge, 2007. O reconhecimento da lesão ativa uma cascata de sinalização que resulta em respostas rápidas, como modificação pós-traducional de proteínas existentes, remodelamento da cromatina e alteração da arquitetura nuclear; além de respostas celulares mais demoradas, como modulação da expressão gênica com alteração da estabilidade do RNA mensageiro, processamento e síntese de genes alvo, incluindo processos como ciclo celular, reparo do DNA, mecanismos de tolerância e até ritmo circadiano. Caso a recuperação não seja possível, a resposta pode ainda induzir senescência ou a morte celular por apoptose diminuindo a chance da instabilidade genômica provocada pelos danos no DNA originar em uma célula tumoral.

### Síndromes relacionadas a defeitos em vias de reparo do DNA

A importância das respostas ao dano no DNA na fisiologia humana é exemplificada por diversas síndromes humanas causadas por mutações nessas vias. Os fenótipos variam de anormalidades neurológicas, envelhecimento precoce a predisposição a câncer. As principais síndromes, incluindo respectiva predisposição a câncer, estão resumidas na revisão de (Ghosal e Chen, 2013) e adaptadas na tabela 1.1.

Existem diferentes síndromes com deficiências em proteínas da via de reparo por excisão de nucleotídeos: Xeroderma Pigmentosum (XP), Síndrome de Cockayne (CS), Tricotiodistrofia (TTD) e Síndrome sensível a UV (UVSS) (Cleaver et al., 2009; Menck e Munford, 2014; Nakazawa et al., 2012). Pacientes XP apresentam elevada fotossensibilidade e a idade mediana de aparecimento de câncer de pele é antes dos 10 anos de idade. Mutações em XPC e DDB2 (XPE), ou seja, somente na subvia de reparo global de NER, não apresentam problemas neurológicos, enquanto que deficiências somente na subvia acoplada à transcrição (pacientes CS) não aumentam o risco de câncer mas apresentam sintomas neurológicos e de desenvolvimento graves. Cérebros de pacientes CS apresentam grande quantidade de lesões por oxidação e evidências mostram que CSB é importante para o funcionamento da mitocôndria e, assim, parte do fenótipo da síndrome de Cockayne poderia estar relacionada à mitocôndria (Berquist et al., 2012) ou a outras funções de CSA e CSB relacionados à transcrição e remodelamento de cromatina. A síndrome UVSS também induz fotossensibilidade, porém, diferente de pacientes CS, não induz problemas neurológicos. A proteína mutada UVSSA atua em resposta a luz UV, mas não a danos por estresse oxidativo (Spivak e Hanawalt, 2006), diferente de CSB, o que pode ajudar a explicar os diferentes fenótipos (Tabela 1). Deficiências na transcrição também parece ser a principal causa da síndrome TTD – caracterizada por cabelo quebradiço e deficiente em enxofre - em que a falta do fator de transcrição TFIIH prejudica a síntese de RNA

em grande quantidade em células diferenciadas como cabelo, unha e células imunes (Cleaver et al., 2009). Assim, a pleiotropia de funções das proteínas, com funções além de reparo do DNA, pode auxiliar a explicar as variações de fenótipo.

Existem ainda síndromes com deficiência em outras vias de reparo do DNA ou na sinalização em resposta a dano. Defeitos na via de reparo de emparelhamento errôneo resultam na síndrome de Lynch, caracterizado principalmente pelo aumento de câncer colorretal. Mutações em BRCA1 e BRCA2 resultam em câncer hereditário de mama e ovário. Deficiências em genes envolvidos em recombinação homóloga também resultam nas síndromes de Werner, Bloom e Rothmund Thomson, com fenótipo de envelhecimento precoce e aumento de linfomas e sarcomas. Mutação em ATM é causa da ataxia telangiectasia, doença neurológica que possui maior incidência de leucemias. Mutação em heterozigose de ATR resulta na síndrome de Seckel que, assim como nos modelos em camundongo, apresenta problemas de desenvolvimento como microcefalia e envelhecimento precoce, tendo também relatos de aumento de leucemia. Outra doença que aumenta a incidência de leucemia é anemia Fanconi, com mutações em diversos genes da via de reparo de cross-links. Mutações em p53 dão origem à síndrome de Li-Fraumeni, também caracterizada por maior risco de câncer em diversos órgãos (tabela 1).

### Instabilidade genômica e câncer: Como potencializar terapia antitumoral?

A tumorigênese é um processo de múltiplos passos, em que a progressão depende em uma acumulação sequencial de mutações em uma mesma célula, que em geral acontece após eventos de replicação. Essas mutações resultam em perda da homeostase tecidual já que as células transformadas adquirem vantagens seletivas pelo aumento da taxa de proliferação, diminuição da indução de morte celular, além da criação de um microambiente propenso ao crescimento (Hanahan e Weinberg, 2011). A forma mais comum de modular

o ciclo celular e combater a progressão tumoral é explorar o efeito de drogas que lesionem o DNA. Paradas no ciclo celular e morte ocorrem após exposição a agentes causadores de danos no DNA, principalmente durante a replicação do DNA na fase S. Tentativas de replicar DNA lesionado levam ao aumento de morte celular e tornam tratamentos que lesionem o DNA mais citotóxicos em células em proliferação quando comparadas com células quiescentes ou diferenciadas (Helleday et al., 2008). Entretanto, a toxicidade pode ser reduzida pela superativação de vias de reparo do DNA, o que torna a resposta ao dano no DNA um alvo de intervenção terapêutico promissor. Além de poder reverter a resistência de terapias atuais, pode resultar em mortalidade seletiva das células tumorais (Curtin, 2012). Assim, um entendimento da resposta ao dano no DNA não só contribuirá com o conhecimento de desenvolvimento de câncer, mas também para o tratamento da doença.

**Conclusões e questões futuras**

A importância da estabilidade e manutenção do DNA é exemplificada nos diversos mecanismos celulares que foram selecionados durante a evolução. Cientificamente, a área de Reparo do DNA iniciou com pesquisas envolvendo efeitos

biológicos das radiações, principalmente a luz ultravioleta, a qual estamos expostos diariamente devido ao Sol. A natureza da lesão foi descrita e sua consequência compreendida: bloqueio físico de replicação e de transcrição provocado pelo dano no DNA. As células dispõem de vias de remoção de danos – cuja eficiência é maior na região de genes ativos - mas também de mecanismos de tolerância para evitar bloqueios de replicação. Deficiências nessas vias aumentam a taxa de mutações induzidas por luz UV e consequentemente de tumores de pele, evidenciadas pelas síndromes como xeroderma pigmentosum. Porém, nas últimas duas décadas têm se descoberto que a resposta celular a danos no DNA é muito mais ampla que apenas reparo do DNA e envolve uma sinalização complexa, com parada do ciclo celular, remodelamento da cromatina e modulação da expressão gênica, como a mediada pela quinase ATR após exposição à luz UV. A manutenção da replicação sem complicações é essencial para evitar mutações e tumorigênese, mas aparentemente também está relacionada a fenótipos de envelhecimento, como os observados em animais com deficiências em ATR. Células com estresse replicacional exacerbado podem morrer por apoptose e essa tem sido uma abordagem frequente no tratamento anti-tumoral, através de quimioterápico e radiação

Tabela 1. Resumo das principais síndromes causadas por mutações em vias de resposta ao dano no DNA e sua predisposição à tumorigênese. Adaptado de Ghosal e Chen (2013).

Síndrome	Mutações	Predisposição a câncer	Via afetada
<b>Xeroderma Pigmentosum</b>	XPA; XPB; XPC; XPD; XPE; XPF; XPG ou POLH	Câncer de pele	NER ou TLS
<b>Síndrome de Cockayne</b>	CSA ; CSB ; XPB; XPD; XPG		
<b>Tricotiodistrofia</b>	XPD; XPB; TTDA		TCR-NER
<b>Síndrome sensível a UV</b>	UVSSA		
<b>Anemia Fanconi</b>	FANCA; FANCB; FANCC; BRCA2; FANCD2; FANCE; FANCF; FANCG; FANCI; BACH1; FANCL; SLX4	Leucemia mielóide aguda	Reparo de ICL; recombinação homóloga
<b>Síndrome de Li-Fraumeni</b>	p53	Câncer de mama; cérebro; leucemia e sarcoma	Sinalização em resposta a dano no DNA
<b>Síndrome de Seckel</b>	ATR	Leucemia mielóide aguda	Sinalização em resposta a dano no DNA
<b>Ataxia Telangiectasia</b>	ATM	Leucemia; linfoma; câncer de mama	Sinalização em resposta a dano no DNA
<b>Câncer de mama familiar</b>	BRCA1 BRCA2	Câncer de mama e ovário	
<b>Síndrome de Bloom</b>	BLM	Linfoma e leucemia	Recombinação homóloga
<b>Síndrome de Werner</b>	WRN	Sarcoma	
<b>Síndrome de Rothmund Thomson</b>	RECQL4	Câncer de pele e osteosarcoma	
<b>Síndrome de Lynch</b>	MSH2; MLH1; MSH6; PMS2;	Câncer colorretal; estômago; intestino; endométrio; glioblastoma	Reparo de emparelhamento errôneo

que induzem danos no DNA. Na última década, cada vez mais pesquisa tem sido realizada para encontrar inibidores de resposta a danos no DNA, como por exemplo inibidores de ATR, para potencializar a morte provocada por quimioterápicos, com resultados promissores (Reaper et al., 2011, Josse et al., 2014).

Porém, várias questões ainda permanecem em relação a respostas a danos no DNA. Por exemplo, regiões transcritas pelo genoma são reparadas mais rapidamente do que regiões não-transcritas, porém não sabemos se existe uma variação da eficiência em escala genômica: genes mais expressos (e provavelmente mais bloqueados por danos no DNA) seriam reparados mais rapidamente? Já que quanto maior o gene, maior a chance de acumular lesões no DNA (imagine o tempo para remover lesões do gene da distrofina com 2,5 Mb), o tamanho do gene interfere na resposta ao dano no DNA? Poderia a necessidade de reparo de um gene, influenciar na evolução de íntrons e tamanho gênico? Por que observamos síntese translesão na replicação, mas não em transcrição? Qual modelo de mutação após exposição à UV contribui mais para a assinatura mutacional de luz UV? O que contribui mais para a tumorigênese após exposição à luz UV, mutações pontuais durante a fase S ou rearranjos decorrentes de quebras na forquilha de replicação bloqueada? Como exatamente um bloqueio da replicação resulta em quebras no DNA? ATR é importante, mesmo sem a ocorrência de danos exógenos no DNA provocados por luz UV. Quais tipos de danos endógenos ou estruturas não-canônicas no DNA realmente poderiam afetar a replicação? Reverter ou controlar essas “lesões endógenas” seria suficiente para retardar o envelhecimento? Isso envolveria danos no DNA por estresse oxidativo e ATR estaria também relacionado a essa resposta?

## Agradecimentos

Agradeço ao prof. Carlos Menck por toda orientação e oportunidade de fazer parte do Laboratório de Reparo de DNA do ICB-USP. Agradeço também ao apoio financeiro da FAPESP e CAPES para a realização de meu doutorado.

## Referências

- Aguilera A, Gómez-González B. 2008. Genome Instability: A Mechanistic View of Its Causes and Consequences. *Nature Reviews. Genetics* 9 (3): 204–17.
- Araki M, Masutani C, Maekawa C, Watanabe Y, Yamada A, Kusumoto R, Sakai D, Sugawara K, Ohkuma Y, Hanaoka F. 2000. Reconstitution of Damage DNA Excision Reaction from SV40 Minichromosomes with Purified Nucleotide Excision Repair Proteins. *Mutation Research* 459: 147–60.
- Bartkova J, Horejsí Z, Koed K, Krämer A, Tort F, Zieger K, Gulberg P, et al. 2005. DNA Damage Response as a Candidate Anti-Cancer Barrier in Early Human Tumorigenesis. *Nature* 434: 864–70.
- Berquist BR, Canugovi C, Sykora P, Wilson DM, Bohr V. 2012. Human Cockayne Syndrome B Protein Reciprocally Communicates with Mitochondrial Proteins and Promotes Transcriptional Elongation. *Nucleic Acids Research* 40: 8392–8405.
- Beukers R, Berends W. 1960. Isolation and Identification of the Irradiation Product of Thymine. *Biochimica et Biophysica Acta* 41: 550–51.
- Bianchi K, Rudd SG, Jozwiakowski SK, Bailey LJ, Soura V, Taylor E, Stevanovic I, et al. 2013. PrimPol Bypasses UV Photoproducts during Eukaryotic Chromosomal DNA Replication. *Molecular Cell* 52 (4):566–73.
- Bohr V, Smith C, Okumoto DS, Hanawalt PC. 1985. DNA Repair in an Active Gene: Removal of Pyrimidine Dimers from the DHFR Gene of CHO Cells Is Much More Efficient than in the Genome Overall. *Cell* 40 (2): 359–69.
- Boyce RP, Howard-Flanders P. 1964. Release of ultraviolet light-induced thymine dimers from DNA in *E. Coli* K-12. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 51: 293–300.
- Brash DE, Rudolph JA, Simon JA, Lin A, McKenna GJ, Baden HP, Halperin AJ, Pontén J. 1991. A role for sunlight in skin cancer: UV-induced p53 mutation in squamous cell carcinoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 88: 10124–10128.
- Brown EJ, Baltimore D. 2000. ATR Disruption Leads to Chromosomal Fragmentation and Early Embryonic Lethality. *Genes & Development* 14 (4): 397–402.
- Byun TS, Pacek M, Yee M, Walter JC, Cimprich KA. 2005. Functional Uncoupling of MCM Helicase and DNA Polymerase Activities Activates the ATR-Dependent Checkpoint. *Genes & Development* 19: 1040–52.
- Callegari J, Clark E, Pneuman A, Kelly TJ. 2010. Postreplication Gaps at UV Lesions Are Signals for Checkpoint Activation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107 (18): 8219–24.
- Casper AM, Nghiem P, Arlt MF, Glover TW. 2002. ATR Regulates Fragile Site Stability. *Cell* 111 (6): 779–89.
- Chang DJ, Cimprich KA. 2009. DNA Damage Tolerance: When It's OK to Make Mistakes. *Nature Chemical Biology* 5 (2): 82–90.
- Cimprich KA, Cortez D. 2008. ATR: An Essential Regulator of Genome Integrity. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 9 (8): 616–27.
- Cleaver JE. 1968. Defective Repair Replication of DNA in Xeroderma Pigmentosum. *Nature* 218 (5142): 652–56.
- Cleaver JE, Thompson LH, Richardson AS, States JC. 1999. A Summary of Mutations in the UV-Sensitive Disorders: Xeroderma Pigmentosum, Cockayne Syndrome, and Trichothiodystrophy. *Human Mutation* 14: 9–22.
- Cleaver JE, Lam ET, Revet I. 2009. Disorders of Nucleotide Excision Repair: The Genetic and Molecular Basis of Heterogeneity. *Nature Reviews. Genetics* 10 (11): 756–68.
- Costa RMA, Chiganças V, Galhardo RS, Carvalho H, Menck CFM. 2003. The Eukaryotic Nucleotide Excision Repair Pathway. *Biochimie* 85: 1083–99.
- Crick F. 1974. The Double Helix: A Personal View. *Nature*. 248(5451):766-9.
- Curtin NJ. 2012. DNA Repair Dysregulation from Cancer Driver to Therapeutic Target. *Nature Reviews. Cancer* 12 (12): 801–17.
- De Boer J, Andressoo JO, Wit J, Huijman J, Beems RB, Steeg H, Weeda G, et al. 2002. Premature Aging in Mice Deficient in DNA Repair and Transcription. *Science* 296: 1276–79.
- Fishel R, Lescoe MK, Rao MR, Copeland NG, Jenkins NA, Garber J, Kane M, Kolodner R. 1993. The Human Mutator Gene Homolog MSH2 and Its Association with Hereditary Nonpolyposis Colon Cancer. *Cell* 75: 1027–38.
- Friedberg E. 2006. DNA Repair and Mutagenesis, 2nd Edition. Washington D.C. ASM Press. (sucede a seguinte referência)
- Friedberg E. 2003. DNA Damage and Repair. *Nature* 421 (6921): 436–40.
- Ghosal G, Chen J. 2013. DNA Damage Tolerance: A Double-Edged Sword Guarding the Genome. *Translational Cancer Research* 2 (3): 107–29.

- Giannattasio M, Follonier C, Tourrière H, Puddu F, Lazzaro F, Pasero P, Lopes M, Plevani P, Muzi-Falconi M. 2010. Exo1 Competes with Repair Synthesis, Converts NER Intermediates to Long ssDNA Gaps, and Promotes Checkpoint Activation. *Molecular Cell* 40 (1): 50–62.
- Gorgoulis VG, Vassiliou LF, Karakaidos P, Zacharatos P, Kotsinas A, Liloglou T, Venere M, et al. 2005. Activation of the DNA Damage Checkpoint and Genomic Instability in Human Precancerous Lesions. *Nature* 434: 907–13.
- Hanahan D, Weinberg R. 2011. Hallmarks of Cancer: The next Generation. *Cell* 144 (5): 646–74.
- Hanasoge S, Ljungman M. 2007. H2AX Phosphorylation after UV Irradiation Is Triggered by DNA Repair Intermediates and Is Mediated by the ATR Kinase. *Carcinogenesis* 28 (11): 2298–2304.
- Hanawalt PC, Spivak G. 2008. Transcription-Coupled DNA Repair: Two Decades of Progress and Surprises. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 9 (12): 958–70.
- Harper JW e Elledge SJ. 2007. The DNA damage response: ten years after. *Molecular Cell*. 28(5):739-745
- Harrison JC, Haber JE. 2006. Surviving the Breakup: The DNA Damage Checkpoint. *Annual Review of Genetics* 40: 209–35.
- Heffernan TP, Simpson DA, Frank AR, Heinloth AN, Paules RS, Cordeiro-Stone M, Kaufmann WK. 2002. An ATR- and Chk1-Dependent S Checkpoint Inhibits Replicon Initiation Following UVC-Induced DNA Damage. *Molecular and Cellular Biology* 22 (24): 8552–61.
- Helleday T, Petermann E, Lundin C, Hodgson B, Sharma R. 2008. DNA Repair Pathways as Targets for Cancer Therapy. *Nature Reviews. Cancer* 8 (3): 193–204.
- Helmrich A, Ballarino M, Tora L. 2011. Collisions between Replication and Transcription Complexes Cause Common Fragile Site Instability at the Longest Human Genes. *Molecular Cell* 44 (6): 966–77.
- Hollaender A, Claus WD. 1936. The bactericidal effect of ultraviolet radiation on *Escherichia Coli* in liquid suspensions. *The Journal of General Physiology* 19: 753–65.
- Holliday R. 1964. A Mechanism for Gene Conversion in Fungi. *Genetical Research* 5: 282–304.
- Ikehata H, Ono T. 2011. The Mechanisms of UV Mutagenesis. *Journal of Radiation Research* 52 (2): 115–25.
- Jaruga P, Dizdaroglu M. 1996. Repair of Products of Oxidative DNA Base Damage in Human Cells. *Nucleic Acids Research* 24 (8): 1389–94.
- Johnson RE, Washington MT, Prakash S, Prakash L. 2000. Fidelity of Human DNA Polymerase  $\epsilon$ . *The Journal of Biological Chemistry* 275 (11): 7447–50.
- Josse R, Martin SE, Guha R, Ormanoglu P, Pfister TD, Reaper PM, Barnes CS, Jones J, Charlton PA, Pollard JR, Morris J, Doroshov JH, Pommier Y. 2014. The ATR inhibitors VE-821 and VX-970 sensitize cancer cells to topoisomerase I inhibitors by disabling DNA replication initiation and fork elongation responses. *Cancer Research* 3369.2013.
- Kamileri I, Karakasioti I, Garinis G. 2012. Nucleotide Excision Repair: New Tricks with Old Bricks. *Trends in Genetics* : TIG 28 (11): 566–73.
- Kanazir D, Errera M. 1954. Metabolism of Nucleic Acids by *E. Coli* B after Ultraviolet Irradiation. *Biochimica et Biophysica Acta* 14 (1): 62–66.
- Kannouche PL, Wing J, Lehmann AR. 2004. Interaction of Human DNA Polymerase  $\epsilon$  with Monoubiquitinated PCNA: A Possible Mechanism for the Polymerase Switch in Response to DNA Damage. *Molecular Cell* 14 (4): 491–500.
- Kastan MB, Onyekwere O, Sidransky D, Vogelstein B, Craig RW. 1991. Participation of p53 Protein in the Cellular Response to DNA Damage. *Cancer Research* 51: 6304–11.
- Kastan MB, Zhan Q, el-Deiry WS, Carrier F, Jacks T, Walsh WV, Plunkett BS, Vogelstein B, Fornace AJ. 1992. A Mammalian Cell Cycle Checkpoint Pathway Utilizing p53 and GADD45 Is Defective in Ataxia-Telangiectasia. *Cell* 71: 587–97.
- Kastan MB, Bartek J. 2004. Cell-Cycle Checkpoints and Cancer. *Nature* 432 (7015): 316–23.
- Kelner, A. 1949. Effect of Visible Light on the Recovery of *Streptomyces Griseus* Conidia from Ultra-Violet Irradiation Injury. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 35 (2): 73–79.
- Kobayashi N, Katsumi S, Imoto K, Nakagawa A, Miyagawa S, Furumura M, Mori T. 2001. Quantitation and Visualization of Ultraviolet-Induced DNA Damage Using Specific Antibodies: Application to Pigment Cell Biology. *Pigment Cell Research* 14 (2): 94–102.
- Lane DP, Crawford LV. 1979. T Antigen Is Bound to a Host Protein in SV40-Transformed Cells. *Nature* 278: 261–63. doi:10.1038/278261a0.
- Lima-Bessa KM, Armelini MG, Chiganças V, Jacysyn JF, Amarante-Mendes GP, Sarasin A, Menck CFM. 2008. CPDs and 6-4PPs Play Different Roles in UV-Induced Cell Death in Normal and NER-Deficient Human Cells. *DNA Repair* 7 (2): 303–12.
- Lindahl, T. 1974. An N-Glycosidase from *Escherichia Coli* That Releases Free Uracil from DNA Containing Deaminated Cytosine Residues. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 71: 3649–53.
- Lindahl, T. 1993. Instability and Decay of the Primary Structure of DNA. *Nature* 362 (6422): 709–15.
- Linzer DI, Levine AJ. 1979. Characterization of a 54K Dalton Cellular SV40 Tumor Antigen Present in SV40-Transformed Cells and Uninfected Embryonal Carcinoma Cells. *Cell* 17: 43–52.
- Ljungman M. 2010. The DNA Damage Response--Repair or Despair? *Environmental and Molecular Mutagenesis* 51 (8-9): 879–89
- Ljungman M, Zhang F. 1996. Blockage of RNA Polymerase as a Possible Trigger for U.V. Light-Induced Apoptosis. *Oncogene* 13: 823–31.
- Mailand N. 2000. Rapid Destruction of Human Cdc25A in Response to DNA Damage. *Science* 288 (5470): 1425–29.
- Masters M, Pardee AB. 1962. Failure of Ultraviolet-Irradiated *Escherichia Coli* to Produce a Cross-Reacting Protein. *Biochimica et Biophysica Acta* 56: 609–11.
- Masutani C, Kusumoto R, Yamada A, Dohmae N, Yokoi M, Yuasa M, Araki M, Iwai S, Takio K, Hanaoka F. 1999. The XPV (xeroderma Pigmentosum Variant) Gene Encodes Human DNA Polymerase  $\epsilon$ . *Nature* 399: 700–704.
- Matsuoka S, Huang M, Elledge SJ. 1998. Linkage of ATM to Cell Cycle Regulation by the Chk2 Protein Kinase. *Science* 282: 1893–97.
- Matsuoka S, Ballif B, Smogorzewska A, McDonald RE, Hurov KE, Luo J, Bakalarski CE, et al. 2007. ATM and ATR Substrate Analysis Reveals Extensive Protein Networks Responsive to DNA Damage. *Science* 316 (5828): 1160–66.
- McCulloch SD, Kunkel T. 2008. The Fidelity of DNA Synthesis by Eukaryotic Replicative and Translesion Synthesis Polymerases. *Cell Research* 18 (1): 148–61.
- Mellon I, Spivak G, Hanawalt PC. 1987. Selective Removal of Transcription-Blocking DNA Damage from the Transcribed Strand of the Mammalian DHFR Gene. *Cell* 51: 241–49.

- Menck CFM, Munford V. 2014. DNA Repair Diseases: What Do They Tell Us about Cancer and Aging? *Genetics and Molecular Biology* 37: 220–33.
- Mitchell DL, Nguyen TD, Cleaver JE. 1990. Nonrandom Induction of Pyrimidine-Pyrimidone (6-4) Photoproducts in Ultraviolet-Irradiated Human Chromatin. *The Journal of Biological Chemistry* 265: 5353–56.
- Muller HJ. 1927. Artificial transmutation of the gene. *Science* 66: 84–87.
- Murga M, Bunting S, Montaña MF, Soria R, Mulero F, Cañamero M, Lee Y, McKinnon PJ, Nussenzweig A, Fernandez-Capetillo O. 2009. A Mouse Model of ATR-Seckel Shows Embryonic Replicative Stress and Accelerated Aging. *Nature Genetics* 41 (8): 891–98.
- Nakajima S, Lan L, Kanno S, Takao M, Yamamoto K, Eker APM, Yasui A. 2004. UV Light-Induced DNA Damage and Tolerance for the Survival of Nucleotide Excision Repair-Deficient Human Cells. *The Journal of Biological Chemistry* 279 (45): 46674–77.
- Nakazawa Y, Sasaki K, Mitsutake N, Matsuse M, Shimada M, Nardo T, Takahashi Y, et al. 2012. Mutations in UVSSA Cause UV-Sensitive Syndrome and Impair RNA Polymerase II Processing in Transcription-Coupled Nucleotide-Excision Repair. *Nature Genetics* 44 (5): 586–92.
- Nouspikel T. 2009. DNA Repair in Mammalian Cells : Nucleotide Excision Repair: Variations on Versatility. *Cellular and Molecular Life Sciences* 66: 994–1009.
- Rastogi RP, Richa, Kumar A, Tyagi MB, Sinha RP. 2010. Molecular Mechanisms of Ultraviolet Radiation-Induced DNA Damage and Repair. *Journal of Nucleic Acids* 2010: 592980.
- Reaper, PM, Griffiths MR, Long JM, Charrier J, MacCormick S, Charlton PA, Golec JMC, Pollard JR. Selective killing of ATM- or p53-deficient cancer cells through inhibition of ATR. *Nature Chemical Biology*, v. 7, n. 7, p. 428–30, 2011
- Rogakou EP, Pilch DR, Orr H, Ivanova VS, Bonner WM. 1998. DNA Double-Stranded Breaks Induce Histone H2AX Phosphorylation on Serine 139. *The Journal of Biological Chemistry* 273 (10): 5858–68.
- Rowland SF. 2006. Stratospheric Ozone Depletion. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences* 361: 769–90.
- Rupert CS, Goodgal SH, Herriot RM. 1958. Photoreactivation in Vitro of Ultraviolet-Inactivated Hemophilus Influenzae Transforming Factor. *The Journal of General Physiology* 41: 451–71.
- Rupp, WD, Howard-Flanders P. 1968. Discontinuities in the DNA Synthesized in an Excision-Defective Strain of Escherichia Coli Following Ultraviolet Irradiation. *Journal of Molecular Biology* 31: 291–304.
- Ruzankina Y, Pinzon-Guzman C, Asare A, Ong T, Pontano L, Cotsarelis G, Zediak VP, Velez M, Bhandoola A, Brown EJ. 2007. Deletion of the Developmentally Essential Gene ATR in Adult Mice Leads to Age-Related Phenotypes and Stem Cell Loss. *Cell Stem Cell* 1 (1): 113–26.
- Schuch AP, Galhardo RS, Lima-Bessa KM, Schuch NJ, Menck CFM. 2009. Development of a DNA-Dosimeter System for Monitoring the Effects of Solar-Ultraviolet Radiation. *Photochemical & Photobiological Sciences* 8 (1): 111–20.
- Setlow RB, Carrier WL. 1964. The disappearance of thymine dimers from DNA: An error-correcting mechanism. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 51: 226–31.
- Spivak G, Hanawalt PC. 2006. Host Cell Reactivation of Plasmids Containing Oxidative DNA Lesions Is Defective in Cockayne Syndrome but Normal in UV-Sensitive Syndrome Fibroblasts. *DNA Repair* 5: 13–22.
- Stokes MP, Rush J, Macneill J, Ren JM, Sprott K, Nardone J, Yang V, et al. 2007. Profiling of UV-Induced ATM/ATR Signaling Pathways. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104 (50): 19855–60.
- Sugasawa K, Masutani C, Hanaoka F. 1993. Cell-Free Repair of UV-Damaged Simian Virus 40 Chromosomes in Human Cell Extracts. I. Development of a Cell-Free System Detecting Excision Repair of UV-Irradiated SV40 Chromosomes. *The Journal of Biological Chemistry* 268: 9098–9104.
- Sugasawa K, Akagi J, Nishi R, Iwai S, Hanaoka F. 2009. Two-Step Recognition of DNA Damage for Mammalian Nucleotide Excision Repair: Directional Binding of the XPC Complex and DNA Strand Scanning. *Molecular Cell* 36 (4): 642–53.
- Tibbetts RS, Brumbaugh KM, Williams JM, Sarkaria JN, Cliby WA, Shieh SY, Taya Y, Prives C, Abraham RT. 1999. A Role for ATR in the DNA Damage-Induced Phosphorylation of p53. *Genes & Development* 13: 152–57.
- Tornaletti, S. 2009. “DNA Repair in Mammalian Cells: Transcription-Coupled DNA Repair: Directing Your Effort Where It’s Most Needed.” *Cellular and Molecular Life Sciences* : CMLS 66 (6): 1010–20. doi:10.1007/s00018-009-8738-x. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19153656>.
- van der Kemp PA, Thomas D, Barbey R, de Oliveira R, Boiteux S. 1996. Cloning and Expression in Escherichia Coli of the OGG1 Gene of Saccharomyces Cerevisiae, Which Codes for a DNA Glycosylase That Excises 7,8-Dihydro-8-Oxoguanine and 2,6-Diamino-4-Hydroxy-5-N-Methylformamidopyrimidine. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93: 5197–5202.
- Wagner R, Meselson M. 1976. Repair Tracts in Mismatched DNA Heteroduplexes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 73: 4135–39.
- Walworth N, Davey S, Beach D. 1993. Fission Yeast chk1 Protein Kinase Links the Rad Checkpoint Pathway to cdc2. *Nature* 363: 368–71.
- Watson JD, Crick FHC. 1953. Molecular Structure of Nucleic Acids. *Nature* 171: 737–38.
- Wells RD. 1996. Molecular Basis of Genetic Instability of Triplet Repeats. *The Journal of Biological Chemistry* 271: 2875–78.
- Wilson JH, Berget PB, Pipas JM. 1982. Somatic Cells Efficiently Join Unrelated DNA Segments End-to-End. *Molecular and Cellular Biology* 2: 1258–69.
- Witkin EM. 1974. Thermal Enhancement of Ultraviolet Mutability in a Tif-1 uvrA Derivative of Escherichia Coli B-R: Evidence That Ultraviolet Mutagenesis Depends upon an Inducible Function. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 71: 1930–34.
- Woollons A, Clingen PH, Price ML, Arlett CF, Green MH. 1997. Induction of Mutagenic DNA Damage in Human Fibroblasts after Exposure to Artificial Tanning Lamps. *The British Journal of Dermatology* 137: 687–92.
- Zou L, Elledge SJ. 2003. Sensing DNA Damage through ATRIP Recognition of RPA-ssDNA Complexes. *Science* 300 (5625): 1542–48.