Papel biológico dos dímeros de pirimidina em células humanas irradiadas com radiação UVA

Biological role of pyrimidine dimers in human cells irradiated with UVA radiation

São Paulo

2010

Papel biológico dos dímeros de pirimidina em células humanas irradiadas com radiação UVA

Biological role of pyrimidine dimers in human cells irradiated with UVA radiation

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, para a obtenção de Título de Mestre em Ciências, na Área de Biologia (Genética).

Orientador: Prof. Dr. Carlos Frederico Martins Menck

Ficha Catalográfica

Cortat, Barbara

Papel biológico dos dímeros de pirimidina em células humanas irradiadas com radiação UVA.

Número de páginas: 111

Dissertação (Mestrado) - Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. Departamento de Biologia (Genética)

 UVA 2. Dímeros de pirimidina
Reparo por excisão de nucleotídeos
Universidade de São Paulo. Instituto de Biociências. Departamento de Biologia (Genética).

Comissão Julgadora:

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr.(a). Orientador(a)



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS

OF.CEP/IB/010/19/04/2010

São Paulo, 19 de abril de 2010.

Prezada Senhora

Dirijo-me a V. Sa. para informar que o Comitê de Ética em Pesquisa - Seres Humanos deste Instituto, em reunião realizada em 13 de abril de 2010, **APROVOU** o Projeto de Pesquisa "Verificação da importância dos dímeros de pirimidina no efeito genotóxico da luz UVA" de sua responsabilidade (**Protocolo n**° **108/2010**) – **FR. 320728**, sob a orientação do Prof. Dr. Carlos Frederico Martins Menck, conforme cópia do Parecer anexo.

Lembramos que deverá ser apresentado relatório anual e final, conforme modelo disponível n o link deste Comitê.

Atenciosamente. Profa. Dra. Célia Priszkalnik Koiffmann Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa – Seres Humanos IBUSP

Ilma. Sra.

BARBARA HELEN CORTAT SANTOS Departamento de Microbiologia Instituto de Ciências Biomédicas da USP Edifício Biomédicas 2 – Sala 116

Rua do Matão - Travessa 14 nº 321 - CEP 05508-090 - Cidade Universitária São Paulo - Brasil - http://www.ib.usp.br



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira" Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 - cep. 05508-000 São Paulo, SP - Brasil Telefone :(55) (11) 3091.7733 telefax : (55) (11) 3091-8405 e-mail: cep@ icb.usp.br

São Paulo, 26 de março de 2010.

PARECER 935 /CEP

A Comissão de Ética em Pesquisas com Seres Humanos do ICB, na sessão de 25.03.2010 APROVOU o projeto intitulado: "Verificação da importância dos dímeros de pirimidina no efeito genotóxico da luz UVA" sob responsabilidade de execução dos autores Prof. Dr. CARLOS FREDERICO MARTINS MENCK e a aluna BARBARA HELEN CORTAT SANTOS.

Cabe aos pesquisadores executantes elaborar e apresentar a este Comitê, relatórios anuais (parciais ou final), de acordo com a resolução 196/06 do Conselho Nacional da Saúde, item IX.2 letra c.

O primeiro relatório deverá ser encaminhado à Secretaria deste CEP em **25.03.2011.**

Atenciosamente,

Prof. Dr. PAOLO MARINHO ANDRADE ZANOTTO Vice-Coordenador da Comissão de Ética em Pesquisas com Seres Humanos - ICB/USP

Comissão de Ética em Pesquisa com Seres Humanos do Instituto de Ciências Biomédicas / USP Aprovada pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa - CONEP, em 10 de fevereiro de 1998.

À minha mãe pelo carinho

e apoio incondicional.

Ao Yuri por ser mais que um namorado, mas também um grande amigo.

Muito obrigada! Amo muito vocês dois!

"O insucesso é apenas

uma oportunidade para

recomeçar de novo

com mais inteligência."

Henry Ford

Agradecimentos

Primeiramente à minha mãe que sempre esteve ao meu lado me apoiando em todas as situações. Devo a ela o mundo, por todas as oportunidades, amor e compreensão.

Ao Yuri, que tem me aguentado há 7 anos (tarefa nada fácil!), meu amigo, companheiro e parceiro. Obrigada pelo apoio e por todos os momentos ótimos que passamos e ainda passaremos.

Ao meu orientador, Professor Menck, pessoa que admiro muito, por ter acreditado em mim e ter me dado a oportunidade de trabalhar em seu laboratório, local onde aprendi, cresci e hoje saio levando uma grande experiência.

A todos os meus amigos, em especial Cris, Ju(s), Veri, Fer, amigos de longa data, em quem confio e com quem passei os melhores (e piores) momentos da minha vida.

À dança do ventre e colegas de dança, que me ajudaram muito a desestressar.

Às minhas gatas lindas, que nem se importavam de serem agarradas durante meus momentos "Felícia" causados pelo desespero pré-defesa.

Aos colegas de laboratório, em especial à Regina, Keronninn e André, que me ensinaram e ajudaram muito no desenvolvimento deste trabalho.

À FAPESP e CNPQ pelo apoio financeiro.

Muito obrigada!

Sumário

1. Introdução	1
1.1. Agentes que danificam o DNA	1
1.1.1. Radiação Solar	3
1.2. Mecanismos de Reparo	. 11
1.2.1. Fotorreparo	. 11
1.2.2. Reparo por excisão de nucleotídeos (NER)	. 15
2. Objetivos	. 21
3. Material e Métodos	. 22
3.1. Linhagens celulares	. 22
3.2. Cultura de células	. 22
3.3. Congelamento e descongelamento de células	. 23
3.4. Irradiação com radiação UVC, UVB e UVA:	. 24
3.5. Transdução de células com adenovírus recombinantes contendo	0
o gene da CPD-fotoliase (AdCPDphr) ou 6-4-fotoliase (Ad6-4phr).	. 26
3.6. Fotorreativação das celulas	. 27
3.7. Analises das respostas celulares frente aos danos genotoxicos.	. 27
3.7.1. Ensaios de sobrevivencia celular	. 27
3.7.2. Analise de morte celular por citometría de fluxo apos irradiação.	. 28
3.8. Extrações de DNA genômico	. 29
3.9. Detecção das lesões CPD, (6-4)PP e Dewar por ensaios de Imun	0
	. 31
3.10. Preparação de bacterias quimiocompetentes	. 32
3.11. Preparação de bacterias eletrocompetentes	. 33
3.12. Transformação de bacterias quimiocompetentes.	. 34
3.13. Transformação de bacterias eletrocompetentes	. 34
3.14. Extração de DNA plasmidial em pequena escala (<i>mini-prep</i>)	. 35
5.15. Obtenção de vetores bacterianos contendo os contas das fotoliases	. 36
3.15.1. Vetor pMAL	. 36
3.15.1.1. Amplificação dos genes das fotoliases por PCR	
(Polymerase Chain Reaction)	. 36
3.15.1.2. Subclonagem ao vetor pGEM T-easy.	. 38
3.15.1.3. Transformação de bactérias competentes e extração de	20
2 15 1 A Dogoãos do soguenciamento	. 38 20
3.13.1.4. Reações de seguênciamento	. 37
J. IJ. I.J. Allalise uas sequencias yelauas	. 40

3.15.1.6. Clonagem no vetor pMAL	. 40
3.15.1.7. Subclonagens intermediárias	. 40
3.15.2. pProEx HT	. 43
3.16. Expressão das Fotoliases	. 44
3.17. Purificação	. 46
4. Resultados	. 47
4.1. Respostas celulares frente aos danos genotóxicos	. 47
4.1.1. Morte Celular	. 47
4.1.2. Sobrevivência Clonogênica	. 50
4.2. Detecção dos fotoprodutos com anticorpos específicos (anti-CF anti-6-4PP e anti-Dewar)	סי, 51 .
4.3. Transdução com adenovírus recombinantes expressando as fotoliases	. 56
4.3.1. Padronização do Protocolo	. 56
4.3.2. Quantificação de lesões em células transduzidas	. 60
4.3.3. Efeitos genotóxicos da radiação UVA em células transduzid	as 64
4.4. Expressão de Fotoliases em Sistemas Bacterianos	. 70
5. Discussão	. 76
5.1. Efeitos citotóxicos da radiação UVA em fibroblastos humanos	. 76
5.2. Expressão das Fotoliases em sistemas bacterianos	. 89
Conclusão	. 90
Resumo	. 92
Abstract	. 94
Referências Bibliográficas	. 95

1. Introdução

1.1. Agentes que danificam o DNA

A molécula de DNA armazena toda a informação genética de um organismo, sendo transmitida aos seus descendentes, portanto, de extrema importância à manutenção de sua integridade. Por outro lado, o DNA é uma molécula altamente reativa. Lesões de diferentes naturezas que alteram sua estrutura podem ocorrer (Figura 1). Alterações que afetam sua estrutura e integridade podem surgir espontaneamente na célula ou serem induzidas por agentes de natureza química ou física, endógenos ou exógenos (FRIEDBERG et al., 2004). Essas lesões interferem em mecanismos celulares essenciais, como replicação e transcrição, e sua persistência pode originar mutações, que apesar de serem a base do processo evolutivo dos seres vivos, podem interferir na funcionalidade das células, levando à morte celular, degeneração de tecidos. envelhecimento, instabilidade genômica processos е carcinogênicos e tumorigênicos (COSTA et al., 2003; WONDRAK et al., 2005).

AGENTES LESIVOS



DANOS FORMADOS

Figura 1 - Esquema ilustrativo de agentes que podem danificar o DNA e exemplos de lesões no DNA induzidas por esses agentes. Abreviações: cis-Pt - cisplatina; MMC mitomicina-C (Adaptada de HOEIJMAKERS, 2001).

Durante o metabolismo normal da molécula de DNA podem ocorrer alterações espontâneas, comprometendo o seu bom funcionamento, como por exemplo: desemparelhamento de bases; perda do grupo amino; perda das bases do DNA gerando sítios abásicos (APs); durante a replicação pode ocorrer inserção incorreta de nucleotídeo, quebras da fita de DNA entre outros. (HOEIJMAKERS, 2001; FRIEDBERG et al., 2006).

Lesões também podem ser induzidas pelo próprio metabolismo celular, por exemplo, pela geração de espécies reativas de oxigênio (EROs), como quando ocorre um vazamento de elétrons da cadeia de transportes de elétrons ou durante processos patológicos. Estas espécies podem reagir com várias moléculas intracelulares, como DNA, lipídeos, proteínas e acúcares, sendo que

a ordem de preferência de ataque depende de muitos fatores como: o local onde a ERO foi gerada, a habilidade relativa de uma biomolécula ser oxidada e disponibilidade de íons metálicos associados a essa biomolécula а (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1999). No entanto, enquanto lipídeos, proteínas e açúcares são substituíveis, o mesmo não ocorre com o DNA.

Como exemplo de agentes químicos que podem causar danos ao DNA. temos os quimioterápicos que são usados no tratamento de muitos tumores.

A radiação ionizante (IR) é um agente físico de origem ambiental que pode causar danos em todos os componentes celulares e, no DNA, induzir uma enorme variedade de lesões, como quebra da simples fita (SSBs), quebra da dupla fita (DSBs), ligações cruzadas proteína-DNA e várias modificações das bases, algumas induzidas pela produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (RICHARDSON, 2009).

1.1.1. Radiação Solar

Dentre os fatores ambientais, a radiação ultravioleta (UV) tem maior destague. Além de ser facilmente obtida artificialmente em laboratório, é de grande relevância biológica, uma vez que, desde o começo da evolução da vida no planeta, a maioria dos organismos convive com os efeitos genotóxicos gerados pela radiação solar (FRIEDBERG et al., 2006).

A radiação solar foi de suma importância para o aparecimento da vida e sua evolução no planeta Terra. Sem a energia proveniente do sol não haveria ativação de um processo vital à vida: a fotossíntese. Um dos produtos finais desta reação é o oxigênio (O₂) que passou a acumular na atmosfera por volta de 2,3 bilhões de anos atrás (KASTING e SIEFERT, 2002). Com o aumento do

 O_2 na atmosfera foi possível a formação da camada de ozônio. O ozônio (O_3) é formado pela fotólise de O_2 em O pela radiação UV (< 242 nm) que então reage com O_2 , formando O_3 (GRENFELL *et al.*, 2010). Tanto o ozônio como o oxigênio presentes na estratosfera bloqueiam a passagem da radiação UV com comprimentos de onda menores que 280 nm, os mais energéticos e, portanto, mais danosos aos seres vivos, permitindo a evolução da vida em ambientes terrestres (SCHUCH *et al.*, 2009). Na Figura 2 há uma representação ilustrada do espectro solar total, indicando a posição da radiação UV nesse espectro.



Figura 2 – Representação do espectro solar total. Em destaque estão os espectros da luz visível (centro) e da radiação UV (barra à direita).

(http://www.achetudoeregiao.com.br/astronomia/radiacao_ultravioleta.htm)

A radiação UV é o componente mais prejudicial e mutagênico do espectro solar, representando 8% da radiação solar (RIDLEY *et al.*, 2009), sendo o agente lesivo de natureza física mais comum e biologicamente relevante. A radiação UV, por questões didáticas, é subdividida em três bandas de acordo com seu comprimento de onda: UVA (320 a 400 nm), UVB (280 a 320 nm) e UVC (200 a 280 nm). A radiação UVC em sua totalidade e parte da UVB são bloqueadas pela camada de ozônio, sendo que somente os espectros correspondentes à UVA e UVB, em seus maiores comprimentos de onda (295 – 320 nm), alcançam a superfície terrestre (DOUKI *et al.*, 2003).

A radiação UVC é a mais energética sendo capaz de causar enormes danos aos tecidos biológicos. Apesar de não atingir a superfície terrestre, é uma das principais ferramentas utilizadas nos laboratórios para investigação dos efeitos de danos no DNA.

A radiação UVB, apesar de representar apenas 5% da radiação UV que atinge a superfície terrestre, tem habilidade de interagir diretamente com a molécula de DNA, tendo efeitos mutagênicos, carcinogênicos e letais aos organismos vivos. Com a redução da camada de ozônio, os níveis da radiação UVB que atingem a superfície da Terra vêm aumentando (WATERWORTH *et al.*, 2002), elevando consideravelmente esses efeitos na biosfera.

Dois tipos de lesões são majoritariamente formados em decorrência da exposição do DNA à radiação UV nos seus menores comprimentos de onda (UVB e UVC): os ciclobutanos de pirimidina (CPDs) e os fotoprodutos (6-4)-pirimidina-pirimidona (6-4PPs) (GARINIS *et al.*, 2006). A formação de CPDs ocorre quando bases pirimidínicas adjacentes absorvem a energia da radiação UV, formando um anel ciclobutano pela ligação covalente entre os átomos de

carbono C5 e C6 de ambas as bases nitrogenadas. No caso dos 6-4PPs, embora também se trate de uma ligação covalente entre pirimidinas da mesma fita, esta não é cíclica, envolvendo os carbonos C6 e C4 das pirimidinas 5' e 3', respectivamente (ASAHINA *et al.*, 1999). Uma representação ilustrativa destas duas lesões é apresentada na Figura 3.



Figura 3 – Principais lesões causadas pela radiação UV no DNA (Modificado: Molecular Biology Web Book- DNA Replication, Mutation and Repair).

Ambos os fotoprodutos são responsáveis por grandes distorções estruturais na dupla hélice de DNA interferindo em mecanismos celulares

constitutivos, como replicação e transcrição, ameaçando a viabilidade e integridade funcional das células e, por consequência, contribuindo para processos mutagênicos e tumorigênicos (MITCHELL *et al.*, 2003).

Segundo Chandrasekhar e Houten (2000) entre 65 a 90% das lesões geradas no DNA pela radiação UVC são CPD e 10 a 35% são (6-4)PP. CPDs são as lesões mais numerosas e, se não reparadas, são muito citotóxicas, pois bloqueiam a síntese transcripcional, inibindo a progressão da RNA polimerase II e ativando a morte celular (CHIGANÇAS *et al.*, 2004). Estas lesões são removidas mais lentamente do genoma (em relação ao (6-4)PP), por isso podem ter importância crucial para a iniciação do câncer de pele, pois os CPDs estão provavelmente envolvidos com a geração de mutações em genes supressores de tumor, como p53, expressos em tumores de pele induzidos por UV (WEBER, 2005).

Representando 95% da radiação UV que atinge a superfície terrestre e antes considerada como relativamente inócua, diversos estudos têm demonstrado a importância da radiação UVA nos processos de envelhecimento e carcinogênese em pele humana. No entanto ainda existem controvérsias em relação à sua genotoxicidade devidas, principalmente, ao fato dela ser pouco absorvida pelo DNA, mas ser capaz de excitar cromóforos, que atuam como fotossensibilizadores endógenos, levando à formação de espécies reativas de oxigênio, como peróxido de hidrogênio, via ativação de oxidases contendo flavinas ou pela liberação de ferro livre da ferritina (PFEIFER *et al.*, 2005), radical hidroxila (DOUKI *et al.*, 2003) e, principalmente, oxigênio singlete (RÜNGER *et al.*, 1999; CADET *et al.*, 2005). Na figura 4 temos o espectro de absorção da molécula de DNA nos diferentes comprimentos de onda:



Figura 4 – Espectro de absorção do DNA (linha sólida). A linha pontilhada representa o espectro solar terrestre (Modificado: *Environmental impact of stratospheric flight: Biological and climatic effects of aircraft emissions in the stratosphere*. http://ciesin.org/docs/001-533/001-533.html).

A despeito de a absorção pelo DNA ser mínima nos comprimentos de onda maiores que 320 nm (na ordem de 10⁻⁵), ela existe. Acrescente o fato de a radiação UVA ser aproximadamente 20 vezes mais intensa que UVB na superfície terrestre. Neste contexto, recentemente foi demonstrada a formação de lesões CPD pela absorção direta de UVA, provavelmente envolvendo um mecanismo de transferência energética tripla, e também 6-4 PP (SCHUCH *et al.*, 2009). Inclusive muitos grupos vêm demonstrando que as lesões CPD são

8

majoritariamente geradas após irradiação com UVA ao contrário do que se afirmava anteriormente da relevância de danos gerados por produtos oxidativos (DOUKI *et al.*, 2003; CADET *et al.*, 2005; GIRARD *et al.*, 2008). Adicionalmente, a lesão (6-4)PP pode ser convertida ao seu fotoisômero Dewar, quando expostas a comprimentos de onda maiores que 320 nm (Figura 5 – CADET *et al.*, 2005).



Figura 5 – Fotoisomerização da lesão 6-4PP a Dewar pela exposição a comprimentos de onda maiores que 320 nm.

Também foi demonstrado que a radiação UVA é capaz de gerar quebras simples e duplas na molécula de DNA, que se persistentes, causam aberrações cromossômicas e transformação tumorigênica de queratinócitos (WISCHERMANN *et al.*, 2008).

Além de danos no DNA, a radiação UVA, pela formação de espécies reativas de oxigênio, pode danificar membranas, lipídeos e aminoácidos (MOYSAN *et al.*, 1993; MATSUMURA e ANANTHASWAMY, 2004).

Outra particularidade da radiação UVA é a sua capacidade de penetrar mais profundamente nas camadas da pele. Quanto maior o comprimento de onda, menor será sua interação biológica. A figura 6 mostra um esquema da penetração dos diferentes comprimentos de onda na pele.



Figura 6 – Penetração da radiação ultravioleta e luz visível na pele humana. Quanto menor o comprimento de onda, maior será a interação biológica. (Modificado de http://www.expatliving.sg/article/body-mind/hair-beauty/save-our-skins).

A radiação UVC, se atingisse a superfície terrestre, causaria danos somente nas camadas mais superficiais da pele. Já a radiação UVB penetra até as camadas suprabasais da epiderme, enquanto a radiação UVA e a luz visível atingem até a derme. É importante ressaltar que nas camadas mais basais estão localizadas as células progenitoras de pele. Acredita-se que os eventos carcinogênicos iniciais estejam basalmente localizados e em células em divisão (JAVERI *et al.*, 2008). A radiação UVA, portanto, tem sido associada ao desenvolvimento de cânceres de pele (AGAR *et al.*, 2004).

1.2. Mecanismos de Reparo

Para evitar processos de morte celular, instabilidade genômica, mutações entre outros processos, várias estratégias de reparo de DNA foram selecionadas nos organismos durante a evolução auxiliando na manutenção de sua integridade genética. Dentre estes mecanismos de reparo, destacam-se:

1.2.1. Fotorreparo

É uma forma de reparo eficiente e direta que se caracteriza por ter uma única enzima, a fotoliase, a qual remove lesões como CPD ou (6-4)PP, empregando a energia dos fótons emitidos entre 320-500 nm (YASUI *et al.*, 1994). Nesse mecanismo a enzima se liga ao dímero no escuro com alta afinidade e especificidade e, pela absorção de um fóton, restaura a integridade do DNA (MU *et al.*, 2005). Neste processo, não há necessidade de substituição das bases lesadas: a estrutura original da molécula de DNA é recuperada com a reversão da lesão (WEBER, 2005). Na figura 7 temos um esquema deste mecanismo:



Figura 7 – Esquema do mecanismo de fotorreparo: 1) Formação de um dímero de pirimidina após exposição à radiação UV; 2) Reconhecimento e ligação da fotoliase à lesão, ainda não escuro, com alta afinidade e especificidade; 3) Ativação da fotoliase pela absorção de um fóton > 320 nm; 4) Estrutura do DNA recuperada com a reversão da lesão e liberação da fotoliase (Modificada: FRIEDBERG, 2003).

Dois tipos de fotoliases, que diferem por sua especificidade ao substrato, foram identificados e atividade caracterizada na natureza: a CPD fotoliase é específica para o reparo da lesão CPD, e a (6-4)-fotoliase é específica para o reparo de (6-4)PP (TANAKA *et al.*, 2001). Recentemente, foi relatado que a (6-4)-fotoliase também é capaz de reparar lesões do tipo Dewar, porém menos eficientemente do que (6-4)PP (GLAS *et al.*, 2009).

12

Introdução 13

O fotorreparo é largamente distribuído entre as espécies, abrangendo desde bactérias até plantas e mamíferos. A ampla distribuição da fotoliase e a sua eficiência no uso da radiação emitida pelo sol, a mesma fonte que induz lesões no DNA, indicam que a mesma seria uma proteína antiga que pode ter tido um papel importante na evolução dos seres vivos (YASUI et al., 1994).

As duas fotoliases atuam por mecanismos similares e são homólogas, ou seja, têm origem comum. Os dados filogenéticos indicam que um gene ancestral de fotoliase se duplicou há muito tempo atrás (provavelmente antes do aparecimento dos eucariotos) e estes genes seguiram uma evolução divergente e se especializaram para o reparo dos dois tipos de lesão aqui descritos (YASUI et al., 1994). Entretanto, esta atividade de fotorreparo está ausente em animais placentários (GARINIS et al., 2006). A atividade (6-4)fotoliase só foi encontrada, até o momento, em poucos organismos como insetos (Drosophila melanogaster), anfíbios (Xenopus laevis), plantas (Arabidopsis thaliana), fungos (Neurospora) e peixes (Danio rerio e Carassius), sendo que ainda não foi descrita em procariotos (YI et al., 2006) e em leveduras (THOMA, 1999). Aparentemente, os genes que codificam para fotoliases foram perdidos, por razões desconhecidas, durante a evolução de mamíferos placentários, incluindo humanos (Figura 8 - MENCK, 2002).





Foi reportado que a CPD-fotoliase melhora o reparo por excisão de nucleotídeos em *E.coli* e levedura (TANIDA *et al.*, 2005). É concebível que durante a evolução esta segunda função tenha se tornado mais importante, culminando na completa perda de sua atividade de fotorreativação nos mamíferos placentários. Embora nenhuma função auxiliar seja conhecida para fotoliases em eucariotos superiores, uma grande mudança na sequência pode

Introdução 15

ser a consequência do desenvolvimento de funções adicionais (YASUI et al., 1994).

O genoma humano tem dois genes CRY que codificam para proteínas com sequências similares às das fotoliases, sendo também homólogas a essas proteínas. No entanto, estes genes codificam para receptores de luz azul que estão envolvidos com o ajuste do ritmo circadiano (WEBER, 2005). Consequentemente, outro mecanismo muito mais complexo e versátil é utilizado por estes organismos para o reparo das lesões CPD e (6-4)PP: o Reparo por Excisão de Nucleotídeos (NER – Nucleotide Excision Repair).

1.2.2. Reparo por excisão de nucleotídeos (NER)

NER é um tipo de reparo de DNA altamente conservado caracterizado por sua habilidade de reconhecer e eliminar uma grande variedade de danos estruturais no DNA que causam distorções na dupla hélice, incluindo aquelas causadas pela radiação UV. Ele envolve múltiplos passos intermediários e a ação coordenada de diversas proteínas.

Este mecanismo é dividido em duas subvias: Reparo do Genoma Global (GGR), o qual remove lesões em todo o genoma, no entanto alguns tipos de lesão não são tão bem reconhecidos por esta via; e Reparo Acoplado à Transcrição (TCR), o qual elimina preferencialmente lesões localizadas na fita transcrita de genes ativos. Acredita-se que o TCR serviria como um backup para aquelas lesões presentes na fita transcrita que são lentamente ou não reparadas pelo GGR (JANS et al., 2005). O que diferencia essas duas subvias é o passo de reconhecimento da lesão. No TCR sugere-se que a RNApol II é bloqueada frente à lesão e este é o passo principal para o direcionamento das

proteínas de reparo para a fita transcrita. No GGR, o primeiro passo consiste no reconhecimento da lesão através da ligação do complexo XPC-hHR23B ao DNA contendo alguma distorção (COSTA *et al.*, 2003).

O processo do NER em eucariontes envolve a ação de aproximadamente 30 proteínas que atuam em cinco passos sucessivos: 1) reconhecimento da lesão; 2) abertura da dupla hélice de DNA onde está localizada a lesão; 3) dupla incisão nas extremidades dessa lesão; 4) síntese do novo DNA utilizando como molde a fita não danificada e 5) ligação da porção 5' da nova fita sintetizada à sequência original (COSTA *et al.*, 2003).

Após os passos de reconhecimento da lesão, o TCR e o GGR convergem para uma via comum. Primeiro ocorre o recrutamento do fator de transcrição H da RNA polimerase II (TFIIH), incluindo as helicases XPB e XPD que são responsáveis pela abertura da dupla hélice do DNA ao redor da lesão. Paralelamente, são recrutadas as proteínas XPA e RPA para estabilizar as fitas abertas. Após abertas as fitas, as endonucleases XPG e XPF-ERCC1, fazem as incisões no lado 3' e 5' da lesão, respectivamente. O oligonucleotídeo contendo a lesão, com tamanho entre 25-30 nucleotídeos, é removido e o espaço gerado na molécula de DNA é preenchido pela DNA polimerase δ/ϵ , utilizando como iniciador o grupo hidroxil (OH) deixado na porção 3' pela ação do complexo XPF-ERCC1. Na síntese de reparo, onde ocorre a substituição do oligonucleotídeo removido contendo a lesão, a maioria das proteínas do NER deixa a área da lesão e a maquinaria de síntese de DNA toma seu lugar, restando apenas os fatores de replicação RPA, RFC, PCNA e a DNA polimerase δ/ϵ . Finalmente, a reação de ligação do oligonucleotídeo recémsintetizado é desempenhada pela DNA ligase I (THOMA, 1999; COSTA *et al.*, 2003). A figura 9 sumariza este mecanismo:



Figura 9 - Modelo geral do mecanismo de NER em humanos. Lesões contidas no genoma global são removidas pelo GGR, enquanto lesões contidas na fita transcrita de um gene ativo são reparadas pelo TCR. Após o reconhecimento da lesão, ocorre abertura da dupla hélice do DNA, a região da lesão é removida e, finalmente, há a síntese de reparo e reação de ligação (Modificada: HOEIJMAKERS, 2001).

Diferentemente do fotorreparo, a remoção das lesões induzidas por UV é feita de maneira lenta, nem sempre eficiente, pelo NER. Os 6-4PPs são mais rapidamente reparados, de modo que pelo menos 80 % dessas lesões são removidas ainda nas primeiras 4 h subsequentes à irradiação. No caso dos CPDs, no entanto, o processo de reparo é mais lento e somente cerca de 60% dessas lesões são reparadas nas primeiras 24 h (RIOU *et al.*, 1999; RIOU *et al.*, 2004). O mesmo foi observado por Chandrasekhar e Houten (2000) em células de *E.coli* proficientes em reparo. Quarenta minutos após a irradiação com radiação UVC, uma média de 42% de (6-4)PPs foi reparada contra apenas 1% de CPDs, sendo que os (6-4)PPs foram reparados 9 vezes mais rapidamente que os CPDs.

As razões para essas taxas diferenciais de reparo são ainda desconhecidas. Questiona-se se isso refletiria nos papéis biológicos dessas duas lesões. Nesse caso, o rápido reparo de 6-4PPs poderia indicar que a permanência dessas lesões seria extremamente deletéria para a célula, levando-a a priorizar o reparo das mesmas ou, por causar distorções mais acentuadas à molécula de DNA, seria mais facilmente encontrada (BESARATINIA *et al.*, 2008) No entanto, essa diferença pode refletir, simplesmente, a acessibilidade dessas lesões às proteínas do NER, já que estas lesões são geradas em regiões diferentes do genoma. Enquanto os CPDs são prioritariamente gerados em nucleossomos, os 6-4PPs encontram-se em DNA *linker*. Nesse caso, sendo mais facilmente detectados e acessados, os 6-4PPs seriam mais rapidamente reparados (RIOU *et al.*, 1999; RIOU *et al.*, 2004). Tem sido observado também que algumas proteínas ligam-

Introdução 19

se preferencialmente às lesões (6-4)PP, incluindo algumas proteínas do NER (THOMA, 1999).

Pelo menos 3 síndromes humanas estão associadas a deficiências em uma ou ambas as vias do NER: Xeroderma Pigmentosum (XP), Tricotiodistrofia (TTD) e Síndrome de Cockayne (CS). Essas síndromes são raras, com herança autossômica recessiva e os pacientes são caracterizados por apresentar elevada sensibilidade à radiação UV (CHIGANÇAS *et al.*, 2004).

A combinação e intensidade dos sintomas dos pacientes XP variam de acordo com o gene alterado e o grau de evolução da doença. Um dos principais sintomas é a incidência aumentada de tumores (cerca de mil vezes maior que a média da população). Enquanto na população em geral o aparecimento dos primeiros tumores ocorre acima dos 60 anos de idade, em portadores de XP eles surgem, em geral, antes dos 10 anos (CLEAVER, 2000).

Em cerca de 30 % dos pacientes XP ocorre degeneração neurológica progressiva, fato ainda pouco compreendido, mas explicada pelo suposto envolvimento da via de NER com a via de reparo por excisão de base (BER – *Base Excision Repair*), cujo papel está na remoção de danos no DNA induzidos por EROs (MITRA *et al.*, 2001). O consumo de oxigênio pelo tecido nervoso supostamente resultaria em maior produção das EROs e a falta de reparo dessas lesões poderia estar diretamente envolvida na neurodegeneração observada em pacientes XP ou mesmo em CS e TTD.

Existem 8 grupos de complementação: XP clássicos (*XPA a XPG*), nos quais o fenótipo XP é resultado da deficiência na via de NER e XP Variantes (XPV) onde os pacientes são proficientes em NER e a deficiência decorre da incapacidade da maquinaria celular replicar o DNA na presença de fotolesões.

A deficiência nestes pacientes resulta da alteração no gene *POLH* que codifica para a DNA polimerase *eta*, importante na síntese translesão do DNA (CLEAVER, 2000).

2. Objetivos

O objetivo geral deste projeto é responder questões antigas sobre a importância relativa das lesões CPD e (6-4)PP em respostas celulares, através de ensaios *in vitro* e *in vivo* com CPD-fotoliase e (6-4)-fotoliase. Especificamente, pretendemos:

 Verificar se fibroblastos humanos proficientes e deficientes em NER são sensíveis à radiação UVA;

 Quantificar a formação das lesões CPD, (6-4)PP e Dewar pela radiação UVA no genoma de células humanas;

3) Investigar, através da transdução de células com adenovírus recombinantes contendo a CPD-fotoliase ou a (6-4)-fotoliase, a importância relativa destas lesões nas respostas observadas pós-irradiação.

 Expressar, em sistemas bacterianos, a CPD-fotoliase e (6-4)fotoliase, ambas de eucariotos, de modo a obter essas enzimas ativas e também os anticorpos para essas proteínas.

3. Material e Métodos

3.1. Linhagens celulares

Para execução dos experimentos, utilizamos duas linhagens celulares diferentes:

 As células MRC5 são fibroblastos derivados de tecido pulmonar normal, sendo proficientes em NER;

•As células XP12BE (XP-A) são fibroblastos de pele mutados no gene *XPA* apresentando mutações distintas nos alelos. Um alelo carrega uma substituição G para C no nucleotídeo 555 (555G>C) do exon 4 e o segundo alelo carrega uma transversão G para T no intron 3. As duas mutações acarretam em processamento incorreto do mRNA, *missplice*, resultando em não produção da proteína XPA (Coriell Cell Repositories, EUA; http://ccr.coriell.org). Esta linhagem é deficiente para as duas subvias do NER.

Todas as linhagens são imortalizadas pelo SV40 e foram gentilmente cedidas pelo Dr. Alain Sarasin (Institut Gustave Roussy, França).

3.2. Cultura de células

As células foram cultivadas rotineiramente em garrafas de 25 ou 75 cm² com o tratamento *Nunclon*[™]_ *Surface* (Nalgene Nunc International, EUA). Foi utilizado meio *Dulbeco's Modified Eagle Medium High Glucose* - DMEM (LGC Biotecnologia, Brasil) suplementado com 10 ou 15 % de soro fetal bovino (Cultilab, Brasil) e 1 % de solução de antibiótico/antimicótico - AB (0,1 mg/ml penicilina, 0,1 mg/ml estreptomicina e 0,25 mg/ml fungizona – Invitrogen, EUA). Todas as linhagens celulares foram mantidas a 37 °C, em atmosfera úmida com 5 % de CO₂.

Quando atingiam a confluência ou quando necessárias para um experimento, o meio de cultura foi removido e as células foram lavadas com 2-5 ml de tampão PBS - *Phosphate Buffered Saline* (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 8 mM Na2HPO4, 1,5 mM KH2PO4, pH 7,6 - Fischer Scientific, EUA), tripsinizadas com solução de ATV, composta por Tripsina 0,2% e Versene 0,002% (Instituto Adolfo Lutz, Brasil), a fim de promover a digestão da matriz proteica que garante a adesão das células à superfície, e ressuspensas em 5-10 ml de meio DMEM completo.

Para o plaqueamento experimental, utilizamos placas com diâmetros de 35, 60 ou 100 mm que também possuem o tratamento *Nunclon*™_ *Surface* (Nalgene Nunc International), transferindo o número de células necessário para cada experimento.

3.3. Congelamento e descongelamento de células

Com o intuito de formar ou manter o estoque das linhagens celulares, o congelamento de células foi efetuado da seguinte forma: células na fase exponencial de crescimento (80 – 90% de confluência) foram subcultivadas e ressuspensas em meio de cultura completo acrescido de 10 % de DMSO (Dimetilsulfoxido – Sigma-Aldrich, EUA). A suspensão celular foi distribuída em alíquotas de 1,8 ml em criotubos, os quais foram transferidos para caixas de congelamento contendo isopropanol (*cryo freezing container* - Nalgene Nunc International, EUA), que permite o lento resfriamento de seu conteúdo, e imediatamente incubadas a – 80 °C por um período mínimo de 4 horas.

Posteriormente, os criotubos foram transferidos para tanques de nitrogênio liquido, onde permaneceram até o momento do uso.

Para o descongelamento, o conteúdo do criotubo foi descongelado a 37 °C e imediatamente centrifugado a 1.200 rpm por 10 minutos e o sobrenadante contendo DMSO (tóxico para as células) foi descartado. O precipitado celular foi ressuspenso em 5 ml de meio de cultura completo e transferido para garrafas de cultura. No dia seguinte, era feita a troca do meio de cultura para a retirada de qualquer resquício de DMSO.

3.4. Irradiação com radiação UVC, UVB e UVA:

Os tratamentos foram feitos com fontes artificiais em condições controladas dentro do laboratório, pelo uso das lâmpadas: Philips UVC lamp TUV 15 W/G15 T8; UVB Vilber Loumart T 15M 15 W filtrada com uma placa de policarbonato para eliminar a radiação UVC; e UVA Osram Ultramed FDA KY10s 1000 W filtrada com o filtro Schott BG39 3 mm de espessura (Schott Glass, Germany). A emissão da lâmpada foi medida com um radiômetro VLX 3 W (Vilber Lourmat, Torcy, France). Os espectros de irradiância das lâmpadas de UVB e UVA são apresentados na Figura 10. A intensidade de radiação UVC para a lâmpada de UVB, assim como de UVC e UVB para a lâmpada de UVA estava abaixo dos limites de detecção do aparelho.



Figura 10 - Espectro de irradiância das lâmpadas de UVB e UVA. A) Espectro de emissão da lâmpada de UVB Vilber Loumart T 15M 15 W com ou sem filtro de policarbonato. B) Espectro de emissão da lâmpada de UVA Osram Ultramed FDA KY10s 1000 W na presença ou ausência do filtro Schott BG39 3 mm de espessura (Schott Glass, Germany). Os espectros foram obtidos com o uso de um Espectrorradiômetro HR4000 Ocean Optics 1560. (SCHUCH *et al.*, 2009).

A irradiação realizou-se em tampão PBS. Para tal o meio de cultura foi retirado e foi adicionado 1-4 ml de PBS às placas. Após irradiação, o PBS foi removido e foi adicionado 2-4 ml de meio DMEM completo.

3.5. Transdução de células com adenovírus recombinantes contendo o gene da CPD-fotoliase (AdCPDphr) ou 6-4-fotoliase (Ad6-4phr).

Para calcular o título viral, 30 mil células foram transduzidas com volumes crescentes de vírus (1, 1,5, 2, 2,5, 3 e 3,5 μ l). No dia seguinte analisou-se a fluorescência e aquele volume no qual as células haviam sido 100% transduzidas foi escolhido para os próximos experimentos. No caso do AdCPDphr o volume foi >1,5 μ l e para o Ad6-4phr, >2,5 μ l, desta forma os títulos calculados foram, respectivamente, 2x10⁻⁷ GTU/ml e 1,2x10⁻⁷ GTU/ml.

 2×10^5 células foram distribuídas em placas de 100 mm e incubadas por 16 - 18 horas a 37 °C. No dia seguinte o meio de cultura foi removido e as células foram mantidas por 10 min em PBS⁺ (PBS acrescido de 89 mM de CaCl2 e 50 mM de MgCl2). O PBS foi removido e foi adicionado 2,5 ml de meio DMEM sem soro acrescido de 10 µl de AdCPDphr e/ou 12 µl de Ad6-4phr. As células foram incubadas por 2 horas a 37 °C (a suspensão viral foi homogeneizada a cada 30 minutos). Completado este tempo, 5 ml de meio DMEM completo (com soro e antibiótico) foi adicionado à cultura celular. Vinte e quatro ou 48 horas após transdução, era verificada a fluorescência verde emitida pelas células. No caso de transdução eficiente, as células foram subcultivadas em placas de 35 ou 60 mm e incubadas novamente por 16 – 18 horas antes de iniciar o tratamento.
3.6. Fotorreativação das células

Nos experimentos nos quais havia transdução com os adenovírus recombinantes, as células, após a irradiação, eram dispostas em uma placa de vidro a 10 cm de lâmpadas fluorescentes (duas lâmpadas Philips 15 w, emissão entre 365 – 700 nm) e mantidas por um período de 15 a 60 minutos em meio DMEM completo ou PBS. Como controle, parte das células foi coberta por papel alumínio e mantida nas mesmas condições anteriormente descritas. Ao término, no caso das placas com PBS, este era removido e substituído por meio DMEM completo e as células eram então mantidas na estufa pelo tempo necessário para conclusão do experimento.

3.7. Análises das respostas celulares frente aos danos genotóxicos

3.7.1. Ensaios de sobrevivência celular

Foi verificada, neste ensaio, a capacidade de formação de colônias das linhagens celulares estudadas após o tratamento com diferentes doses de UVA. Aproximadamente 1,5 x 10³ células foram distribuídas em placas de 60 mm e, após incubação por 16 - 18 horas, o meio foi retirado e substituído por PBS para irradiação e, dependendo do experimento, seguiu-se com a fotorreativação. Após tratamento, foi retirado o PBS e adicionado meio DMEM com 15 % de soro fetal bovino e 1 % antibióticos. As células foram incubadas por 7 - 10 dias a 37 °C. Após esse período, as placas foram fixadas com formaldeído 10 % por 10 minutos, coradas com cristal de violeta 1 % por 5 minutos. Foram consideradas colônias somente aqueles grupos formados por no mínimo 15 células. A análise quantitativa foi determinada a partir da razão

entre o número de colônias nas placas irradiadas pelo número de colônias nas placas não irradiadas, valor dado em percentual.

3.7.2. Análise de morte celular por citometria de fluxo após irradiação.

Com o intuito de analisar a morte celular induzida pela UVA, utilizamos como parâmetro a população celular que apresentava núcleos subdiplóides (região sub-G1). Para obter esses dados, 5 x 10⁴ células foram homogeneamente distribuídas em placas de 35 mm pelo menos 16 horas antes da irradiação. Após esse período, o meio foi substituído por PBS, as células foram irradiadas e, dependendo do experimento, seguiu-se com a fotorreativação. Após o tratamento, as células foram incubadas a 37 °C em meio DMEM completo por 72 horas.

Para a análise de núcleos isolados, foram coletadas as células em suspensão no meio de cultura e aquelas que se mantiveram aderidas à placa, neste caso pelo tratamento com tripsina. As células foram centrifugadas a 1500 rpm por 10 minutos, o sobrenadante foi descartado e o precipitado celular foi ressuspenso em 1 ml de etanol 70 % gelado (- 20 °C). As amostras foram guardadas a - 20 °C por pelo menos 2 horas ou, no máximo, até 30 dias.

Após a fixação, as amostras foram centrifugadas por 10 minutos a 4000 rpm, o sobrenadante foi descartado e o precipitado celular foi ressuspenso em 1 ml de PBS. As amostras foram novamente centrifugadas e o sobrenadante descartado. O precipitado celular foi ressuspenso em 200 µL de solução de iodeto de propídeo (200 µg/ml de RNAse A, 20 µg/ml de iodeto de propídeo, 0,1 % (v/v) de Triton X-100, em PBS filtrado) e mantidas por pelo menos 30 minutos à temperatura ambiente, evitando-se a incidência de luz direta. As

células foram então centrifugadas a 4000 rpm por 10 minutos, o sobrenadante descartado e o precipitado celular foi ressuspenso em 1 ml de PBS filtrado. Novamente as células foram centrifugadas e o precipitado foi ressuspenso em 200 - 500 µl de PBS filtrado. A fluorescência do iodeto de propídeo (molécula intercalante de DNA) foi estimada por citometria de fluxo utilizando-se o citômetro *Guava*® *PCA-96 System* (GE Healthcare, EUA). A fluorescência desse agente corresponde à quantidade de DNA presente na célula. Para cada amostra, 5.000 células foram analisadas utilizando o software CytoSoft 5.1 (GE Healthcare). Os resultados foram expressos como um percentual de células subdiplóides (sub-G1) que representa a fração de células onde ocorreu fragmentação do DNA e, portanto, morte celular por apoptose. Os experimentos foram realizados em duplicatas.

3.8. Extrações de DNA genômico

Vinte e quatro horas antes do experimento foram semeadas 5 X 10⁵ células em placas de 60 mm de diâmetro. No dia seguinte, o meio de cultura das células foi removido, adicionado PBS pré-aquecido e irradiadas com, 20 J/m² de UVC, 2,5 kJ/m² de UVB e/ou 120 ou 300 kJ/m² de UVA. Imediatamente após a irradiação, as placas foram colocadas no gelo para seguir com a extração do DNA genômico, que foi utilizado para a realização dos experimentos de detecção de lesões de DNA com o uso de anticorpos específicos.

O DNA genômico foi extraído seguindo um de dois protocolos:

1. Foi adicionado 1 ml de uma solução contendo 0,5 % de Triton X-100, 100 mM de NaCl e 10 mM de EDTA, incubamos por 1 minuto à temperatura ambiente. Essa solução foi descartada e adicionamos 2 ml de uma solução contendo 0,5 % de SDS, 50 µg/ml de Proteinase K, 100 mM de NaCl e 10 mM de EDTA, e a placa foi incubada por 30 min a 37 °C. Após esse período, foram acrescentados 0,5 ml da solução NaCl 5 M, e novamente incubamos a 37 °C, por 15 min. Terminada a incubação, o conteúdo da placa foi coletado e transferido para um tubo de vidro Corex® (DuPont, Brasil) contendo 10 µg/ml de RNAse A (Invitrogen). Adicionamos o mesmo volume de clorofórmio: alcool isoamílico (24:1), agitamos para misturar as soluções e centrifugamos a 6.000 rpm por 20 min a 4 °C. A fase aquosa, contendo o ácido nucléico, foi transferida para outro tubo e adicionamos 2x volume de etanol 100%. Agitamos levemente e incubamos a - 20 °C por 30 – 60 min. Os tubos foram centrifugados a 10.000 rpm por 20 min a 4 °C, e o sobrenadante foi descartado. Secamos o precipitado por 1 hora a 37 °C e o DNA que se encontrava no precipitado foi ressuspenso em 200 µL de tampão TE (10 mM Tris-HCI pH 8,0; 1 mM EDTA). O DNA resultante dessa extração foi quantificado em espectrofotômetro (NanoDrop 1000, Thermo Scientific, EUA) e armazenado a 4 ºC até sua utilização.

2. Na outra metodologia, coletou-se o PBS no qual as células foram irradiadas, transferido para tubos falcon. Adicionou-se tripsina para soltar as células aderidas à placa sendo também transferidas ao falcon. Centrifugamos por 12 minutos, 1200 rpm. O sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspenso em 600 µl de tampão de lise celular (10 mM Tris-Cl pH 8,0; 1 mM EDTA; 0,1 % (w/v) SDS). A suspensão foi transferida para um microtubo e homogeneizada invertendo por cerca de 50 vezes. Adicionou-se 3 µl de proteinase K (20 mg/ml) e 1 µl de RNAse A (20 mg/ml). A solução foi incubada

por 30 min a 37°C. Passado este tempo, foi adicionado 200 µl de acetato de potássio 3 M gelado, vortexando por 20 minutos, seguida de incubação por 5 minutos no gelo. A solução foi centrifugada a 14000 rpm por 5 minutos a 4°C. O sobrenadante foi dividido entre dois microtubos e em cada um foi adicionado 600 µl de isopropanol 100 %. A solução foi misturada invertendo o microtubo gentilmente. Centrifugamos novamente a 14000 rpm por 5 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi lavado com 600 µl de etanol 70 %. Novamente a solução foi centrifugada, o sobrenadante descartado e secamos o precipitado à temperatura ambiente. O DNA foi ressuspenso em 100 µl de TE, juntando-se o precipitado dos dois microtubos.

3.9. Detecção das lesões CPD, (6-4)PP e Dewar por ensaios de Imuno *slot-blot*

Para a confirmação da formação de lesões CPD, 6-4PP e Dewar após exposição das células à radiação UV, amostras do DNA genômico obtidas após cada tratamento foram misturadas com DNA de esperma de salmão (totalizando 1 µg de DNA), desnaturadas a 100 °C por 10 minutos e imediatamente colocadas no gelo. Esse DNA foi transferido para membranas de nitrocelulose e estas foram incubadas em SSC 5X (750 mM NaCl, 75 mM citrato de sódio) por 15 minutos. Em seguida, as membranas foram secas à temperatura ambiente e então incubadas a 80 °C por 2 horas e então bloqueadas em 5 % leite em pó desnatado diluído em PBS por 16-18 horas a 4 °C e incubadas com os anticorpos primários (anti-CPD, anti-6-4PP ou anti-dewar, Medical and Biological Laboratories Ltda, Japão) numa diluição de 1:1000 para o anti-CPD e 1:2000 para os outros dois anticorpos por 3 horas a

4°C, sob agitação constante. Ao final desse período, o anticorpo primário foi removido e foram procedidas 6 lavagens (5 minutos cada) em PBST (0,1% Tween 20 em PBS). O anticorpo secundário (anti-camundongo conjugado com a enzima *Horseradish Peroxidase* - HRP, GE Healthcare) foi adicionado na proporção 1:2000 e as membranas foram incubadas por 2 horas a temperatura ambiente, sob agitação constante. Novamente, a remoção do anticorpo secundário foi procedida por 6 lavagens em PBST. Foi adicionado o reagente de quimioluminescência (Amersham ECL Western blotting detection reagents and analysis system, GE Healthcare), o qual gera um sinal luminoso pela oxidação desse reagente pela enzima HRP, que está conjugada ao anticorpo secundário. A membrana foi analisada pelo sistema detector de quimioluminescência (Image Quant 300, GE Healthcare).

3.10. Preparação de bactérias quimiocompetentes

O protocolo utilizado para obtenção das bactérias competentes baseia-se na técnica descrita por Sambrook e Russell (2001). Uma colônia fresca de *E.coli* [cepas DH10B (*F-, mcrA (mrrhsdRMS-mcrBC), 80lacZM15, lacX74, deoR, recA1, endA1, ara139, galU, galK, rpsL, nupG, tonA, STMR*), DH5a (*fhuA2* Δ (*argF-lacZ*)*U169 phoA glnV44* Φ 80 Δ (*lacZ*)*M15 gyrA96 recA1 relA1 endA1 thi-1 hsdR17*) ou UNC523 (*phr::kan uvrA::Tn10*)] foi pré-inoculada em 2 ml de meio LB (*Luria-Bertani Medium* – bacto-triptona 1 %, extrato de levedura 0,5 %, NaCl 1%) e incubada a 37 °C sob agitação constante por aproximadamente 16 horas. A suspensão bacteriana foi transferida para 200 ml de meio LB e mantida a 37 °C sob agitação até atingir densidade óptica (D.O.) entre 0,5 e 0,6 a 580 nm. Após o crescimento, a suspensão bacteriana foi tratada com 10 mM MgCl₂ e distribuída em 4 tubos de 50 ml previamente imersos em gelo, sendo assim mantidos por 15 minutos. As células foram centrifugadas a 3.000 rpm por 12 minutos a 4°C, ressuspensas cuidadosamente em 10 ml de solução estéril RFI (100 mM KCl, 50 mM MnCl₂, 30 mM acetato de potássio/pH 6,9, 10 mM CaCl₂, 15 % glicerol, pH 5,8 ajustado com ácido acético). Após 15 minutos em gelo, as células sofreram nova centrifugação, foram ressuspensas em 2 ml de solução estéril RFII (10 mM NaMOPS, 10 mM KCl, 75 mM CaCl₂, 15 % glicerol, pH 6,8). Esse volume foi aliquotado em microtubos (100 µl) previamente imersos no gelo e estocados a - 80 °C.

3.11. Preparação de bactérias eletrocompetentes

Após atingir a D.O. desejada (entre 0,5 e 0,6 a 580 nm), o volume foi distribuído em 4 tubos de 50 ml previamente imersos no gelo e mantidos por mais 15 minutos nesta condição. Os 4 tubos foram centrifugados a 3.000 rpm, por 12 minutos a 4°C. O precipitado foi ressuspenso em 10 ml de água milli-Q estéril gelada, em seguida o volume de cada tubo foi completado para 50 ml. Uma nova centrifugação a 3.000 rpm, por 12 minutos a 4°C foi realizada. O precipitado foi ressuspenso em 10 ml de água milli-Q estéril gelada e o volume de cada tubo foi completado para 50 ml. Uma nova centrifugação a 3.000 rpm, por 12 minutos a 4°C foi realizada. O precipitado foi ressuspenso em 10 ml de água milli-Q estéril gelada e o volume de cada tubo foi completado para 25 ml. Juntou-se o volume de dois tubos a fim de obter um volume final de 50 ml. A mesma centrifugação foi realizada novamente. O precipitado foi ressuspenso em 10 ml de glicerol 10 % estéril, e centrifugado uma última vez a 3.000 rpm, por 12 minutos a 4 °C. O precipitado foi ressuspenso em 1 ml de glicerol 10 % estéril. Esse volume foi aliquotado em microtubos (50 μl) previamente imersos no gelo e estocados a – 80 °C.

3.12. Transformação de bactérias quimiocompetentes.

Os plasmídeos interesse foram inseridos de bactérias nas quimiocompetentes, segundo método descrito por Hanahan (1983). O DNA plasmidial ou reação de ligação de interesse foi acrescentado ao tubo contendo 50 µl de bactéria quimiocompetente, sendo respeitado o limite máximo de 5 µl, e gentilmente misturado à suspensão bacteriana. Após incubação por 30 minutos em gelo, as bactérias foram submetidas a um choque térmico a 42 °C por 2 minutos, transferidas imediatamente ao gelo por 5 minutos e, após adição de 450 µl do meio de cultura SOC (SOB – bacto-triptona 2%, 0,5% de extrato de levedura, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄, pH 6,8 – acrescido de 20 mM de glicose), as bactérias permaneceram a 37 °C, sob agitação constante durante 1 hora. As bactérias foram, então, plaqueadas em meio LB sólido (1 % triptona ou peptona; 0,5 % extrato de levedura; 85 mM NaCl; 1,5 % bacto-agar), acrescido de antibiótico para seleção, e permaneceram a 37 °C por aproximadamente 16 horas. No dia seguinte, o número de colônias bacterianas foi contado e a eficiência de transformação da bactéria quimiocompetente foi determinada em unidades formadoras de colônias por micrograma de DNA plasmidial (UFC/µg).

3.13. Transformação de bactérias eletrocompetentes.

O sistema utilizado foi o Gene Pulser II (Bio-Rad, USA). Nesse procedimento cubetas estéreis de eletroporação foram previamente imersas no gelo. Foi adicionado 1 µl de DNA plasmidial a 50 µl da bactéria eletrocompetente. Esse conteúdo foi transferido para o fundo da cubeta evitando a formação de bolhas. Em seguida foi dado o eletrochoque no eletroporador a 2,5 kV, 25 μF e 200 Ω. Imediatamente após o eletrochoque, foi adicionado 1 ml de meio SOC. Esse conteúdo foi transferido para um microtubo e incubado a 37 °C, por 1 hora sob agitação constante. Ao final desse período, o volume desejado foi plaqueado em placa de petri contendo meio LB sólido com antibiótico adequado, seguido de incubação a 37 °C por 16 horas. No dia seguinte, o número de colônias bacterianas foi contado e a eficiência de transformação da bactéria eletrocompetente foi determinada em unidades formadoras de colônias por micrograma de DNA plasmidial (UFC/µg).

3.14. Extração de DNA plasmidial em pequena escala (mini-prep)

A extração do DNA plasmidial de interesse foi realizada pelo método de lise alcalina, adaptada a partir da técnica elaborada por Birnboim e Doly (1979). Para tanto, colônias bacterianas foram inoculadas em 2 ml de meio LB líquido acrescido do antibiótico indicado para a seleção e incubadas a 37 °C por 16 - 18 horas, sob agitação constante. Após esse período, a suspensão bacteriana foi centrifugada a 14.000 rpm por 2 minutos. O precipitado bacteriano resultante foi, então, ressuspenso em 300 µl de solução P1 gelada (50 mM Tris-HCl pH 8,0, 10 mM EDTA pH 8,0, 100 µg/ml RNAse). A fim de promover a ruptura da membrana plasmática bacteriana, foram adicionados 300 µl da solução P2 (0,2 N NaOH, 1 % SDS), o conteúdo dos tubos foi gentilmente misturado através de inversão e os tubos foram mantidos em repouso a temperatura ambiente por 5 minutos. Posteriormente, 300 µl da solução P3 gelada (3 M acetato de potássio, pH 5,5 ajustado com acido acético glacial) foram adicionados, os tubos foram novamente invertidos para misturar o conteúdo e, em seguida, foram centrifugados a 14.000 rpm por 10 minutos. O

sobrenadante foi transferido para tubos novos, aos quais se adicionou 400 µl de isopropanol (0,7 vezes o volume inicial). O conteúdo foi misturado cuidadosamente por inversão e novamente centrifugado a 14.000 rpm por 10 minutos. Em seguida, o sobrenadante foi removido, o precipitado de DNA foi cuidadosamente lavado com 600 µl de etanol 70 %, centrifugado a 14000 rpm por 5 min. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi seco a temperatura ambiente e ressuspenso em 50 µl de TE. O DNA foi quantificado em espectrofotômetro.

Quando necessária uma pureza maior na extração plasmidial, seja para sequenciamento ou para clonagens, a *mini-prep* dos plasmídeos de interesse foi feita com o auxílio de kits comerciais (Quiagen, EUA; Invitrogen), seguindo-se as instruções recomendadas pelo fabricante. Ainda, quando necessitamos uma preparação em maior escala (*midi-prep* ou *maxi-prep*), utilizamos o kit *QIAGEN Plasmid Midi* ou *Maxi Kit.* Os DNAs plasmidiais resultantes dessas extrações tiveram sua integridade e quantificação verificadas através da visualização em gel de agarose e quantificação em espectrofotômetro.

3.15. Obtenção de vetores bacterianos contendo os cDNAs das fotoliases

3.15.1. Vetor pMAL

3.15.1.1. Amplificação dos genes das fotoliases por PCR (*Polymerase Chain Reaction*)

O vetor pMAL foi escolhido por apresentar a vantagem de expressar a proteína de interesse em fusão com a proteína MBP (*Maltose-Binding Protein*), codificada pelo gene *malE*, a qual tem demonstrado aumentar a solubilidade

das proteínas além de facilitar a purificação, por cromatografia de afinidade por amilose (ZWICK *et al.*, 1998). Depois de realizada esta etapa a MBP pode ser clivada pela enteroquinase (http://www.neb.com/nebecomm/products/productN8069.asp, NEB, USA). No entanto, uma das limitações do vetor pMAL é seu número restrito de sítios de restrição para inserção do gene de interesse. São apenas sete, sendo que 3 deles também estão presentes nos cDNAs das fotoliases. Foram desenhados *primers* específicos para os cDNAs das duas fotoliases contendo sítios de restrição para posterior ligação ao vetor pMAL.

Os primers para amplificação do cDNA da (6-4)-fotoliase são

Forward: ACGGTACCCATATTCATGCAAC Kpn I Reverse: CCCTGCAGAGTAATTCAAATAA Pst I

e para a CPD-fotoliase são

Forward: AAGAATCCCCCACCATGGACTC Eco RI Reverse: ATCAAGCTTTAATCTGCAGGGC Hind III

Os cDNAs foram obtidos a partir de construções já existentes no laboratório sendo elas: pIRES-(6-4)phr contendo o cDNA da (6-4)-fotoliase proveniente da *Arabidopsis thaliana* (LIMA-BESSA *et al.*, 2008) e pEGFP-N1-CPDphr, a qual contém o cDNA da CPD fotoliase, proveniente do mamífero marsupial *Potorous tridactylus* (CHIGANÇAS *et al.*, 2004).

As reações foram realizadas com o kit *Platinum® Pfx DNA Polymerase* (Invitrogen), que apresenta atividade editorial. Os produtos da extensão foram

visualizados por eletroforese em gel de agarose 0,8 % e as bandas de interesse foram extraídas (identificadas pelo tamanho esperado para cada cDNA, aproximadamente 1,9 Kbp para (6-4)-fotoliase e 1,6 Kbp para CPD-fotoliase) e purificadas, utilizando o *S.N.A.P.* $^{\text{M}}$ *Gel Purification Kit* (Invitrogen), para posterior subclonagem no pGEM T-easy (Promega, USA).

3.15.1.2. Subclonagem ao vetor pGEM T-easy.

Para a subclonagem dos genes amplificados ao vetor pGEM T-easy seguimos as recomendações do fabricante. Este vetor permite a clonagem de produtos de PCR contendo uma adenina extra nas extremidades 3' dos DNAs amplificados.

3.15.1.3. Transformação de bactérias competentes e extração de DNA plasmidial

Os produtos de ligação pGEM T-easy + cDNAs das fotoliases foram transformados em bactérias quimio ou eletrocompetentes. As colônias transformadas foram plaqueadas em meio LB acrescido de ampicilina, X-gal e IPTG, um sistema bastante eficiente que permite a rápida triagem dos clones portando o inserto de interesse, através da coloração das colônias. A formação de colônias brancas é decorrente da intercalação e, consequente, inativação do gene *lacZ*. Naquelas sem inativação deste gene a coloração será azulada (SAMBROOK e RUSSEL, 2001). Os clones selecionados foram crescidos em meio de cultura e procedida a extração do DNA plasmidial por *mini-prep*. Esse DNA foi sequenciado para confirmação de que não houve erros na amplificação do gene por PCR.

3.15.1.4. Reações de sequenciamento

Foi empregado o sequenciamento automático de capilar no aparelho ABI-PRISM 3.100 (Applied Biosystems, EUA). Esta metodologia é uma modificação do método de Sanger (SANGER *et al.*, 1977), envolvendo a troca de radioisótopos por ddNTPs fluorescentes não radiativos presentes no kit de sequenciamento da Applied Biosystems BigDye[™] Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction.

O sequenciamento foi realizado através de protocolo estabelecido no laboratório, sendo utilizados 6 *primers* para cada construção a fim de sequenciar todo o cDNA das fotoliases.

Nas reações de sequenciamento foram utilizados 100 ng de DNA das amostras obtidas e descritas nas seções anteriores; 3,2 pmoles de *primers*; 1 µl de *BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Ready Reaction*® (Applied Biosystems); 2 µl de tampão de sequenciamento (*BigDye*[®] *Terminator v1.1, v3.1 5x Sequencing Buffer* - Applied Biosystems) e água Milli-Q para um volume final de 10 µl. Foram programados 40 ciclos para as reações de sequenciamento, constituídos dos seguintes passos: 96 °C por 10 segundos, 52 °C por 20 segundos e 60 °C por 4 min.

Os produtos das reações de sequenciamento foram precipitados com a adição de 100 µl de isopropanol 75 % e incubamos à temperatura ambiente por 10 min. As amostras foram então centrifugadas a 4000 rpm por 50 min, o isopropanol descartado e o precipitado foi lavado com 150 µl de etanol 70 %, sendo realizada nova centrifugação a 4000 rpm por 20 min. O sobrenadante foi descartado e a placa mantida em estufa a 37 °C por 30 min. As amostras foram então ressuspensas em formamida *Hi Di*, desnaturadas a 95 °C por 5 min e

colocadas no gelo durante 1 minuto para então serem submetidas ao sequenciamento.

3.15.1.5. Análise das sequências geradas

Com os dados do sequenciamento, prosseguimos para a análise *in silico*, com auxílio do site do *National Center for Biotechnology Information (NCBI)*, onde, através do recurso *Blast 2 sequences*, a sequência gerada foi comparada com sequências do cDNA de 6-4 fotoliase e CPD fotoliase depositadas no banco de dados. Adicionalmente, os cromatogramas também foram analisados com o auxílio do software *Bio Edit*.

3.15.1.6. Clonagem no vetor pMAL

Após confirmação da integridade da sequência das fotoliases clonadas no vetor pGEM T-Easy, foi realizada a digestão destas construções com as enzimas escolhidas: *Kpn I e Pst I* para (6-4)-fotoliase e *Eco RI e Hind III* para CPD-fotoliase. A digestão foi confirmada por eletroforese em gel de agarose 0,8 % e as bandas de interesse foram extraídas e purificadas para posterior clonagem no vetor pMAL. Seguiu-se o mesmo protocolo de transformação e extração de DNA plasmidial descrito anteriormente.

3.15.1.7. Subclonagens intermediárias

Em paralelo à clonagem via amplificação dos cDNAs com primers contendo sítios compatíveis com o pMAL, também recorremos à clonagem via subclonagens intermediárias. Como dito anteriormente, por apresentar poucos sítios de clonagem compatíveis, tivemos que usar um ou mais vetores para obtenção destes sítios e também para conseguirmos manter a mesma fase de leitura entre as fotoliases e a MPB. No caso da construção com a 6-4-fotoliase, partimos do vetor pGEM6-4, construção que já tínhamos disponível em nosso laboratório, digerimos com as enzimas *Not I* e *Spe I*, subclonamos no vetor pProEX HTC. Digerimos esta construção com *Kpn I* e *Sal I* e clonamos no vetor pMAL. Já para a CPD-fotoliase tivemos que usar 3 vetores intermediários. Digerimos o vetor pEGFP-N1CPD, utilizado anteriormente para fazer amplificação do cDNA da CPD-fotoliase, com as enzimas *Xho I* e *Sma I*. Subclonamos no vetor pBL ou pBC. Esta construção foi digerida com *Xho I* e *Not I*, passada para o vetor pET28a, que então foi digerido com *Xho I* e *Hind III*. O cDNA de interesse foi subclonado no vetor pProEX HTC. A construção foi digerida com as enzimas *Eco RI* e *Hind III*, finalmente sendo clonada no vetor pMAL.



Figura 11 - Desenho esquemático dos passos de subclonagens e clonagem das fotoliases ao vetor pMAL.

3.15.2. pProEx HT

O vetor pProEx HT foi escolhido por expressar as proteínas em fusão com uma sequência de 6 histidinas na sua extremidade N-terminal (cauda poli-His). Estes aminoácidos têm afinidade por níquel, sendo retidos na resina de níquel, enquanto as outras proteínas são eliminadas nas sucessivas lavagens. As proteínas podem então ser purificadas pela eluição com imidazol que possui maior afinidade pelo níquel que as histidinas. Existem 3 vetores pProEx HT cada um com uma fase de leitura, facilitando desta forma a clonagem em fase com a cauda de histidinas.

Para obtenção da CPD-fotoliase o vetor pEGFP-N1CPD foi digerido com as enzimas *Xho I* e *Not I*. Esta digestão gerou um fragmento contendo os genes da CPD-fotoliase e do GFP (Green Fluorescent Protein). O vetor pProEx HTb foi digerido com as enzimas *Sal I* e *Not I*.

Para obtenção da (6-4)-fotoliase o vetor pIRES-EGFP foi digerido com as enzimas *Xho I* e *Kpn I* e o cDNA da fotoliase foi inserido no vetor pProEx HTc, o qual foi digerido com as enzimas *Sal I* e *Kpn I*. Como as enzimas *Xho I* e *Sal I* têm sítios compatíveis, foi possível a obtenção das construções pProEX-CPD-GFPphr e pProEX-(6-4)phr.



Figura 12 - Desenho esquemático dos passos de subclonagens e clonagem das fotoliases ao vetor pProEx.

A obtenção das construções, tanto no pMAL como no pProEX HT, foram confirmadas via mapa de restrição e, em alguns casos, por sequenciamento.

3.16. Expressão das Fotoliases

A expressão das proteínas, independentemente da construção, foi feita em *E.coli* cepa UNC523, na qual há deleção do gene da fotoliase bacteriana. A expressão das fotoliases foi realizada seguindo os seguintes passos: - Uma colônia foi inoculada em 2 ml de meio LB e incubada a 37 °C sob agitação constante por aproximadamente 16 horas.

- A suspensão bacteriana foi transferida para 200 ml de meio LB e mantida a 37 °C sob agitação até atingir D.O. entre 0,4 e 0,6 a 580 nm.

 - A suspensão foi então resfriada em gelo, uma alíquota foi feita sendo este o ponto zero. No restante adicionamos 0,3 mM de IPTG e a expressão seguiu por 16 – 18 h, 27 °C sob agitação constante.

- Passado este tempo, novamente uma alíquota foi feita (ponto pósexpressão) e o restante foi centrifugado por 30 minutos, 8000 rpm, 4 °C.

- O precipitado foi ressuspenso no tampão 0,1 M NaCl, 0,01 M fosfato de potássio, 5 mM 2-mercaptoetanol, pH 7,0, referido como tampão de proteína. No caso de haver necessidade de congelamento, foi adicionado 10 % de glicerol ao tampão. O mercaptoetanol foi adicionado a fim de evitar oxidação das fotoliases, já que sua atividade baseia-se no cromóforo FAD reduzido.

- As bactérias foram sonicadas utilizando o equipamento Branson Digital Sonifier S450D. Foram dados pulsos de 45 segundos com pausa de 30 segundos entre eles. O tempo de sonicação dependia da viscosidade da solução, variando entre 10 e 20 minutos. As bactérias eram deixadas em gelo durante todo o processo, evitando-se assim que a solução esquentasse muito podendo levar à desnaturação das proteínas de interesse. Seguia-se então com centrifugação por 40 minutos 8000 rpm, separando-se em tubos diferentes o sobrenadante e o precipitado. O precipitado era ressuspenso em tampão de proteína acrescido de Ureia 6 M, a fim de solubilizar as proteínas insolúveis.

3.17. Purificação

As proteínas expressas em fusão com a cauda de histidinas foram purificadas de duas formas, tanto aquelas presentes no sobrenadante, como no precipitado. Uma utilizando o kit Ni-NTA Spin Kit (QUIAGEN), neste caso para baixos volumes e, para grandes volumes, utilizando a resina NI-NTA agarose (QUIAGEN). Em ambos os casos foi seguido o protocolo sugerido pelo fabricante.

Após a purificação, as eluições foram analisadas em gel de poliacrilamida (9 %), O tamanho esperado das proteínas era: CPDphr – aproximadamente 62 kDa, CPDphr+GFP – aproximadamente 90 kDa e 6-4phr – aproximadamente 64kDa.

4. Resultados

4.1. Respostas celulares frente aos danos genotóxicos

4.1.1. Morte Celular

Uma das características mais marcantes da síndrome XP é sua elevada fotossensibilidade (ANDRESSOO e HOEIJMAKERS, 2005). No entanto a maioria dos estudos havia sido feita com radiação UVC ou UVB, e neste trabalho testamos o comportamento dessas células após irradiação com UVA. Deste modo poderíamos verificar a relevância de lesões como dímeros de pirimidina (CPDs e (6-4)PPs) em relação aos danos provocados por reações oxidativas, que são reparados principalmente pelo reparo por excisão de bases (BER), mecanismo ao qual as células XP são proficientes (PERDIZ *et al.* 2000).

Primeiramente analisamos a porcentagem de células em sub-G1, que representa células que sofreram fragmentação do DNA após um determinado estresse e, assim, consequente morte celular por apoptose. Nestes experimentos, as células MRC5 e XP12BE (XP-A) foram irradiadas com doses crescentes de UVA. As células foram incubadas em meio completo por 72 horas. Após esse período, foram feitas as análises de fragmentação do DNA por citometria de fluxo. Os histogramas apresentados na figura 13 são representativos dos dados obtidos.



Quantidade de fluorescência (DNA)

Figura 13 - Análise de morte celular pela proporção de células em sub-G1 após tratamento com doses crescentes de radiação UVA. As células MRC5 e XP12BE (XP-A) foram analisadas por citometria de fluxo 72 h pós-irradiação. O eixo x representa a quantidade de DNA e o eixo y o número de eventos. A população destacada em vermelho representa a porcentagem de células em sub-G1, indicativo de morte celular.

Um resumo da análise dos dados é apresentado no gráfico da figura 14, o qual mostra os resultados obtidos em cinco experimentos independentes das porcentagens de células em sub-G1 em relação à dose de UVA.



Figura 14 – Células deficientes em NER são mais sensíveis à irradiação com UVA que células proficientes. Células foram irradiadas com doses crescentes de radiação UVA, coletadas após 72 h. Análise por citometria de fluxo. Barras de erro referem-se a cinco experimentos independentes com XP12BE e três com MRC5. *p<0,05; **p<0,01 – Teste ANOVA. Asteriscos referem-se à diferença significativa entre as células XP-A e MRC5 na mesma condição.

A análise dos dados deixa claro que as células proficientes em reparo (MRC5) foram mais resistentes à radiação UVA em comparação com as células deficientes em reparo (mutadas no gene *XPA*), uma vez que apresentaram menor número de células em sub-G1. Esse resultado pode ser indicativo da produção de fotoprodutos (CPD e (6-4)PP) no DNA das células irradiadas com radiação UVA.

4.1.2. Sobrevivência Clonogênica

Realizamos também experimentos de sobrevivência clonogênica, que confirmaram que as células XP-A são mais sensíveis à radiação UVA (Figura 15).



Figura 15 – Células XP-A são mais sensíveis à irradiação com UVA que células MRC5. Mil e quinhentas células foram irradiadas com doses crescentes de UVA e incubadas a 37 °C por 7 – 14 dias em meio completo. Foram contados os números de colônias formadas. Barras de erro referem-se a cinco experimentos independentes. * p<0,05 - Teste ANOVA. Asteriscos referem-se à diferença significativa entre as células XP-A e MRC5 na mesma condição e em relação ao controle.

A diferença de sobrevivência entre as duas linhagens celulares é mais clara e significativa nas maiores doses de radiação UVA. Os dados confirmam que o NER, deficiente nas células XP-A, participa no reparo de lesões no DNA induzidas pela radiação UVA.

4.2. Detecção dos fotoprodutos com anticorpos específicos (anti-CPD, anti-6-4PP e anti-Dewar)

Experimentos de imuno *slot-blot* foram realizados a fim de confirmar a indução de lesões CPDs e (6-4)PPs após exposição das células proficientes e deficientes em NER à radiação UVA. Quando necessário como controle positivo ou negativo, as células foram também irradiadas com UVC ou UVB. Para detecção das lesões CPD e (6-4)PP, as células foram irradiadas com 120 kJ/m² de UVA. A indução desses fotoprodutos por estas fontes artificiais de radiação UV é apresentada nas figuras 16 e 17, respectivamente:





Figura 16 – Detecção e quantificação da lesão tipo CPD pelo uso de anticorpo específico. A) Detecção através de imuno *slot-blot* e B) Quantificação das lesões em células irradiadas com 120 kJ/m² de UVA ou 2,5 kJ/m² de UVB + 120 kJ/m² de UVA (controle positivo). Na figura estão indicadas as células empregadas e a quantidade de DNA aplicada na membrana. Razão - amostra irradiada em relação ao zero (0).





Figura 17 - Detecção e quantificação da lesão tipo (6-4)PP pelo uso de anticorpo específico. A) Detecção através de imuno *slot-blot* e B) Quantificação em células irradiadas com 120 kJ/m² de UVA ou 2,5 kJ/m² de UVB + 120 kJ/m² de UVA (controle positivo). Na figura estão indicadas as células empregadas e a quantidade de DNA aplicada na membrana. Razão - amostra irradiada em relação ao zero (0).

As figuras 16 e 17 mostram claramente a indução das duas lesões tanto em células proficientes como deficientes em NER. O interessante foi que nas células selvagens a detecção das lesões após irradiação com UVA foi menor, possivelmente porque ocorreu reparo durante a irradiação, já que os tempos de irradiação são longos (30 – 40 minutos). Em células proficientes em reparo de DNA, o nível de lesões (6-4)PP mostrou-se muito baixo, próximo ao controle.

Confirmada a indução da lesão (6-4)PP, o próximo passo foi verificar se ocorre a fotoisomerização desta lesão à Dewar, o que também foi investigado através do uso de anticorpo específico. O experimento foi realizado seguindo as mesmas condições anteriores (120 kJ/m² de UVA), no entanto não detectamos diferenças significativas entre as células não irradiadas e irradiadas e até mesmo entre as células MRC5 e XP12BE, pois a marcação sempre se mostrou próxima aos níveis controles (resultados não mostrados), por este motivo aumentamos a dose para 300 kJ/m² de UVA. O resultado pode ser visualizado na figura 18:





Figura 18 – Detecção e quantificação da lesão tipo Dewar em células XP-A pelo uso de anticorpo específico. A) Detecção através de imuno slot-blot e B) Quantificação em células irradiadas com 300 kJ/m² de UVA e/ou 2,5 kJ/m² de UVB + 300 kJ/m² UVA ou 20 J/m² UVC. As amostras irradiadas com UVB e UVC serviram como controles negativos e as irradiadas com UVB+UVA como controles positivos. Na figura estão indicadas as células empregadas e a quantidade de DNA aplicada na membrana. Razão - amostra irradiada em relação ao zero (0). Em alguns poços não houve fixação da amostra e estes foram excluídos da média (sinalizados pelo asterisco).

Alguns pontos merecem destaque: irradiamos as células com UVB seguida por UVA, pois neste caso temos a formação das lesões (6-4)PP pela UVB e sua fotoisomerização pode ocorrer durante a irradiação com UVA. (CADET *et al.*, 2009). Como podemos ver, nestes pontos houve detecção de alta frequência da lesão Dewar; as amostras irradiadas com UVC e UVB serviram como controles negativos, pois não há nenhum relato da formação de lesão Dewar nesses comprimentos de onda.

Estes resultados em conjunto apontam para a indução destes três tipos de lesões pela radiação UVA.

4.3. Transdução com adenovírus recombinantes expressando as fotoliases

4.3.1. Padronização do Protocolo

Com a confirmação da produção dos dímeros de pirimidina pela radiação UVA, o próximo passo foi verificar qual seria a participação das lesões CPD e (6-4)PP na indução da morte celular. Para tal, células XP-A foram transduzidas com adenovírus recombinantes para a expressão da CPD-fotoliase ou da (6-4)-fotoliase.

Primeiramente, testamos qual seria a concentração de adenovírus necessária para gerar uma resposta significativa (redução de morte celular) após irradiação com UVA. Na figura 19 temos células XP-A transduzidas com 0,25, 0,5, 1 ou 2 µl de AdCPDphr, irradiadas com 10 ou 20 kJ/m² de UVA e colocadas no escuro ou no claro por 60 minutos. Seguimos o protocolo de trabalhos anteriores realizados no laboratório (CHIGANÇAS *et al.*, 2004; LIMA-BESSA *et al.*, 2008).



Figura 19 – Transdução de células deficientes em NER (XP-A) com diferentes volumes de AdCPDphr. As células foram posteriormente irradiadas com 10 ou 20 kJ/m² de UVA e submetidas a 60 minutos de fotorreativação. Parte das placas foi mantida no escuro, servindo como controle. Após 72 horas, foi feita a análise por citometria de fluxo. As barras de erro referem-se às duplicatas. Este experimento foi realizado com outra linhagem de XP-A, a XP12RO, por este motivo as doses utilizadas foram menores que as dos experimentos anteriores e posteriores.

Foi surpreendente verificar uma morte celular tão acentuada quando as células eram expostas à luz visível, já que empregamos a mesma metodologia utilizada por Lima-Bessa e colaboradores (2008) com a diferença que nesse trabalho as células foram irradiadas com radiação UVC.

Considerando-se:

 o fato de estarmos fotorreativando em meio de cultura completo o qual pode conter fotossensibilizadores em sua composição; a demonstração por Girard e colaboradores (2008) que em células irradiadas com UVA em meio MEM completo a produção de espécies reativas de oxigênio é mais pronunciada quando comparado às células irradiadas em PBS, sendo que esta produção era consideravelmente diminuída quando eram adicionados ao meio "sequestradores" de espécies reativas como o NAC (Nacetil-L-cisteína);

• que não somente a UVA como também a luz visível pode levar à fotoexcitação desses fotossensibilizadores, levando à produção de espécies reativas (RÜNGER *et al.*, 2000);

 e que a morte celular também foi verificada nas células não irradiadas em nossos experimentos,

decidimos testar diferentes tempos de iluminação (15, 30 e 60 min) e verificar se havia alguma diferença entre a iluminação realizada em meio de cultura completo ou em PBS (Figura 20). Não houve irradiação prévia com UV, mas as células foram mantidas em PBS, no fluxo e no escuro, pelo tempo equivalente a maior dose de UVA utilizada, antes de serem iluminadas.





Figura 20 – Teste de iluminação em PBS ou meio DMEM completo. Células A) XP-A ou B) MRC5 iluminadas em PBS não apresentam diferenças significativas na morte celular entre o grupo mantido no escuro e no claro em diferentes tempos de iluminação.

Claramente, pudemos constatar a diferença entre iluminação em meio DMEM completo ou em PBS nas células XP-A. Enquanto as células mantidas no claro em meio completo apresentaram de fato um aumento da morte celular com o aumento do tempo de iluminação, o mesmo não foi verificado para aquelas iluminadas em tampão PBS, nas quais não houve diferenças significativas entre as células mantidas no claro ou no escuro. Curiosamente, não encontramos diferenças nas células MRC5 entre iluminação em meio DMEM completo ou PBS.

Para explicar esses dados e as diferenças com resultados prévios (LIMA-BESSA *et al.*, 2008), supomos que de alguma forma o tempo longo de irradiação com UVA (cerca de 40 minutos em PBS) parece sensibilizar as células XP-A para a iluminação posterior com luz visível na presença de meio completo. Os experimentos seguintes foram todos realizados em PBS.

4.3.2. Quantificação de lesões em células transduzidas

Antes de verificar os efeitos genotóxicos nas células transduzidas com os adenovírus, verificamos se havia uma diminuição na detecção de lesões na presença das fotoliases. Para tal, conduzimos experimentos de imuno *slot-blot.* As células eram transduzidas com o AdCPDphr ou Ad6-4phr, irradiadas com UVA e fotorreativadas. Em seguida o DNA genômico era extraído. Na figura 21, temos a detecção destas lesões em células transduzidas com AdCPDphr.





Figura 21 – Detecção das lesões tipo CPD em células transduzidas com AdCPDphr. Legenda: 0 ou 120 – dose de UVA em kJ/m²; 30 ou 60 – tempo de fotorreativação em minutos; C ou E – mantidas no claro ou no escuro durante a fotorreativação; V – células transduzidas com AdCPDphr. A) Detecção das lesões; B) Quantificação.

Nestes experimentos, a presença da CPD-fotoliase reduziu o número de lesões nas células irradiadas. O mais interessante, foi que o reparo ocorreu mesmo naquelas células que foram mantidas no escuro durante a fotorreativação (120 60 E V). Possivelmente, o tempo de irradiação é suficiente para que as fotoliases sejam ativadas e reparem estes danos durante a irradiação, logo após sua formação. Ambas as fotoliases contêm FAD como cofator catalítico, o qual absorve principalmente em 360 nm (SANCAR, 2008). Por este motivo, é possível que a fotoliase possa estar sendo ativada tanto pela radiação UVA como pela luz visível, já que essa lâmpada emite também um pouco nesta faixa (ver espectro figura 10).

A expressão da CPD-fotoliase reduziu para níveis quase basais a quantidade de CPDs em células irradiadas e em todas as condições de fotorreativação.

Quando utilizamos os Ad6-4phr para transduzir as células XP-A, verificamos um padrão semelhante de reparo ao verificado nas células transduzidas com o AdCPDphr (Figura 22).




Figura 22 - Detecção das lesões tipo (6-4)PP em células transduzidas com Ad6-4phr. Legenda: 0 ou 120 – dose de UVA em kJ/m²; 30 ou 60 – tempo de fotorreativação em minutos; C ou E – mantidas no claro ou no escuro durante a fotorreativação; V – células transduzidas com Ad6-4phr. A) Detecção das lesões; B) Quantificação.

Esses dados em conjunto, confirmam os dados obtidos da produção das lesões CPD e (6-4)PP pela radiação UVA e que a detecção das mesmas diminuiu na presença das fotoliases, até mesmo quando as células foram mantidas no escuro após a irradiação. Nos próximos experimentos mantivemos apenas 30 minutos de iluminação para estudos de fotorreparo, uma vez que este tempo mostrou-se suficiente.

4.3.3. Efeitos genotóxicos da radiação UVA em células transduzidas.

Sabendo-se que há formação de dímeros de pirimidina pela radiação UVA, o próximo passo foi verificar a importância relativa da lesão CPD e (6-4)PP na redução de sobrevivência das células deficientes em reparo.

Para tal, transduzimos as células com o AdCPDphr e/ou Ad6-4phr, irradiamos com 120 ou 300 kJ/m²de UVA ou 100J/m² de UVB, mantivemos no escuro ou no claro por 30 minutos e incubamos por 72 h antes de coletá-las para análise por citometria de fluxo. Por este protocolo pretendíamos verificar se com a expressão das fotoliases ocorreria uma redução da morte celular, confirmando a participação dos dímeros de pirimidina na indução de apoptose pela radiação UVA. Histogramas representativos de cada condição são mostrados nas figuras 23, 24 e 25.



Figura 23 – Morte celular induzida por UVA depende de lesões tipo CPD e (6-4)PP. Células não transduzidas ou transduzidas com os adenovírus foram irradiadas com 120 kJ/m² de UVA, posteriormente mantidas no claro ou escuro por 30 minutos. A expressão das fotoliases reduziu a porcentagem de células em Sub-G1.

Claramente houve uma redução da morte celular após transdução das células com ambos os adenovírus, nas células XP-A irradiadas com 120 kJ/m² de UVA.



Figura 24 – Participação mínima dos dímeros de pirimidina em células XP-A irradiadas com 300 kJ/m² de UVA. Células não transduzidas ou transduzidas com os adenovírus foram irradiadas com 300 kJ/m² de UVA, posteriormente mantidas no claro ou escuro por 30 minutos.

Quando as células foram irradiadas com 300 kJ/m² de UVA, além da acentuada morte celular, não conseguimos distinguir as fases do ciclo celular. Quando as células foram transduzidas, apesar de não ter havido uma redução

significativa da morte celular, houve uma melhora no ciclo, indicada pela distinção dos picos G1 e G2/M. Curiosamente, não verificamos efeito aditivo com o uso concomitante dos dois adenovírus.

Em ambos os tratamentos, não houve diferenças significativas entre as células mantidas no claro ou no escuro, dando maior suporte aos nossos dados de imuno slot-blot de que há ativação das fotoliases durante a irradiação.



Figura 25 – Redução significativa da morte celular em células XP-A expressando as fotoliases e mantidas no claro por 30 minutos. Células não transduzidas ou transduzidas com os adenovírus foram irradiadas com 100 J/m² de UVB, posteriormente mantidas no claro ou escuro por 30 minutos.

Como controle do experimento, irradiamos as mesmas células com radiação UVB, para confirmarmos que as células estavam bem transduzidas e os vírus estavam ativos. Como o tempo de irradiação com UVB é curto e não há ativação das fotoliases nesta faixa da radiação UV, era esperado ocorrer reparo somente no grupo de células mantido no claro. Na figura 26, temos a média de todos os experimentos realizados para todas as condições citadas anteriormente.



Figura 26 – Participação dos dímeros de pirimidina na morte celular de células XP-A irradiadas com UVA ou UVB. Barras de erro referem-se a três experimentos diferentes. * p <0,05; ** p<0,01 - Teste ANOVA. Asteriscos referem-se à redução significativa da morte celular nas células transduzidas em comparação com as não transduzidas na mesma condição. Legenda: 0, 120 ou 300 – dose de UVA em kJ/m²; 100 – dose de UVB em J/m²; C ou E – mantidas no claro ou no escuro por 30 minutos durante a fotorreativação.

Pelo gráfico podemos observar que houve uma redução da morte celular quando as células foram irradiadas com 120 kJ/m² de UVA, tanto aquelas mantidas no claro, como no escuro. O mesmo foi observado para as células

irradiadas com 100 J/m² de UVB, porém somente naquelas mantidas no claro. Não houve diferenças significativas no reparo das células irradiadas com 300 kJ/m² de UVA.

Os efeitos positivos das fotoliases também puderam ser verificados por sobrevivência clonogênica, onde as células irradiadas com 40 kJ/m² e transduzidas com as fotoliases tiveram um aumento significativo na sobrevivência (Figura 27).



Figura 27 – Aumento da sobrevivência nas células XP-A expressando as fotoliases e irradiadas com 40kJ/m² de UVA. * p <0,05. Teste ANOVA. Asteriscos referem-se ao aumento significativo da sobrevivência nas células transduzidas em relação ao controle sem fotoliase na mesma condição. Legenda: 0, 20 ou 40 – dose de UVA em kJ/m²; C ou E – mantidas no claro ou no escuro por 30 minutos durante a fotorreativação.

4.4. Expressão de Fotoliases em Sistemas Bacterianos

Durante a iniciação científica, conseguimos obter as construções

pProEx-(6-4) e pProEx-CPD-GFP. No entanto, não conseguimos padronizar um protocolo de expressão e purificação. As proteínas eram expressas somente na forma insolúvel e não obtivemos sucesso em purificá-las a partir de corpos de inclusão. Nosso principal interesse é a obtenção das duas fotoliases na forma ativa, pois pretendemos empregar a atividade de ambas em estudos posteriores. No entanto, quando a proteína encontra-se em corpos de inclusão, para que esta possa ser purificada, ela precisa passar por um processo de solubilização com agentes desnaturantes. O processo de refolding é extremamente complicado e sua eficiência não é muito alta, ou seja, era improvável que iríamos conseguir as proteínas ativas após esse processo (YASUKAWA et al., 1995; LILIE et al., 1998). Um dos objetivos do projeto de mestrado foi então tentar expressá-las na forma solúvel de modo a facilitar a purificação.

Visando aumentar a expressão das proteínas alvo na forma solúvel, decidimos fazer co-expressão com chaperonina (E. coli cepa BL21). A expressão simultânea de chaperoninas tem sido relatada para se aumentar a solubilidade de proteínas recombinantes (YASUKAWA et al., 1995). As chaperoninas têm um importante papel fisiológico no enovelamento de proteínas e esta propriedade tem sido explorada para evitar a formação de corpos de inclusão (HARTL e HAYER-HARTL, 2002). No entanto, não obtivemos resultados positivos, pois não verificamos a expressão de nenhuma das fotoliases, somente da chaperonina, confirmada pelo peso molecular. Também fizemos algumas mudanças nas condições de expressão visando obter ao menos fração das proteínas na forma solúvel, mas não obtivemos resultados positivos.

Por sugestão do Prof. Dr. Jan Hoeijmakers e Prof. Dr. Andre Eker (Erasmus MC, Rotterdam, Holanda - comunicação pessoal), ambos com experiência com essas fotoliases e na expressão destas enzimas, decidimos testar outro sistema de expressão e, portanto, reiniciamos os experimentos visando obter as construções no vetor pMAL. Este vetor tem a vantagem de expressar a proteína em fusão com a proteína MBP (*Maltose-Binding Protein*), codificada pelo gene *malE*, a qual tem demonstrado melhorar a tradução, aumentar a solubilidade das proteínas de interesse além de facilitar a purificação (WALKER *et al.*, 2010). Segundo os pesquisadores holandeses essas construções geram produtos solúveis. É importante salientar que por acordos com outros laboratórios (japoneses) esses pesquisadores não puderam nos disponibilizar estes plasmídeos. No entanto, uma das limitações do vetor pMAL é seu número restrito de sítios de restrição para inserção do gene de interesse. São apenas sete, sendo que 3 deles também estão presentes nos cDNAs das fotoliases.

Até o momento não tivemos sucesso na obtenção das construções no vetor pMAL tanto pela via de subclonagens intermediárias como via PCR. Obtivemos apenas as construções pProEX(6-4) (figura 28) e pBCCPD (figura 29), confirmadas por sequenciamento e digestão com as enzimas necessárias para inserção no próximo vetor (ver figura 11).



Figura 28 – Construção pProEX(6-4). A) Raia 1 – pProEX vazio; Raias 2 e 3 – vetor pProEx ligado ao cDNA da 6-4-fotoliase. A ligação foi confirmada também por sequenciamento e B) digestão com as enzimas Kpn I e Sal I. Raia 1 - Marcador 1 Kb Plus e raia 2 – cDNA da (6-4)-fotoliase em destaque.



Figura 29 - Construção pBCCPD. A) Raia 1 - pBC vazio; Raias 2 a 4 - vetor pBC ligado ao cDNA da CPD-fotoliase. A ligação foi confirmada também por sequenciamento e B) digestão com as enzimas Xho I e Not I. Raia 1 – Marcador 1 Kb Plus e raia 2 – cDNA da (CPD)-fotoliase em destaque.

Os cDNAs amplificados continham trocas de aminoácidos que alteravam o PI das proteínas, podendo afetar em sua estrutura terciária e, consequentemente, em sua função. A amplificação deverá ser refeita.

Durante um congresso, o Prof. Dr. Carlos Menck, conversou com pesquisador de um grupo da Turquia, que também pretende expressar as fotoliases em sistemas bacterianos, e eles sugeriram expressar as fotoliases de

eucariotos em uma cepa de *E.coli* com deleção da fotoliase bacteriana. A hipótese seria que a fotoliase bacteriana poderia estar interferindo na expressão dos genes eucariotos, além da proteína bacteriana ser um possível contaminante na preparação das fotoliases. Fizemos a expressão, seguindo o protocolo do grupo holandês, nesta nova cepa e utilizando as construções antigas (pProEx). Conseguimos uma expressão baixa, no entanto foi possível purificar a fração insolúvel (Figuras 30 e 31).



Figura 30 – Expressão das fotoliases (6-4) e CPD a partir das construções no vetor pProEX, transformadas na cepa UNC523. Raia 1 – Marcador BenchMark Protein Ladder (INVITROGEN); Raias 2 e 6 – Ponto zero; Raias 3 e 7 – Ponto pós expressão; Raias 4 e 8 – Fração solúvel; Raias 5 e 9 – Fração insolúvel.



Figura 31 – Purificação da (6-4)-fotoliase. Raia 1 – Marcador BenchMark Protein Ladder (INVITROGEN); Raias 2 e 8 – Proteínas que não se ligaram à resina; Raias 3 -7 e 9 - 14 – eluições com concentrações crescentes de imidazol.

5. Discussão

5.1. Efeitos citotóxicos da radiação UVA em fibroblastos humanos

Diversos motivos têm colocado a radiação solar em maior evidência nos últimos anos: maior exposição das pessoas ao Sol, devido ao culto à pele bronzeada (causando com isto, também, um aumento da procura ao bronzeamento artificial); e também o aumento dos níveis de radiação solar que têm atingido a superfície terrestre, atribuído à depleção da camada de ozônio por atividades antropogênicas.

A maior parte dos estudos científicos tem sido realizada com a radiação UVC. Entretanto tal radiação é bloqueada na estratosfera, não exercendo, portanto, grande influência sobre os seres vivos. Da radiação UV que atinge a superfície terrestre, 5% corresponde à radiação UVB, e o restante à UVA (BESARATINIA *et al.*, 2008). Apesar de menos energética, a radiação UVA que atinge a superfície terrestre é 20 vezes mais intensa que a UVB (HUANG *et al.*, 2009), no entanto somente recentemente passou-se a estudar os efeitos desta radiação nos seres vivos.

Sabe-se atualmente que tanto a radiação UVA como a UVB induzem instabilidade genética. A radiação UVA penetra mais eficientemente na pele, atingindo as camadas mais basais onde se situam as células em divisão e as células tronco de pele e apresenta uma maior abundância na superfície terrestre quando comparada à UVB. De fato, existem trabalhos que propõem que a radiação UVA tem papel crucial na fotocarcinogênese (AGAR *et al.*, 2004; HUANG *et al.*, 2009). No entanto, é sugerido que ambas as radiações

Discussão 77

contribuiriam quase que igualmente para a mutagenicidade solar (ROBERT *et al.*, 1996).

É amplamente defendido que as reações de fotossensibilização seriam as responsáveis pelos danos ao DNA mediados pela UVA. Estas reações envolveriam a absorção dos fótons de UVA por cromóforos sensibilizantes. Hoje se sabe que a pele humana é uma fonte abundante de cromóforos com forte absorção na faixa da UVA e luz visível, principalmente na região do azul, como também de fotossensibilizadores endógenos (WONDRAK *et al.* 2005), como as porfirinas, bilirrubinas, flavinas, NAD(P)H, melanina e seus precursores (estes dois últimos atuariam também como antioxidantes), entre outros.

As reações de foto-oxidação podem ser de dois tipos:

 Tipo I – transferência de elétrons de um fotossensibilizador excitado para as bases do DNA ou outra molécula que não o oxigênio. Neste caso, o fóton é absorvido pelo fotossensibilizador, que então danifica diretamente as bases de DNA pela transferência de elétrons.

 Tipo II – transferência de elétrons de um fotossensibilizador excitado para uma molécula de oxigênio, o qual danifica o DNA. Os mecanismos do tipo II diferem pela forma que o oxigênio excitado pode tomar.
O principal mecanismo causa a formação de oxigênio singlete, o qual é altamente reativo e possui longa meia vida. Outros mecanismos podem levar à formação de superóxido ou radical hidroxila, ambos via produção prévia de peróxido de hidrogênio. O radical hidroxila, apesar de ter uma meia vida ou açúcares do DNA com seletividade mínima ou nula, resultando numa variedade de danos às bases, além de quebras na molécula de DNA.

Dentre as bases do DNA mais danificadas, a guanina é a mais susceptível por possuir o menor potencial de oxidação, sendo um excelente substrato para os dois tipos de reação de foto-oxidação (RAVANAT et al., 2001). A lesão mais comumente formada é a 8-oxodesoxiguanina (8-oxodG). Ela pode provocar transversão de G para T pelo emparelhamento errôneo da 8-oxodG com adenina ou ainda transversão de T para G pela incorporação de um 8-oxodGTP oposta à adenina durante a replicação (RIDLEY et al., 2009). É de aceitação geral que existe diferença intra e interindividual na capacidade de reparo desta lesão e isto estaria relacionado com a maior ou menor susceptibilidade ao desenvolvimento de cânceres associados com a produção de EROs.

Neste trabalho confirmamos que as células deficientes em reparo são significativamente mais sensíveis à radiação UVA que as células proficientes, quando analisamos a morte celular após 72 horas da irradiação. Este resultado indica que a ausência de NER tem grande influência na morte celular observada. A sinalização de danos ao DNA é relativamente rápida, portanto os efeitos genotóxicos são rapidamente observáveis.

No experimento de sobrevivência clonogênica (no qual podemos observar repostas mais tardias, já que a análise dos resultados é feita somente 10 à 15 dias após a irradiação), verificamos que até mesmo as células proficientes tiveram uma redução significativa de sobrevivência nas doses de 40 e 80 kJ/m² (por ser uma metodologia mais sensível, as doses utilizadas são menores que aquelas para verificar morte celular por citometria de fluxo).

Além dos danos ao DNA, a radiação UVA é capaz de induzir danos em outras estruturas e moléculas, como membrana plasmática e proteínas. Na membrana, a radiação causa a reação de peroxidação de lipídeos, desestabilizando-a, podendo levar à morte (MOYSAN *et al.*, 1993). Os produtos da peroxidação de lipídeos também têm habilidade de formar adutos mutagênicos no DNA (RIDLEY *et al.*, 2009). Ainda, danos à membrana resultam na liberação de ácido araquidônico e levam à ativação de mensageiros secundários citosólicos e nucleares que ativam os genes de resposta à UV (MATSUMURA e ANANTHASWAMY, 2004).

A radiação UVA pode ainda induzir ligações cruzadas entre proteína e DNA, causar danos oxidativos às proteínas, bloqueando a replicação (GIRARD *et al.*, 2008), entre outros processos celulares como transcrição e reparo devido aos danos às proteínas.

Existe um crescente corpo de evidência que sugere que danos induzidos por UVA não só podem permanecer, mas também ser gerados por períodos prolongados na célula irradiada, tanto em sua progênie quanto nas células vizinhas e tecidos que não foram eles mesmos expostos, devido à produção de EROs e radicais de nitrogênio mesmo após uma única exposição à UVA. Essas mudanças de longo prazo têm a capacidade de causar níveis significativos de danos celulares e, portanto, têm um impacto claro sobre uma célula e em seu potencial para se tornar cancerosa (RIDLEY *et al.*, 2009).

Portanto, quando outras estruturas são danificadas pela radiação UVA, estas podem se sobressair em relação aos danos no DNA, em especial nas células proficientes em reparo (MRC5), resultando numa redução de sobrevivência também nestas células em doses mais altas de UVA. A radiação UV pode gerar diversos danos ao DNA, como quebras simples e duplas, ligações cruzadas entre o DNA e proteínas (SCHUL *et al.*, 2002). No entanto, a maior parte dos danos são os dímeros de pirimidina CPD e (6-4)PP, principalmente nos menores comprimentos de onda (UVB e UVC), como também o fotoisômero Dewar. Estes danos causam grandes distorções na dupla hélice, interferindo em mecanismos vitais como a replicação e a transcrição. Estas lesões podem levar à redução da síntese de RNA, à parada da progressão do ciclo celular e à indução de apoptose. Se persistirem, podem dar origem a mutações genéticas culminando no câncer (FRIEDBERG, 2006).

A grande maioria dos trabalhos com UVA indica que esta radiação produz lesões por reações oxidativas e CPDs na molécula de DNA, sendo que não haveria energia suficiente para a formação da lesão (6-4)PP (DOUKI *et al.* 2003; CADET *et al.* 2005; MOURET *et al.*, 2006). No entanto, foi demonstrado que as lesões CPD são geradas pela absorção direta da radiação UVA pelo DNA (JIANG *et al.*, 2009) e, em 2009, foi demonstrado pelo nosso grupo (SCHUCH *et al.*, 2009) a indução também de lesões (6-4)PP, em plasmídeos irradiados com UVA.

Utilizando a metodologia de imuno *slot-blot*, conseguimos detectar indução de lesões CPD e (6-4)PP nas duas linhagens celulares, porém na MRC5 a detecção foi mínima e no caso do (6-4)PP, praticamente nula. A lesão (6-4)PP é rapidamente reparada por NER, possivelmente por causar uma distorção muito grande na dupla hélice e ser formada principalmente em regiões de DNA *linker*, logo de fácil acesso às proteínas de reparo (RIOU *et al.*, 1999; THOMA, 1999; RIOU *et al.*, 2004; BESARATINIA *et al.*, 2008). Portanto, é possível que o rápido reparo associado ao tempo relativamente longo de

irradiação com UVA expliquem a diferença dos níveis de lesão (6-4)PP nessas duas linhagens. Sendo assim, o uso de células deficientes em NER (célula XP12BE: XP-A) permitiu a detecção mais clara dessa lesão após irradiação com UVA.

Neste trabalho também conseguimos detectar a formação da lesão Dewar nas células XP-A e com a maior dose de radiação UVA (300 kJ/m²). Tanto nas células MRC5 como nas células XP-A irradiadas com 120 kJ/m² de UVA, a marcação pelo anticorpo foi muito semelhante em todas as condições, tanto nas irradiadas como nas não irradiadas, pois quase não há produção da lesão (6-4)PP e, quando há fotoisomerização, a detecção de Dewar é mínima, confundindo-se com o nível controle. Portanto, nossos dados indicam que essas lesões também são induzidas pela radiação UVA no DNA (provavelmente pós fotoisomerização da lesão (6-4)PP) de células, porém em baixa frequência e provavelmente também sujeitas ao rápido reparo por NER.

Estes resultados indicam também que, na ausência de reparo, os dímeros de pirimidina poderiam contribuir com a indução da morte celular observada, principalmente em células XP-A.

Para testar esta hipótese, transduzimos células XP-A com adenovírus recombinantes expressando o gene que codifica para a CPD-fotoliase e/ou 6-4-fotoliase. O intuito foi observar se o fotorreparo destas lesões reduziria a morte celular pós-irradiação com UVA.

Primeiramente foi necessário padronizar o protocolo de irradiação e fotorreativação, além de testar a concentração de vírus necessária para a transdução eficiente das células, acessada pela expressão do gene EGFP, analisada pela fluorescência verde em microscópio de fluorescência (LIMA-

BESSA *et al.*, 2008). As células foram irradiadas em PBS e, para a fotorreativação, o PBS foi trocado por meio DMEM completo e parte das células foram mantidas no claro, parte no escuro por 60 minutos. Foi impressionante verificarmos uma morte celular bastante aumentada naquelas células mantidas no claro, inclusive nas não irradiadas, já que estávamos seguindo o mesmo protocolo testado anteriormente neste laboratório, com a diferença de que o trabalho prévio foi realizado com radiação UVC. A explicação sugerida foi que, devido ao fato do tempo de irradiação com UVA ser significativamente mais longo do que para a irradiação com UVC (dezenas de minutos X segundos), este maior tempo em PBS poderia estar sensibilizando as células.

Para descartar a participação dos adenovírus, células XP-A e MRC5 foram mantidas por 30 minutos em PBS (tempo correspondente à irradiação com 120 kJ/m² de UVA). Posteriormente, parte das células foi mantida no escuro, parte no claro, tanto em PBS como em meio DMEM. O mesmo resultado foi observado para as células XP-A, mas não para a MRC5, onde não houve diferença entre as condições testadas (figura 21).

Girard e colaboradores (2008) demostraram que quando as células eram irradiadas em meio DMEM completo, o qual contêm muitos fotossensibilizadores, em geral os componentes do soro fetal bovino, era detectada uma produção muito maior de radicais livres quando comparada com a irradiação em PBS ou em meio contendo "sequestradores" de espécies reativas.

Estudos indicam a participação da luz visível em vários efeitos biológicos, como eritema, pigmentação e produção de radicais, já que diversos

cromóforos endógenos e exógenos absorvem na faixa do visível. Também foi mostrado que a luz visível induz danos diretos ao DNA via geração de EROs (MAHMOUD *et al.*, 2008). Assim, é provável que nesses experimentos a iluminação em meio DMEM gerou lesões que provocaram a morte principalmente nas células XP-A, indicando também a participação de NER no reparo de lesões geradas por reações oxidativas.

Jaiswal e colaboradores (1998) mostraram deficiência de reparo de lesões oxidativamente geradas em extratos de células XP-A. Tem sido reportado o envolvimento de proteínas de NER com alguns componentes de BER, o que, de forma indireta, dificultaria o reparo de lesões oxidativamente geradas. Para o correto funcionamento da maquinaria de reparo, todas as proteínas participantes devem ser translocadas ao núcleo. Foi observado que algumas proteínas de NER são co-importadas, o que asseguraria a correta localização de proteínas que funcionam na mesma via (KNUDSEN *et al.*, 2009). Podemos hipotetizar o co-transporte de proteínas envolvidas no NER com alguma proteína do BER. Também foi verificado que células XP-A têm capacidade reduzida de reparar lesões Dewar e danos oxidativos na mitocôndria (CLEAVER, 2000).

A padronização do tempo de fotorreativação foi realizada inicialmente pelo método de imuno *slot-blot*, pois o fotorreparo das lesões seria facilmente observado pela redução de marcação pelo anticorpo. Nossos resultados mostraram que não somente as lesões CPD e (6-4)PP foram reparadas pelas respectivas fotoliases, como também esse reparo ocorria mesmo quando estas células eram mantidas no escuro. Isso indica que durante a irradiação com UVA as fotoliases foram ativadas e ao mesmo tempo em que as lesões eram geradas, elas estavam sendo fotorreparadas. Não podemos afirmar se a fotoliase foi ativada pela radiação UVA ou pela luz visível, que também é emitida pela lâmpada de UVA e não é bloqueada pelo filtro utilizado (ver espectro na figura 10).

A maior parte do DNA genômico é compactada em nucleossomos e estes são conectados por DNA *linker* de comprimento variável. Esta compactação tem importante função na regulação da expressão gênica e replicação, como também influencia na acessibilidade de proteínas de reparo ao dano. Foi demonstrado que 75% do dano ao DNA gerado pela radiação UV é reparado imediatamente pelas fotoliases, e o restante das lesões é reparado de 9-12h, quando estão então acessíveis (THOMA, 1999). É provável, portanto, que pela compactação do DNA na cromatina, o fotorreparo observado em nossos experimentos não tenha sido completo em nenhuma condição testada.

Sabendo que a radiação UVA gera lesões no DNA, dentre eles dímeros de pirimidina, o próximo passo foi verificar se a expressão das fotoliases iria reduzir a morte celular nas células deficientes em NER irradiadas com UVA. Caso a ausência de reparo dos dímeros fosse a responsável pela maior sensibilidade das células XP-A, poderíamos estimar a importância relativa das lesões CPD e (6-4)PP.

As células XP-A transduzidas com o AdCPDphr ou Ad6-4phr e irradiadas com 120 kJ/m² de UVA, apresentaram uma redução na porcentagem de células em Sub-G1. Embora esta redução tenha sido maior naquelas células mantidas no claro, esta redução foi também significativa nas células mantidas no escuro, dando suporte aos nossos dados de imuno *slot-blot* e indicando o fotorreparo concomitante com a irradiação com UVA. No entanto, nas células irradiadas com 300 kJ/m² de UVA, não houve diferença significativa entre as células transduzidas com AdCPDphr e/ou Ad6-4phr e as não transduzidas. Uma das nossas hipóteses foi que a geração de danos por reações oxidativas seria muito maior nesta dose em relação à dose anterior, reduzindo a relevância dos dímeros de pirimidina na sinalização para morte celular. No entanto, muitos grupos já apontam para uma maior formação de lesões CPD que lesões oxidativamente geradas pela radiação UVA. Girard e colaboradores (2008), por exemplo, encontraram uma proporção de 1:0,5, respectivamente, destas lesões em fibroblastos humanos irradiados com doses crescentes de radiação UVA. É possível que NER possa estar envolvido no reparo destas lesões geradas por estresse oxidativo, merecendo, portanto, ser mais estudado.

A resposta à radiação UVA depende de vários fatores intra e extracelulares, como a presença de fotossensibilizadores e antioxidantes. A contribuição relativa destes fatores pode influenciar o destino da célula, dependendo de sua natureza e dos níveis de danos aos componentes celulares que não DNA.

Quando irradiadas com a menor dose de UVA, os danos às outras estruturas e moléculas celulares podem ter menor impacto biológico. Neste caso os danos ao DNA se sobressaem, e na presença de reparo, a morte celular pode ser significativamente reduzida, porém não é reduzida pela presença de danos gerados por reações oxidativas. Já com a dose maior, os danos ao DNA passam a ter importância mínima quando comparado aos danos aos outros componentes celulares, não facilmente reparados. Catalgol e colaboradores (2009) verificaram que em fibroblastos humanos irradiados com UVA há um acúmulo de proteínas oxidadas e formação de agregados, levando à perda da atividade do proteassoma. O proteassoma é responsável pela degradação de proteínas não mais necessárias, como aquelas marcadas com ubiquitinas, ou que estão danificadas havendo perda de função, como as proteínas oxidadas. A via de degradação proteassomal é essencial para muitos processos celulares, como ciclo celular, regulação da expressão gênica e respostas ao estresse oxidativo. A inibição desta maquinaria é pró-apoptótica para a maioria dos tipos celulares (ORLOWSKI, 1999).

Em suma, em ambas as doses ocorreram os mesmo processos: danos diretos e indiretos ao DNA; danos às proteínas, incluindo as fotoliases, levando à inibição da maquinaria proteassomal; danos a outras estruturas, como a membrana plasmática e das organelas. No entanto, na maior dose de UVA estes danos foram provavelmente mais relevantes que os provocados pelos fotoprodutos no DNA. O fotorreparo dos dímeros permitiu uma melhor identificação de progressão do ciclo celular, como observado nos histogramas da figura 24, porém outros danos podem ter prevalecido para a ativação da morte celular.

Ainda não existe um consenso sobre a cinética de reparo da lesão Dewar. Alguns grupos dizem que seria a mesma da lesão (6-4)PP (COURDAVAULT *et al.*, 2005), outros que seria intermediária entre CPD e (6-4)PP (PERDIZ *et al.*, 2000), nas células proficientes em NER. Ainda, foi verificado que a (6-4)-fotoliase é capaz de fotorreparar a lesão Dewar, porém somente a lesão T(Dew)C, sendo que o reparo da lesão T(Dew)T é muito ineficiente (GLAS *et al.*, 2009 e 2010). Sendo assim, e como essas lesões são induzidas pela radiação UVA, é possível que parte da morte celular observada seria causada pela falta de reparo desta lesão.

As células irradiadas com 100 J/m² de UVB serviram como controle do experimento. No caso da transdução não estar satisfatória, não haveria fotorreparo ou o mesmo seria baixo, não havendo diferenças significativas em relação às células não transduzidas. Os dados das figuras 25 e 26 indicam que houve expressão das fotoliases e elas estavam ativas, já que houve fotorreparo significativo nas células mantidas no claro após irradiação.

Nos experimentos de sobrevivência clonogênica, verificamos um aumento significativo da sobrevivência nas células transduzidas com as fotoliases na dose de 40 kJ/m². O reparo dos dímeros foi fundamental para a manutenção da integridade das células, indicando que estas lesões possuem um papel importante nos efeitos genotóxicos da radiação UVA, ao menos em doses baixas, nas quais lesões às outras estruturas celulares seriam mínimas.

Resumindo:

Fotoliases na ausência de NER Altas doses – pequeno efeito (se algum) na recuperação de morte celular Médias doses – redução da morte celular inclusive nas células mantidas no escuro Baixas doses – aumento considerável da sobrevivência celular

Figura 32 – Efeito da expressão das fotoliases em células deficientes em NER irradiadas com doses diferentes de UVA.



Figura 33 – Importância relativa dos diversos danos que podem ser causados pela radiação UVA na geração de efeitos citotóxicos em células deficientes em reparo para diferentes doses de UVA.

De um modo geral, nossos dados confirmam que as lesões CPD e (6-4)PP tem relevância biológica na indução de morte celular pela irradiação com UVA. Esse fato é mais marcante a doses baixas de UVA. Por outro lado, não podemos descartar que reações indiretas, envolvendo produto de estresse oxidativo afetando o DNA e outras macromoléculas biológicas, também possam ter ação marcante na indução de morte celular por radiação UVA. Aparentemente esses efeitos são mais claros a doses altas de UVA.

5.2. Expressão das fotoliases em sistemas bacterianos

Há quatro anos estamos tentando expressar estas fotoliases em sistemas bacterianos. Até o momento não obtivemos sucesso na obtenção das construções no vetor pMAL que, provavelmente, é o mais adequado para a expressão destas proteínas.

Como alternativa, tentamos expressá-las em outro vetor (pProEx) utilizando bactérias com deleção da fotoliase bacteriana, a qual poderia estar influenciando na baixa expressão das fotoliases de interesse para este trabalho. Conseguimos expressar a (6-4)-fotoliase e a CPD-fotoliase, mas em ambos os casos a expressão foi baixa, especialmente da segunda, e a quantidade de proteína obtida na purificação foi insatisfatória.

Nosso grupo nunca havia trabalhado com expressão de proteínas em sistemas bacterianos, mas acreditou que isto não seria um grande problema. Podem ter havido dificuldades com a técnica e/ou a origem das fotoliases (eucariotos superiores) utilizadas pode ter dificultado o processo. Seria muito útil produzir estas enzimas em nosso laboratório, pois poderíamos verificar a importância dos dímeros de pirimidina em outros organismos, ampliando nosso conhecimento sobre os efeitos da radiação solar e sobre o funcionamento do fotorreparo.

Conclusão

As conclusões que podemos tirar deste trabalho são:

 Células deficientes em reparo por excisão de nucleotídeos (XP-A) são sensíveis à radiação UVA, em relação às proficientes em reparo;

Foi possível detectar, imunologicamente, a formação das lesões CPD,
(6-4)PP e Dewar nas células XP-A e, em menor escala, nas células MRC5. A diferença entre essas duas linhagens se deve, provavelmente, ao reparo das lesões durante o longo processo de irradiação com UVA;

A transdução de células deficientes em NER com adenovírus recombinantes contendo o gene que codifica para a CPD-fotoliase ou a (6-4)-fotoliase promoveu a redução de lesões detectadas por imuno *slot-blot*, provavelmente devido ao fotorreparo. Mesmo células mantidas no escuro, apresentaram esse fotorreparo indicando a ativação da fotoliase durante a irradiação com UVA. A especificidade das fotoliases confirma a formação de CPD e (6-4)PP pela irradiação de células humanas com radiação UVA;

Células XP-A transduzidas e irradiadas com doses baixas de UVA, tiveram recuperação da sobrevivência, indicando que, neste caso, os dímeros de pirimidina teriam papel fundamental nos efeitos genotóxicos e citotóxicos causados pela radiação UVA. Nas células irradiadas com 120 kJ/m² de UVA a expressão das fotoliases reduziu a morte celular, porém não tão pronunciada como a observada para as células irradiadas com 100 J/m² de UVB. Já nas células irradiadas com 300 kJ/m² de UVA não houve diferencas significativas

entre as células expressando as fotoliases e aquelas onde não há fotorreparo. Estes resultados indicam que nas doses médias e altas outros tipos de lesão ao DNA, que não dímeros de pirimidina, como também às outras estruturas e moléculas celulares seriam relevantes para a indução de morte celular.

Resumo

A radiação ultravioleta (UV) pode ser absorvida por diferentes moléculas celulares, incluindo o DNA no qual provoca distorções estruturais. As lesões mais comuns induzidas pela radiação UV são o ciclobutano de pirimidina (CPD) e o fotoproduto (6-4)-pirimidina-pirimidona [(6-4)PPs]. Estas lesões podem ser reparadas pela fotorreativação, caracterizada por ter uma única proteína (fotoliase) que remove lesões empregando luz visível (320-500 nm) como fonte de energia. Foram identificados dois tipos de fotoliases que diferem por sua especificidade ao substrato: CPD-fotoliase e (6-4)-fotoliase. Um outro mecanismo de reparo é o reparo por excisão de nucleotídeos (NER), um mecanismo que envolve múltiplos passos e proteínas. Enquanto os efeitos genotóxicos da UVC e UVB já estão relativamente esclarecidos e bem aceitos, ainda existem controvérsias sobre a genotoxicidade da radiação UVA, devido ao fato de ser fracamente absorvida pelo DNA. Alguns autores acreditam que os seus principais efeitos são gerados de forma indireta pela produção de espécies reativas de oxigênio enquanto outros acreditam que a UVA pode gerar danos ao DNA de forma direta, provocando a formação de dímeros de pirimidina. O objetivo deste trabalho foi verificar os efeitos genotóxicos da radiação UVA em fibroblastos humanos deficientes e proficientes em NER utilizando adenovírus recombinantes contendo uma ou outra fotoliase para verificar se as lesões CPD e (6-4)PP são geradas pela UVA e se elas teriam alguma importância nas respostas verificadas após irradiação. Foi verificado que as células deficientes no gene XPA são mais sensíveis à radiação UVA quando comparadas às células selvagens. Por meio da detecção imunológica, confirmamos a geração das lesões CPD, (6-4)PP e Dewar, fotoisômero da lesão (6-4)PP, após irradiação com UVA no genoma de células humanas. Empregando vetores adenovirais para transdução de fotoliase específica para lesões tipo CPD ou (6-4)PP, confirmamos que de fato essas lesões são formadas em células humanas deficientes em reparo de DNA após irradiação com UVA. Além disso, esses vírus permitiram verificar a relevância biológica dessas lesões na indução de morte celular em células XP-A irradiadas. De fato, os dados indicam que para doses baixas de radiação UVA essas lesões desempenham um importante papel na indução de morte. Não podemos

descartar, porém, que lesões indiretas (provavelmente geradas por estresse oxidativo) também tenham papel na indução de morte pela radiação UVA, o que parece ser mais importante a doses médias e altas dessa radiação.

Abstract

Ultraviolet radiation (UV) is absorbed by different cellular molecules, including DNA in which induces structural distortions. The most common lesions induced by UV radiation are the cyclobutane pyrimidine (CPD) and the photoproduct (6-4)-pyrimidine-pyrimidone [(6-4)PP]. These lesions can be repaired by the photoreactivation, characterized by a single protein (photolyase) that removes lesions using visible light (320-500 nm) as energy source. Two types of photolyases had been identified that differ by their substrate specificity: CPDphotolyase and (6-4)-photolyase. Another repair mechanism is the nucleotide excision repair (NER), a mechanism that involves multiple steps and proteins. While the genotoxic effects of UVB and UVC are already relatively wellunderstood and accepted, there is still controversy about the genotoxicity of UVA radiation, due to its low absorption by DNA. Some authors believe that the major effects are generated indirectly by the production of reactive oxygen species, while others believe that UVA can cause damage to DNA directly, inducing the formation of pyrimidine dimers. The aim of this study was to assess the genotoxic effects of UVA radiation in human fibroblasts deficient and proficient in NER, using recombinant adenovirus expressing the photolyases to verify if CPDs and (6-4)PPs are generated by UVA and whether they had any importance in the responses observed after irradiation. It was found that cells deficient in the XPA gene are more sensitive to UV radiation compared to wild type cells. By immunological detection, we confirm the generation of CPD, (6-4)PP and Dewar, photoisomer of the (6-4)PP lesion, in the genome of human cells after irradiation with UVA. Using adenoviral vectors for the transduction of photolyases specific for CPD or (6-4)PP lesions, we confirm that in fact these lesions are generated in human cells deficient in DNA repair after irradiation with UVA. Moreover, these viruses allowed us to verify the biological relevance of these lesions in the induction of cell death in irradiated XP-A cells. In fact, our data indicates that for low doses of UVA radiation, these lesions play important roles in the induction of death. We cannot rule out, however, that indirect lesions (probably caused by oxidative stress) could also have a role in the induction of death by UVA radiation, which seems to be more important in intermediate and high doses of this radiation.

Referências Bibliográficas

Agar, N. S., G. M. Halliday, R. S. Barnetson, H. N. Ananthaswamy, M. Wheeler and A. M. Jones "The basal layer in human squamous tumors harbors more UVA than UVB fingerprint mutations: a role for UVA in human skin carcinogenesis." <u>Proc Natl Acad Sci U S A</u> **101**(14): 4954-4959, 2004.

Andressoo, J. O. and J. H. Hoeijmakers "Transcription-coupled repair and premature ageing." <u>Mutat Res</u> **577**(1-2): 179-194, 2005.

Armelini, M. G., K. M. Lima-Bessa, M. C. Marchetto, A. R. Muotri, V. Chigancas, R. A. Leite, H. Carvalho and C. F. Menck "Exploring DNA damage responses in human cells with recombinant adenoviral vectors." <u>Hum Exp Toxicol</u> **26**(11): 899-906, 2007.

Asahina, H., Z. Han, M. Kawanishi, T. Kato, Jr., H. Ayaki, T. Todo, T. Yagi, H. Takebe, M. Ikenaga and S. H. Kimura "Expression of a mammalian DNA photolyase confers light-dependent repair activity and reduces mutations of UV-irradiated shuttle vectors in xeroderma pigmentosum cells." <u>Mutat Res</u> **435**(3): 255-262, 1999.

Besaratinia, A., S. I. Kim and G. P. Pfeifer "Rapid repair of UVA-induced oxidized purines and persistence of UVB-induced dipyrimidine lesions determine the mutagenicity of sunlight in mouse cells." <u>FASEB J</u> **22**(7): 2379-2392, 2008.

Birnboim, H. C. and J. Doly "A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA." <u>Nucleic Acids Res</u> **7**(6): 1513-1523, 1979.

Cadet, J., T. Douki, J. L. Ravanat and P. Di Mascio "Sensitized formation of oxidatively generated damage to cellular DNA by UVA radiation." <u>Photochem</u> <u>Photobiol Sci</u> **8**(7): 903-911, 2009.

Cadet, J., E. Sage and T. Douki "Ultraviolet radiation-mediated damage to cellular DNA." <u>Mutat Res</u> **571**(1-2): 3-17, 2005.

Catalgol, B., I. Ziaja, N. Breusing, T. Jung, A. Hohn, B. Alpertunga, P. Schroeder, N. Chondrogianni, E. S. Gonos, I. Petropoulos, B. Friguet, L. O. Klotz, J. Krutmann and T. Grune "The proteasome is an integral part of solar ultraviolet a radiation-induced gene expression." <u>J Biol Chem</u> **284**(44): 30076-30086, 2009.

Chandrasekhar, D. and B. Van Houten "In vivo formation and repair of cyclobutane pyrimidine dimers and 6-4 photoproducts measured at the gene and nucleotide level in Escherichia coli." <u>Mutat Res</u> **450**(1-2): 19-40, 2000.

Chigancas, V., A. Sarasin and C. F. Menck "CPD-photolyase adenovirusmediated gene transfer in normal and DNA-repair-deficient human cells." <u>J Cell</u> <u>Sci</u> **117**(Pt 16): 3579-3592, 2004.

Cleaver, J. E. "Common pathways for ultraviolet skin carcinogenesis in the repair and replication defective groups of xeroderma pigmentosum." <u>J Dermatol</u> <u>Sci</u> **23**(1): 1-11, 2000.

Costa, R. M., V. Chigancas, S. Galhardo Rda, H. Carvalho and C. F. Menck "The eukaryotic nucleotide excision repair pathway." <u>Biochimie</u> **85**(11): 1083-1099, 2003.

Courdavault, S., C. Baudouin, M. Charveron, B. Canguilhem, A. Favier, J. Cadet and T. Douki "Repair of the three main types of bipyrimidine DNA photoproducts in human keratinocytes exposed to UVB and UVA radiations." <u>DNA Repair (Amst)</u> **4**(7): 836-844, 2005.

de Lima-Bessa, K. M., M. G. Armelini, V. Chigancas, J. F. Jacysyn, G. P. Amarante-Mendes, A. Sarasin and C. F. Menck "CPDs and 6-4PPs play different roles in UV-induced cell death in normal and NER-deficient human cells." <u>DNA Repair (Amst)</u> **7**(2): 303-312, 2008.

Douki, T., A. Reynaud-Angelin, J. Cadet and E. Sage "Bipyrimidine photoproducts rather than oxidative lesions are the main type of DNA damage involved in the genotoxic effect of solar UVA radiation." <u>Biochemistry</u> **42**(30): 9221-9226, 2003.

Friedberg, E. C. "DNA damage and repair." <u>Nature</u> **421**(6921): 436-440, 2003.

Friedberg, E. C. <u>DNA repair and mutagenesis</u>. Washington, D.C., ASM Press, 2006.

Friedberg, E. C., L. D. McDaniel and R. A. Schultz "The role of endogenous and exogenous DNA damage and mutagenesis." <u>Curr Opin Genet Dev</u> **14**(1): 5-10, 2004.

Garinis, G. A., J. Jans and G. T. van der Horst "Photolyases: capturing the light to battle skin cancer." <u>Future Oncol</u> **2**(2): 191-199, 2006.

Girard, P. M., M. Pozzebon, F. Delacote, T. Douki, V. Smirnova and E. Sage "Inhibition of S-phase progression triggered by UVA-induced ROS does not require a functional DNA damage checkpoint response in mammalian cells." <u>DNA Repair (Amst)</u> **7**(9): 1500-1516, 2008.

Glas, A. F., E. Kaya, S. Schneider, K. Heil, D. Fazio, M. J. Maul and T. Carell "DNA (6-4) photolyases reduce Dewar isomers for isomerization into (6-4) lesions." J Am Chem Soc **132**(10): 3254-3255, 2010.

Glas, A. F., S. Schneider, M. J. Maul, U. Hennecke and T. Carell "Crystal structure of the T(6-4)C lesion in complex with a (6-4) DNA photolyase and repair of UV-induced (6-4) and Dewar photolesions." <u>Chemistry</u> **15**(40): 10387-10396, 2009.

Grenfell, J. L., H. Rauer, F. Selsis, L. Kaltenegger, C. Beichman, W. Danchi, C. Eiroa, M. Fridlund, T. Henning, T. Herbst, H. Lammer, A. Leger, R. Liseau, J. Lunine, F. Paresce, A. Penny, A. Quirrenbach, H. Rottgering, J. Schneider, D. Stam, G. Tinetti and G. J. White "Co-evolution of atmospheres, life, and climate." <u>Astrobiology</u> **10**(1): 77-88, 2010.

Halliwell, B. and J. M. C. Gutteridge <u>Free radicals in biology and medicine</u>. Oxford New York, Clarendon Press; Oxford University Press, 1999.

Hanahan, D. "Studies on transformation of Escherichia coli with plasmids." <u>J</u> <u>Mol Biol</u> **166**(4): 557-580, 1983.

Hartl, F. U. and M. Hayer-Hartl "Molecular chaperones in the cytosol: from nascent chain to folded protein." <u>Science</u> **295**(5561): 1852-1858, 2002.

Hoeijmakers, J. H. "Genome maintenance mechanisms for preventing cancer." <u>Nature</u> **411**(6835): 366-374, 2001.

Huang, X. X., F. Bernerd and G. M. Halliday "Ultraviolet A within sunlight induces mutations in the epidermal basal layer of engineered human skin." <u>Am</u> <u>J Pathol</u> **174**(4): 1534-1543, 2009.

Jaiswal, M., L. J. Lipinski, V. A. Bohr and S. J. Mazur "Efficient in vitro repair of 7-hydro-8-oxodeoxyguanosine by human cell extracts: involvement of multiple pathways." <u>Nucleic Acids Res</u> **26**(9): 2184-2191, 1998.

Jans, J., W. Schul, Y. G. Sert, Y. Rijksen, H. Rebel, A. P. Eker, S. Nakajima, H. van Steeg, F. R. de Gruijl, A. Yasui, J. H. Hoeijmakers and G. T. van der Horst "Powerful skin cancer protection by a CPD-photolyase transgene." <u>Curr Biol</u>

15(2): 105-115, 2005.

Javeri, A., X. X. Huang, F. Bernerd, R. S. Mason and G. M. Halliday "Human 8oxoguanine-DNA glycosylase 1 protein and gene are expressed more abundantly in the superficial than basal layer of human epidermis." <u>DNA Repair</u> (Amst) **7**(9): 1542-1550, 2008.

Jiang, Y., M. Rabbi, M. Kim, C. Ke, W. Lee, R. L. Clark, P. A. Mieczkowski and P. E. Marszalek "UVA generates pyrimidine dimers in DNA directly." <u>Biophys J</u> **96**(3): 1151-1158, 2009.

Kasting, J. F. and J. L. Siefert "Life and the evolution of Earth's atmosphere." <u>Science</u> **296**(5570): 1066-1068, 2002.

Knudsen, N. O., S. D. Andersen, A. Lutzen, F. C. Nielsen and L. J. Rasmussen "Nuclear translocation contributes to regulation of DNA excision repair activities." <u>DNA Repair (Amst)</u> **8**(6): 682-689, 2009.

Lilie, H., E. Schwarz and R. Rudolph "Advances in refolding of proteins produced in E. coli." <u>Curr Opin Biotechnol</u> **9**(5): 497-501, 1998.

Mahmoud, B. H., C. L. Hexsel, I. H. Hamzavi and H. W. Lim "Effects of visible light on the skin." <u>Photochem Photobiol</u> **84**(2): 450-462, 2008.

Matsumura, Y. and H. N. Ananthaswamy "Toxic effects of ultraviolet radiation on the skin." <u>Toxicol Appl Pharmacol</u> **195**(3): 298-308, 2004.

Menck, C. F. "Shining a light on photolyases." <u>Nat Genet</u> **32**(3): 338-339, 2002.

Mitchell, J. R., J. H. Hoeijmakers and L. J. Niedernhofer "Divide and conquer: nucleotide excision repair battles cancer and ageing." <u>Curr Opin Cell Biol</u> **15**(2): 232-240, 2003.

Mitra, S., I. Boldogh, T. Izumi and T. K. Hazra "Complexities of the DNA base excision repair pathway for repair of oxidative DNA damage." <u>Environ Mol Mutagen</u> **38**(2-3): 180-190, 2001.

Mouret, S., C. Baudouin, M. Charveron, A. Favier, J. Cadet and T. Douki "Cyclobutane pyrimidine dimers are predominant DNA lesions in whole human skin exposed to UVA radiation." <u>Proc Natl Acad Sci U S A</u> **103**(37): 13765-13770, 2006.

Moysan, A., I. Marquis, F. Gaboriau, R. Santus, L. Dubertret and P. Morliere
"Ultraviolet A-induced lipid peroxidation and antioxidant defense systems in cultured human skin fibroblasts." <u>J Invest Dermatol</u> **100**(5): 692-698, 1993.

Mu, W., D. Zhang, L. Xu, Z. Luo and Y. Wang "Activity assay of His-tagged E. coli DNA photolyase by RP-HPLC and SE-HPLC." <u>J Biochem Biophys Methods</u> **63**(2): 111-124, 2005.

Nadeau, I. and A. Kamen "Production of adenovirus vector for gene therapy." <u>Biotechnol Adv</u> **20**(7-8): 475-489, 2003.

Orlowski, R. Z. "The role of the ubiquitin-proteasome pathway in apoptosis." <u>Cell Death Differ</u> **6**(4): 303-313, 1999.

Perdiz, D., P. Grof, M. Mezzina, O. Nikaido, E. Moustacchi and E. Sage "Distribution and repair of bipyrimidine photoproducts in solar UV-irradiated mammalian cells. Possible role of Dewar photoproducts in solar mutagenesis." <u>J Biol Chem</u> **275**(35): 26732-26742, 2000.

Pfeifer, G. P., Y. H. You and A. Besaratinia "Mutations induced by ultraviolet light." <u>Mutat Res</u> **571**(1-2): 19-31, 2005.

Ravanat, J. L., T. Douki and J. Cadet "Direct and indirect effects of UV radiation on DNA and its components." <u>J Photochem Photobiol B</u> **63**(1-3): 88-102, 2001.

Richardson, R. B. "Ionizing radiation and aging: rejuvenating an old idea." <u>Aging</u> (Albany NY) **1**(11): 887-902, 2009.

Ridley, A. J., J. R. Whiteside, T. J. McMillan and S. L. Allinson "Cellular and sub-cellular responses to UVA in relation to carcinogenesis." <u>Int J Radiat Biol</u> **85**(3): 177-195, 2009.

Riou, L., E. Eveno, A. van Hoffen, A. A. van Zeeland, A. Sarasin and L. H. Mullenders "Differential repair of the two major UV-induced photolesions in trichothiodystrophy fibroblasts." <u>Cancer Res</u> **64**(3): 889-894, 2004.

Riou, L., L. Zeng, O. Chevallier-Lagente, A. Stary, O. Nikaido, A. Taieb, G. Weeda, M. Mezzina and A. Sarasin "The relative expression of mutated XPB genes results in xeroderma pigmentosum/Cockayne's syndrome or trichothiodystrophy cellular phenotypes." <u>Hum Mol Genet</u> **8**(6): 1125-1133, 1999.

Robert, C., B. Muel, A. Benoit, L. Dubertret, A. Sarasin and A. Stary "Cell survival and shuttle vector mutagenesis induced by ultraviolet A and ultraviolet

B radiation in a human cell line." <u>J Invest Dermatol</u> **106**(4): 721-728, 1996.

Runger, T. M. "Role of UVA in the pathogenesis of melanoma and nonmelanoma skin cancer. A short review." <u>Photodermatol Photoimmunol</u> <u>Photomed</u> **15**(6): 212-216, 1999.

Runger, T. M., K. Moller, T. Jung and B. Dekant "DNA damage formation, DNA repair, and survival after exposure of DNA repair-proficient and nucleotide excision repair-deficient human lymphoblasts to UVA1 and UVB." <u>Int J Radiat</u> <u>Biol</u> **76**(6): 789-797, 2000.

Sambrook, J. and D. W. Russell <u>Molecular cloning : a laboratory manual</u>. Cold Spring Harbor, N.Y., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.

Sancar, A. "Structure and function of photolyase and in vivo enzymology: 50th anniversary." <u>J Biol Chem</u> **283**(47): 32153-32157, 2008.

Sanger, F., S. Nicklen and A. R. Coulson "DNA sequencing with chain-terminating inhibitors." <u>Proc Natl Acad Sci U S A</u> **74**(12): 5463-5467, 1977.

Schuch, A. P., R. da Silva Galhardo, K. M. de Lima-Bessa, N. J. Schuch and C. F. Menck "Development of a DNA-dosimeter system for monitoring the effects of solar-ultraviolet radiation." <u>Photochem Photobiol Sci</u> **8**(1): 111-120, 2009.

Schul, W., J. Jans, Y. M. Rijksen, K. H. Klemann, A. P. Eker, J. de Wit, O. Nikaido, S. Nakajima, A. Yasui, J. H. Hoeijmakers and G. T. van der Horst "Enhanced repair of cyclobutane pyrimidine dimers and improved UV resistance in photolyase transgenic mice." <u>EMBO J</u> **21**(17): 4719-4729, 2002.

Tanaka, M., S. Nakajima, M. Ihara, T. Matsunaga, O. Nikaido and K. Yamamoto "Effects of photoreactivation of cyclobutane pyrimidine dimers and pyrimidine (6-4) pyrimidone photoproducts on ultraviolet mutagenesis in SOS-induced repair-deficient Escherichia coli." <u>Mutagenesis</u> **16**(1): 1-6, 2001.

Tanida, H., E. Tahara, M. Mochizuki, Y. Yamane and M. Ryoji "Purification, cDNA cloning, and expression profiles of the cyclobutane pyrimidine dimer photolyase of Xenopus laevis." <u>FEBS J</u> **272**(23): 6098-6108, 2005.

Thoma, F. "Light and dark in chromatin repair: repair of UV-induced DNA lesions by photolyase and nucleotide excision repair." <u>EMBO J</u> **18**(23): 6585-6598, 1999.

Verma, I. M. and N. Somia "Gene therapy -- promises, problems and

prospects." Nature 389(6648): 239-242, 1997.

Walker, I. H., P. C. Hsieh and P. D. Riggs "Mutations in maltose-binding protein that alter affinity and solubility properties." <u>Appl Microbiol Biotechnol</u>2010.

Waterworth, W. M., Q. Jiang, C. E. West, M. Nikaido and C. M. Bray "Characterization of Arabidopsis photolyase enzymes and analysis of their role in protection from ultraviolet-B radiation." <u>J Exp Bot</u> **53**(371): 1005-1015, 2002.

Weber, S. "Light-driven enzymatic catalysis of DNA repair: a review of recent biophysical studies on photolyase." <u>Biochim Biophys Acta</u> **1707**(1): 1-23, 2005.

Wischermann, K., S. Popp, S. Moshir, K. Scharfetter-Kochanek, M. Wlaschek, F. de Gruijl, W. Hartschuh, R. Greinert, B. Volkmer, A. Faust, A. Rapp, P. Schmezer and P. Boukamp "UVA radiation causes DNA strand breaks, chromosomal aberrations and tumorigenic transformation in HaCaT skin keratinocytes." <u>Oncogene</u> **27**(31): 4269-4280, 2008.

Wondrak, G. T., M. K. Jacobson and E. L. Jacobson "Endogenous UVA-photosensitizers: mediators of skin photodamage and novel targets for skin photoprotection." <u>Photochem Photobiol Sci</u> **5**(2): 215-237, 2006.

Yasui, A., A. P. Eker, S. Yasuhira, H. Yajima, T. Kobayashi, M. Takao and A. Oikawa "A new class of DNA photolyases present in various organisms including aplacental mammals." <u>EMBO J</u> **13**(24): 6143-6151, 1994.

Yasukawa, T., C. Kanei-Ishii, T. Maekawa, J. Fujimoto, T. Yamamoto and S. Ishii "Increase of solubility of foreign proteins in Escherichia coli by coproduction of the bacterial thioredoxin." <u>J Biol Chem</u> **270**(43): 25328-25331, 1995.

Yi, Y., C. Yi, L. Qian, L. Min, C. Long, B. Linhan, Y. Zhirong and Q. Dairong "Cloning and sequence analysis of the gene encoding (6-4)photolyase from Dunaliella salina." <u>Biotechnol Lett</u> **28**(5): 309-314, 2006.

Zwick, M. B., L. L. Bonnycastle, K. A. Noren, S. Venturini, E. Leong, C. F. Barbas, 3rd, C. J. Noren and J. K. Scott "The maltose-binding protein as a scaffold for monovalent display of peptides derived from phage libraries." <u>Anal Biochem</u> **264**(1): 87-97, 1998.