LIGIA PEREIRA CASTRO

Caracterização genotípica de pacientes brasileiros com
deficiência em processos de reparo de DNA

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Biotecnologia USP/Instituto Butantan/IPT, para obtenção
de Título de Doutor em Biotecnologia.

Área de Concentração: Biotecnologia

Orientador: Prof. Dr. Carlos Frederico Martins Menck

Co-Orientação: Dra. Veridiana Munford

Versão original

São Paulo

2016

RESUMO

Castro LP. 2016. Caracterização genotípica de pacientes brasileiros com deficiência em processos de reparo de DNA [Tese (Doutorado em Biotecnologia)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2016.

Mutações em genes da via de reparo de DNA por excisão de nucleotídeos estão associados a doenças genéticas raras, como xeroderma pigmentosum (XP), síndrome de Cockayne (CS) e tricotiodistrofia (TTD). Desde que essas doenças foram descritas, o estudo da genética e sua relação com as características clínicas que esses pacientes manifestam têm ajudado na compreensão dos mecanismos envolvidos nos processos de carcinogênese e morte celular. Este trabalho teve como objetivo identificar mutações responsáveis por essas síndromes em pacientes brasileiros. Inicialmente o projeto teve como foco o estudo da comunidade de Araras, no interior de Goiás, onde existe uma das maiores incidências de pacientes XP no mundo. Duas mutações foram identificadas no gene *POLH*, c.764+1G>A (intron 6) e c.C907T [p.R303X] (exon 8) associadas a dois efeitos fundadores independentes. Através do desenvolvimento de um teste específico para essas mutações, dezessete pacientes, entre 10 e 82 anos de idade, além de familiares, foram caracterizados geneticamente, apresentando uma grande heterogeneidade das manifestações clínicas com fenótipos brandos à extremamente agressivos. Através do desenvolvimento de painel genético para genes relacionados a reparo de DNA e sequenciamento de nova geração, este estudo se estendeu a mais dezesseis pacientes de todo o Brasil, incluindo outros grupos de complementação de XP, CS e TTD. Por fim, apresentamos o que se tem descrito atualmente de caracterização genética no Brasil, que somam um total de 80 pacientes. Ainda nesse contexto de caracterização molecular, o estudo do efeito das mutações nos introns 6 e 10 do gene *POLH*, mostrou que as trocas de nucleotídeos em sítio de *splicing* estão afetando o processamento do mRNA desse gene, que codifica a DNA polimerase η (Pol η). Finalmente, também avaliamos as respostas de células de pacientes XP-V (deficientes no gene *POLH*) ao tratamento com o agente genotóxico cisplatina. Foi possível observar que as linhagens deficientes em Pol η são mais sensíveis aos danos induzidos pela cisplatina, encontram problemas na fase G1/S após tratamento com cisplatina e apresentam um aumento de estresse genotóxico, através da marcação *high-level* para histona H2AX fosforilada. Sendo assim, esperamos contribuir para avaliação genética de pacientes com síndromes com deficiências em reparo de DNA, buscando também entender como essas deficiências se relacionam com os fenótipos clínicos.

Palavras-chave: Mutações em genes de reparo de DNA. Xeroderma Pigmentosum. Síndrome de Cockayne. Tricotiodistrofia. XP-V. Cisplatina.

ABSTRACT

Castro LP. Genotypic characterization of Brazilian patients with deficiency in DNA repair processes. [Ph.D. Thesis [Biotechnology]]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2016.

Mutations at DNA repair genes are associated with rare genetic diseases such as xeroderma pigmentosum (XP), Cockayne syndrome (CS) and Trichothiodystrophy (TTD). The road since these diseases had been described into the study of their genetics and the relationship with clinical symptoms has helped the understanding of mechanisms involved in carcinogenesis and cell death processes. This study aimed to identify mutations responsible for these syndromes in Brazilian patients. Initially the project focused on the study of Araras community in the state of Goiás, where we reported one of the densest known areas of XP patients. Two mutations were identified at the *POLH* gene, c.764 + 1G> A (intron 6) and c.C907T [p.R303X] (exon 8), associated with two independent founders effects. With the development of a specific assay for those mutations, seventeen XP patients, from 10 to 82 years old, and their relatives, were genetically characterized, with the patients carrying highly heterogeneous clinical symptoms, from mild to extremely aggressive phenotypes. With the development of a gene panel for DNA repair related genes and next generation sequencing, this study was extended to all over Brazil, including seventeen other patients with XP, CS and TTD phenotypes. We also present a list comprising 80 Brazilian patients genetically characterized for these syndromes. In the context of molecular characterization, we also studied the effects of intron 6 and intron 10 splicing site mutations, detected in XP-V patients, on the differential *POLH* mRNA processing, which normally encodes for DNA polymerase eta (Pol eta). Finally, we evaluated the responses of XP-V primary fibroblasts, from Brazilian patients, after treatment with the genotoxic agent cisplatin. We observed that Pol eta deficient cells were more sensitive to damage induced by cisplatin, as well as encountered problems in the S phase replication after treatment, and presented increased high-level fluorescence for a genotoxic stress marker, the phosphorylated histone H2AX. Therefore, we expect our work contributes to the genetic evaluation of patients with DNA repair deficient syndromes, also trying to understand how these deficiencies relate to clinical phenotypes.

Keywords: Mutations in DNA repair genes. Xeroderma pigmentosum. Cockayne syndrome. Trichothiodystrophy. XP-V. Cisplatin.

CAPÍTULO 1 - INTRODUÇÃO E OBJETIVOS GERAIS

1.1 INTRODUÇÃO GERAL

A doença Xeroderma Pigmentosum (XP) é uma síndrome genética rara em que os pacientes possuem uma alta predisposição ao câncer de pele, principalmente carcinoma e melanoma, induzido pela exposição à luz do sol, devido ao componente da radiação ultravioleta (UV). A incidência estimada da doença é de 1/1.000.000 nos EUA e Europa, em alguns lugares, no entanto, a incidência é mais alta devido a efeitos fundadores, tais como 1/100.000 no Japão e 1/50.000 na África do Norte e Oriente Médio (1). A síndrome foi originalmente documentada pelo dermatologista húngaro Moritz Kaposi e seu orientador austríaco Ferdinand von Hebra na Universidade de Viena (2). Neste trabalho a síndrome é descrita em 4 pacientes com Xeroderma ou, como denominaram, Síndrome da “pele de pergaminho”, em que descrevem; uma pigmentação atípica da pele, algumas lesões com caráter de fissura, além de seca, envelhecida e com pequenas veias dos olhos e da pele dilatadas (telangectasia).

Aos poucos as vias moleculares e os mecanismos de reparo de DNA envolvidos com a síndrome foram sendo elucidados. Em 1949 Albert Kelner e Renato Dulbecco descobrem que bacteriófagos eram capazes de sobreviver ao efeito da irradiação UV quando tratados com luz visível (3, 4). Esse efeito foi chamado de fotorreativação e atualmente sabe-se que essa é uma via de reparo de DNA, presente até mamíferos placentários, dependente de uma enzima chamada fotoliase, capaz de desfazer a ligação entre duas pirimidinas adjacentes, utilizando como energia um fóton de luz azul (350 a 450nm), e retornar a estrutura original da dupla hélice (5). Curiosamente, a descoberta foi acidental e os pesquisadores a descobriram quando as placas contendo bacteriófagos irradiados foram esquecidas ao lado de uma janela com passagem de luz visível. Nos dias seguintes o resultado inesperado de uma curva de sobrevivência maior que a observada até aquele momento (6). Somente em 1978 Sancar identifica e clona o gene da fotoliase (7).

Em 1963, Philip Hanawalt e seu aluno David Pettijohn demonstram em bactéria uma outra via de reparo independente da luz visível (8). Cinco anos mais tarde o pesquisador americano James Cleaver identifica que a síndrome XP estava diretamente relacionada à incapacidade das células destes pacientes em reparar lesões em seu DNA (9). Em seguida, constatou-se que células de pacientes XP, altamente sensíveis à luz UV, apresentam elevados níveis de mutagenicidade após irradiação, correlacionando, assim, o fenótipo celular, a

instabilidade gênica e o elevado índice de tumores de pele nos pacientes (10, 11). Além da alta frequência de tumores, cerca de 20 a 30% dos pacientes XP apresentam graves problemas neurológicos, caracterizados por morte neural prematura, progressiva deficiência intelectual mental ou mesmo problemas de desenvolvimento (12, 13).

1.1.1 O DNA e sua estabilidade

Como reconhecido por Francis Crick em 1978, 25 anos após reportar a estrutura química e física da molécula de DNA; *“We totally missed the possible role of ... [DNA] repair although ... I later came to realise that DNA is so precious that probably many distinct repair mechanisms would exist”* (14). Dado o alto grau de conservação de alguns mecanismos de reparo de DNA é de se ressaltar a grande importância da manutenção da integridade física e biológica dessa molécula (6, 15).

A estrutura química do DNA, em solução aquosa, está constantemente sendo “atacada” por agentes endógenos e exógenos (16). As bases nitrogenadas da dupla hélice podem sofrer, por exemplo, alterações espontâneas com desaminações, perdas de base e desemparelhamentos, ou ser atacada por radicais livres capazes de induzir lesões do tipo bases oxidadas. A radiação UV é um dos principais fatores externos capazes de causar importantes lesões no DNA e as principais lesões induzidas por este agente são os fotoprodutos CPD e 6-4PP, em que duas pirimidinas adjacente absorvem energia e se ligam covalentemente distorcendo a dupla fita (17).

Essas lesões, se não reparadas, podem comprometer o correto processamento das polimerases durante a replicação e transcrição, e desencadear importantes processos de carcinogênese, envelhecimento e morte celular (6, 12). Assim, apesar da grande quantidade diária de lesões, o DNA é uma macromolécula extremamente conservada e protegida. Além de estar empacotado, o que dificulta o acesso dessas moléculas reagirem com o DNA, “sequestradores” estão constantemente removendo essas ameaças. Somado a esses eventos, a evolução selecionou múltiplos e, muitas vezes redundantes, mecanismos de respostas aos danos induzidos no DNA (10).

1.1.2 O reparo por excisão de nucleotídeo – NER

Uma importante via é o reparo por excisão de nucleotídeos (NER do inglês *Nucleotide Excision Repair*), o qual remove lesões que distorcem a dupla hélice do DNA (15). Dentre os diversos mecanismos de reparo, o NER é um dos mais versáteis, pois reconhece uma grande variedade de lesões. A principal lesão reconhecida por esse mecanismo são os adutos induzidos pela radiação UV. Essa via de reparo envolve basicamente o reconhecimento, abertura e estabilização das proteínas de reparo no local da lesão, uma dupla incisão a 5' e a 3' da lesão, a remoção dos oligonucleotídeos contendo a lesão, a síntese de DNA na lacuna formada e ligação do DNA reparado.

Todo esse mecanismo envolve cerca de 30 proteínas e promove a excisão de aproximadamente 30 pares de base englobando a região da lesão. O primeiro passo da via é o reconhecimento do local da lesão, o qual pode ocorrer em diferentes momentos na célula; durante o processo de transcrição (TCR) ou no genoma global (GGR), como mostra a figura 1.

A via TCR remove especificamente lesões da fita de DNA que está sendo transcrita. Devido ao impedimento físico da distorção causada pela lesão, a RNA pol II não consegue progredir na transcrição dos genes, o que sinaliza o recrutamento das proteínas da via de NER (18). Esse reparo deve ser imediato, caso contrário toda a maquinaria celular dependente dos genes à serem transcritos fica comprometida, o que pode desencadear o processo de senescência ou morte celular. Em seguida, as proteínas CSA (ERCC8) e CSB (ERCC6) são recrutadas para o local da lesão. A proteína CSB (168 kDa) é um membro da família SWIS/SNF ATPase DNA-Dependente, um grupo de proteínas associadas ao remodelamento de cromatina, transcrição e reparo (19). Assim, CSB está constantemente ligada à RNA polimerase durante a etapa de alongação da transcrição estimulando sua atividade e garantindo que o DNA esteja descompactado durante a transcrição do gene. Essa ligação se torna mais forte quando a polimerase não consegue continuar esse processo frente a um dano ativando a cascata da via TCR. Uma das hipóteses é que a forte interação de CSB à polimerase faz com que essa fique para trás (*backtracking*), deslocando-a e possibilitando o acesso das outras proteínas de reparo (20). Conforme a polimerase regressa na fita as proteínas RPA se ligam na fita simples de DNA evitando sua renaturação e sinalizando o recrutamento de outras proteínas como XPA para o local da lesão. CSB também sinaliza o recrutamento da proteína CSA para o núcleo. Essa proteína tem atividade de E3 ubiquitina

ligase com sete motivos WD40, importante para interação com outras proteínas e formação de um complexo multiproteico (DDB1, Cul4A e Roc1) (21).

Em contraste, a via GGR ocorre por todo o genoma da célula, incluindo a fita que não está sendo transcrita e é ativada quando o dímero DDB1-DDB2-CUL4A e o complexo proteico XPC-hHR23B-CEN2 reconhecem a distorção na dupla fita (22). Uma das hipóteses é que a proteína XPC possui afinidade ao DNA com e sem lesão, porém no DNA com lesão essa afinidade é maior e o tempo de interação com o *motif* β -hairpin da proteína e os nucleotídeos alterados é o que estabiliza o complexo na região a ser reparada (23).

Apesar das diferentes formas de reconhecimento de cada via (TCR e GGR) os passos subsequentes convergem para uma via única com o mesmo *core* proteico, que envolve o recrutamento do fator de transcrição TFIIH. Associado à esse fator de transcrição, as DNA-helicases dependentes de ATP, XPB (3'-5') e XPD (5'-3') possuem um papel de desenrolar a dupla fita que fica recoberta pelas proteínas RPA (*Replication protein A*) evitando sua renaturação. Tanto RPA, quanto XPA estão envolvidas na estabilização da "bolha" formada, processo que demanda gasto de energia para a célula a medida em que a abertura da região gera uma importante força de tração em toda dupla fita. XPA também é importante na sinalização de qual fita deverá ser excisada. Por fim, as endonucleases XPG e o complexo XPF/ERCC1 clivam respectivamente as regiões 3' e 5' da fita, as polimerases replicativas, Pol delta ou Pol epsilon sintetizam a fita nova e a DNA-ligase I ou II ligam o DNA sintetizado (12).

Figura 1 - Esquema representando os passos das duas sub-vias do NER, GGR (reparo do genoma global) e TCR (reparo acoplado à transcrição). Essa via envolve basicamente o reconhecimento da lesão, abertura da dupla fita de DNA, excisão da região que contém a lesão e síntese de uma nova fita livre de erros. A versatilidade dessa via envolve o reconhecimento uma grande variedade de lesões capazes de distorcer a dupla fita de DNA. Adaptado de Menck e Munford 2014 (12).

Mutações na via de NER levam ao desenvolvimento de Síndromes genéticas raras como Xeroderma (descrita anteriormente), Cockayne (CS, do inglês *Cockayne Syndrome*) e Tricotodistrofia (TTD). Dentre os pacientes XP, diferentes grupos de complementação com deficiências nessa via foram identificados por fusão celular. Assim, células de pacientes com deficiências em proteínas da via clássica de XP fazem parte de sete grupos de complementação de A até G e um oitavo grupo, XP-Variante, que apesar de sintomas clínicos similares, apresentam essa via NER normal. A genética da doença envolve mutações nesses oito genes: *XPA*, *XPB* (*ERCC3*), *XPC*, *XPD* (*ERCC2*), *XPE* (*DDB2*), *XPF* (*ERCC4*), *XPG* (*ERCC5*) e *XPV* (*POLH*), com fenótipo que variam de leve; *XPC*, *XPE* e *XPV*, à mais graves que incluem graves sintomas de fotossensibilidade e neurodegeneração. De forma geral, esses pacientes possuem problemas relacionados ao aumento da frequência de câncer de pele, em até 10.000 vezes de não melanomas e 2.000 mil vezes de melanoma em pacientes com até 20 anos, dentre esses 25% desenvolvem problemas neurológicos (24). Deficiência na via de TCR, levam a síndromes relacionadas à graves problemas de desenvolvimento, envelhecimento precoce e neurodegeneração.

Pacientes CS têm como principal característica clínica que definem seu diagnóstico; retardo no crescimento e problemas neurológicos; outras manifestações muito comuns incluem a perda auditiva neurosensorial, catarata, retinopatia pigmentar, fotossensibilidade cutânea e cárie dentária (25). De acordo com a severidade do sintoma envolvido a síndrome foi dividida em quatro classificações; Tipo I; em que nos primeiros anos de vida o paciente tem um desenvolvimento normal, até que começam a surgir os problemas de neurodegeneração, deficiência intelectual, e envelhecimento precoce, com perda de peso, estatura, visão, audição, o sistema nervoso central e periférico começam a perder função, com expectativa de vida de cerca de vinte anos. Já CS do tipo II, envolve característica da síndrome Cérebro-óculo-facial-esquelético (COFS), incluindo grave microcefalia extrema, catarata congênita, dismorfismo facial, nanismo caquético e artrogripose (retenção da articulação em uma posição fixa), cujos sintomas são acometidos logo que a criança nasce com expectativa de vida de até dez anos de idade (26). Eles também apresentam uma falha de crescimento predominantemente pós-natal, um retardo psicomotor grave, com hipotonia axial e hipertonia periférica e dificuldades de alimentação neonatais. Do tipo III inclui os pacientes com fenótipo mais amenos. Alguns pacientes CS, além dos problemas de neurodegeneração e desenvolvimento possuem uma alta predisposição ao câncer de pele e são classificados como XP/CS, até o momento a genética desses pacientes envolveram mutações nos genes *XPB* (*ERCC3*), *XPD* (*ERCC2*), *XPG* (*ERCC5*), *CSA* (*ERCC8*) e *CSB* (*ERCC6*) (19).

Em 1981, Fujiwara e colaboradores descrevem uma paciente japonesa com uma nova síndrome, UVSS (do inglês, *UV-sensitive Syndrome*) com leve fotossensibilidade, porém sem desenvolver câncer de pele ou problemas neurológicos (27, 28). As células desses pacientes possuem alta sensibilidade a UV e problemas de reparo na via de TCR com redução nos níveis de *RNA synthesis recovery* após irradiadas (29-31). Atualmente a genética desses pacientes envolve mutações no gene *CSA* (*ERCC8*), *CSB* (*ERCC6*) e *UVSSA*, identificado recentemente (30, 32-34). Alguns estudos mostraram que essa proteína interage com vários componentes da via de TCR e CSB, envolvida na ubiquitinação e desfosforilação da RNA Pol II parada na forquilha de transcrição frente a um dano, assim como na estabilização de CSB no local da lesão (35). A estabilização é mediada pela interação de UVSSA com USP7, uma protease que remove ubiquitinas das proteínas, restabelecendo o estado hipofosforilado da RNA pol II, importante para o reestabelecimento de sua atividade transcricional (36, 37).

Bem diferente desse quadro clínico, a síndrome Tricotiodistrofia (TTD) tem como principal característica clínica a fragilidade do cabelo e das unhas. Descrita pela primeira vez em 1968, TTD é uma síndrome genética autossômica recessiva rara, em que os pacientes possuem problemas na formação de pontes de sulfetos, essencial para síntese de alguns aminoácidos que constituem o cabelo (38). Em função dessa deficiência os cabelos ficam quebradiços e ralos, e quando analisados por microscopia apresentam aspecto de “rabo de tigre” devido à ausência de cor em algumas regiões, sendo esse o diagnóstico clássico de TTD (39, 40). Além do cabelo de “tigre”, ao nascer os pacientes desenvolvem problemas de desenvolvimento, com baixa estatura, microcefalia, deficiência intelectual, possuem uma face característica com queixo recuado e orelhas grandes, displasia das unhas. Em alguns casos apresentam fotossensibilidade (porém sem desenvolver câncer de pele), ictioses, infertilidade, alta predisposição à doenças infecciosas, principalmente no trato gastrointestinal e respiratório (41).

O primeiro trabalho descrevendo a genética envolvida no fenótipo TTD foi publicado em 1986 por Stefanini e colaboradores, em que descreveram quatro pacientes Italianos com o fenótipo clássico, porém com alta fotossensibilidade (42). Nesse trabalho foi reportado um defeito na via de NER envolvendo a proteína mutada XPD (ERCC2). Em 1993 um estudo, do mesmo grupo, com 13 pacientes TTD identificou dez pacientes mutados em *ERCC2*, porém três não apresentaram nenhuma mutação nesse gene (43). Muitos outros casos do fenótipo sem ligação com mutações nesse gene trouxeram à literatura novos genes envolvidos com a síndrome.

Atualmente sabe-se que a genética envolvida nas características clínicas de TTD possui uma certa complexidade. Os principais genes envolvidos no fenótipo fazem parte da via de NER, *XPB (ERCC3)* (44), *XPD (ERCC2)* (45) e *GTF2H5 (TTD-A)* (46). As três proteínas fazem parte do complexo TFIIH, em uma via comum de GGR e TCR, e dependendo do local da mutação nesses genes e da função cujo local faz parte o fenótipo pode incluir características de XP, como fotossensibilidade, reportado em 20% dos casos TTD (43), ou sintomas misturados de XP e CS (XP/CS) envolvendo neurodegeneração e fotossensibilidade (47). Recentes descobertas têm introduzido na literatura outros genes envolvidos no fenótipo TTD, como o envolvimento dos genes *MPLKIP (TTDN1* ou *C7orf11)* (48) e *RNF113A (TTD5*, ligado ao cromossomo X) (49).

A severidade dos sintomas dessas síndromes, tanto XP, quanto CS e TTD está diretamente relacionada à via deficiente envolvida. De forma geral, paciente com mutações em *XPA*, *ERCC3* (XP-B), *ERCC2* (XP-D) e *ERCC5* (XP-G) apresentam sintomas de fotossensibilidade e tumores cutâneos muito mais cedo quando comparados à paciente mutados em *XPC*, *DDB2* (XP-E) e *POLH* (XP-V). Os pacientes com sintomas clínicos mais severos representam cerca de 25% dos pacientes XP e são aqueles que normalmente desenvolvem problemas de neurodegeneração e desenvolvimento (33). A participação na via de NER da proteína mutada reflete *in vitro* a sensibilidade dessas células à radiação UV, assim como ao fenótipo clínico do paciente. Por exemplo, uma linhagem de paciente XP-C, proteína envolvida somente na via de GGR, é bem menos sensível à UV quando comparada à linhagem XP-A, deficiente em GGR e TCR e extremamente sensível. Essa relação também é observada na diferença de fenótipo entre esses pacientes em que XP-A possui um prognóstico clínico muito mais severo e uma menor expectativa de vida comparada à pacientes XP-C. A tabela 1 a seguir resume os genes mutados envolvidos em cada fenótipo, a principal característica clínica da síndrome e a via de NER afetada.

Tabela 1 - Lista das Síndromes relacionadas a deficiências na via de NER e os genes em que já foram descritas mutações responsáveis pelas características clínicas dos pacientes.

Diagnóstico Clínico	Gene mutado
Xeroderma	XPA
	XPB (ERCC3)
	XPC
	XPB (ERCC3)
	XPB (ERCC3)
	XPB (ERCC3)
	XPB (ERCC3)
	XPB (ERCC3)
	XPB (ERCC3)
Cockayne	CSA (ERCC6), CSB (ERCC8), XPB (ERCC3), XPD (ERCC2), XPG (ERCC5)
Tricotodistrofia	XPB (ERCC3), XPD (ERCC2), TTD (GTF2H5), MPLKIP (TTDN1), RNF113A (TTD5)

1.1.3 Uma via de tolerância ao dano

Outro importante via é a síntese de translesão (TLS), uma via de tolerância ao dano essencial na manutenção da estabilidade genômica. Mutações no gene *POLH*, que codifica a proteína Pol eta, levam à síndrome XP-V. Relatada pela primeira vez em 1970, a síndrome foi descoberta em pacientes XP proficientes em NER (50). Em 1972, outros três casos de pacientes com a mesma forma variante de XP, em que a sensibilidade e o reparo induzidos

por UV eram as mesmas de uma linhagem normal, porém com dificuldades no processo mitótico pós replicação do DNA (51). Em 1975, sabendo do fato de que a cafeína estava envolvida no aumento da sensibilidade e mutagênese em *E. coli* (52), Lehmann e colaboradores, foram capazes de sensibilizar as linhagens variantes de XP após co-tratamento de UV e cafeína (53). A cafeína tem um efeito pleiotrópico na célula com ação na síntese de DNA, apoptose, condensação da cromatina e regulação do ciclo celular. O aumento de sensibilidade após co-tratamento UV e cafeína ocorre devido ao fato de que a cafeína inibe a fosforilação da quinase CDK1 que regulada o *check-point* de G2/M (54), porém os mecanismos dessa inibição ainda não foram completamente elucidados. Dessa forma, a célula com lesão no DNA não para no ciclo antes do processo mitótico, o que desencadeia aos processos de instabilidade genética e morte celular.

Entretanto, apenas em 1999 o gene responsável pela síndrome foi identificado e clonado, através da purificação da proteína Pol eta, de extratos de células HeLa, capaz de complementar o defeito das linhagens XP-V. Além de cloná-la, Masutani e colaboradores mostram que essa é uma polimerase da família Y de translesão, especializada em replicar o DNA com fotoprodutos induzidos por UV, inserindo corretamente duas adeninas frente a um dímero de timina (55). Em humanos os processos de tolerância ao dano (DDT, do inglês *DNA Damage Tolerance*) são catalisadas pelas cinco principais polimerases da família Y; Rev1, Pol eta (η), Pol iota (ι), Pol Kappa (κ) e da família B, Pol zeta (ζ) (56). Esse processo é chamado de síntese translesão (TLS) e o reparo da lesão é feito após a replicação do DNA, do inglês *postreplication repair*. Esse mecanismo evita o bloqueio prolongado da forquilha de replicação frente ao dano, o que pode desencadear o processo de apoptose, por exemplo, ou expor essa região a uma provável quebra da dupla fita de DNA, contribuindo, dessa forma, à morte celular (57).

Assim, a Pol eta é a principal polimerase da família Y responsável por inserir o primeiro nucleotídeo frente a um dímero de pirimidina (CPD) induzido por luz UV, replicando fielmente o DNA lesado. Na falta dessa proteína, a TLS é processada por outras polimerases, como a Pol iota, mais propensas à erros, portanto, mais mutagênicas, uma explicação para o fato de que pacientes XP-V possuem elevada incidência de câncer de pele (58, 59). Além do *bypass* de dímeros de pirimidina, a Pol eta está envolvida na translesão de danos induzidos pelo tratamento com cisplatina, um quimioterápico capaz de se ligar covalentemente ao DNA (60).

O gene *POLH* está localizado no cromossomo 6p21.1-6p12.3 contendo cerca de 40 kpb de DNA, divididos em 11 exons (Figura 2). O RNA mensageiro (mRNA) correspondente tem um tamanho de 3.464 pb (Genebank NM_006502) com uma região de *Open Reading Frame* (ORF) de 2.139 pb, e a primeira metionina localizada no exon 2 (61). A isoforma canônica da proteína possui 713 aminoácidos (aa), em que o motivo de atividade catalítica se localiza inteiramente nos dez primeiros exons, 512 aa (N-terminal), contendo cinco motivos proteicos altamente conservados responsáveis pela sua atividade enzimática (62). Diferentemente do sítio catalítico das polimerases replicativas, as polimerases da família Y possuem os domínios *palm* and *thumb* menores e por isso o nucleotídeo consegue ser incorporado apesar da lesão (dímero de pirimidina) no DNA. Os três domínios *Finger*, *palm* e *thumb*, formam o *core* catalítico da proteína e funcionam como uma “garra” entre o DNA que está sendo replicado e os oligonucleotídeos que serão incorporados (63).

Na porção C-Terminal, codificada pela região do último exon, se localiza o sinal de localização nuclear (NLS), entre os aminoácidos 682-698, essencial na dinâmica de redistribuição da Pol eta quando recrutada (64). O domínio *zinc finger* de ligação ao domínio de ubiquitinação (UBZ) se localiza entre os aminoácidos 635-659, assim como o sítio de ligação à proteína de proliferação nuclear (PCNA), importante proteína acessória durante a replicação que ancora a polimerase replicativa ao DNA (65). Baldeck e colaboradores identificaram recentemente um novo domínio F1 (483-484), sendo essa uma região de interação com a subunidade POLD2 da polimerase replicativa Pol delta. Como essa é também uma subunidade do componente funcional da Pol zeta, outra polimerase da família Y de TLS, o grupo tem como hipótese que essa seja uma região importante para troca entre as polimerases de translesão, Pol eta de inserção, e a Pol zeta de extensão até que a polimerase replicativa delta retorne à duplicação do DNA (66).

Figura 2 - Domínios de regulação da proteína Pol eta. Na porção N-Terminal, primeiros 432 aminoácidos, contendo o *core* catalítico *Finger*, *Palm* e *Thumb* (em vermelho escuro) e o domínio *Little finger* (LF). Na porção C-Terminal, últimos 281 aminoácidos, as sequências necessárias para interação com PCNA monoubiquitinado (em verde, PIP1-box 1 e 2), interação com a polimerase de translesão REV1 (RIR, *motif* 524-539), em preto (*motif* F1 483-484) região de interação com a subunidade POLD2 da polimerase replicativa Pol delta, domínio zinc-finger de interação com ubiquitina (UBZ) e recrutamento da Pol eta ao núcleo (NLS) (61, 62, 66-69).

Quando a polimerase replicativa encontra um impedimento físico para continuar a replicação, em função de um DNA-molde distorcido, a lisina 164 da proteína PCNA é monoubiquitinada pelas ubiquitinas ligases E2/E3 (Rad6/Rad18). Essa modificação pós-traducional promove o recrutamento das polimerases da família Y aumentando sua afinidade pela PCNA que interage com a Pol eta através dos domínios UBZ e PIP-box (68). Alguns trabalhos recentes mostram que a monoubiquitinação também regula negativamente a atividade da Pol eta durante a replicação do DNA sem lesão, em que alguns resíduos dos domínios UBZ e PIP-box são monoubiquitinados, inibindo sua interação com PCNA. Esse processo é *down*-regulado após indução de dano por UV ou cisplatina (65).

A síntese translesão é um processo feito por duas polimerases, em que a inserção dos nucleotídeos é feita por umas das polimerases da família Y e a extensão por mais alguns pares de base é feita principalmente pela Pol zeta da família B (54, 66). Após o *bypass* do dano, PCNA é desubiquitinado pela proteína USP7 para que a polimerase de alta fidelidade, Pol delta, continue o processo de replicação do DNA.

CAPÍTULO 2 - As Síndromes de NER no Brasil

2.1 INTRODUÇÃO

Após a descoberta e descrição das síndromes XP em 1878 por Hebra e Kaposi na Itália, de Cockayne em 1936 pelo pediatra Edward Alfred Cockayne na Inglaterra e TTD em 1968 por Pollit também na Inglaterra, relatos de casos e descrições de novos pacientes foram sendo publicados pelo mundo, principalmente na América do Norte, Europa, África e Japão. O acompanhamento de centenas de pacientes por décadas, e estudos com células desses, levou a compreensão do que se sabe atualmente sobre as vias moleculares e os defeitos genéticos envolvidos nos fenótipos dessas síndromes, assim como a compreensão da relação de causa e efeito das lesões no DNA e papel do reparo nos processos de mutagênese, carcinogênese e morte celular.

No Brasil os relatos de casos começaram a aparecer em 1995 com a descrição de dois pacientes CS em Pernambuco (PE), como mostra a retrospectiva da figura 3 a seguir. Medeiros e colaboradores descreveram os dois irmãos, um de sete anos e outro de 9 (falecido pouco tempo depois do estudo), os dois com diagnóstico clássico de CS com graves problemas de neurodegeneração e progeria (70).

Figura 3 - Linha do tempo indicando os relatos de casos e os estudos moleculares de pacientes XP e CS. Em amarelo os trabalhos que apresentaram caracterização genética dos pacientes.

No estado do Rio Grande do Sul foram relatados dois trabalhos com pacientes CS: em 1999 o caso de uma criança de 3 anos, procedente de Eldorado do Sul (RS), foi descrita com graves problemas no desenvolvimento motor, hipotrofia muscular generalizada, deficiência intelectual, caquexia, microcefalia, convulsões e cefaleia (71). Em 2000, na cidade de Porto Alegre, uma criança com deficiência intelectual, envelhecimento precoce, surdez, problemas de cárie dentária, fotossensibilidade e entre 4-5 anos passou a ter convulsões. Filha de casamento consanguíneo de primeiro grau, a criança teve um irmão com os mesmos sintomas que faleceu aos 19 anos acamado. O ensaio de *RNA synthesis recovery* mostrou uma redução na síntese de RNA após irradiação com UV, o que confirmou molecularmente o diagnóstico clínico de CS (72).

Em seguida, dois trabalhos são publicados com pacientes do estado de São Paulo. Em 2006, um estudo no Hospital das Clínicas publicou oito casos de pacientes CS, todos com atraso de crescimento, problemas de desenvolvimento, microcefalia, caries dentárias, surdez, contratura muscular e sete deles com fotossensibilidade. Nesse trabalho cinco novas mutações foram identificadas no gene CSA (ERCC8); sendo quatro pacientes portadores de uma inserção no exon 4 do códon 104 (T104fs) que altera o quadro de leitura do mRNA, dois pacientes composto heterozigotos para essa mutação e uma alteração *missense* T204K, com dois pacientes homozigotos para outra alteração *missense* D266G e dois pacientes com mutações em sítio de splicing uma no intron 4, IVS4+1G>A e outra no intron 6, IVS7-1G>A (73). Em 2012, em Barueri (SP) outro relato de caso de uma criança de três anos com fotossensibilidade em regiões expostas ao sol, que começou aos seis meses, retardo psicomotor e deficiência intelectual, problemas dentários, atrofia óptica, surdez, perda gradativa da visão e microcefalia (74).

Ainda em 2012, dois novos casos em Porto Alegre (RS). Irmãos, uma menina de 8 anos e um menino de 13 anos, ambos com deficiência global do desenvolvimento, microcefalia, nanismo, face característica de CS (com ossos faciais proeminentes, microftalmia, olhos encovados, micrognatia e nariz fino), surdez e fotossensibilidade. A análise genética identificou duas alterações em sítio de *splicing* em CSA, uma no sítio doador do intron 7, G/A int7spl.donor; cDNA ins83; proteína Q228fs+X e outra no sítio aceptor do mesmo intron, G/A int7spl.acc; cDNA del 9nt; proteína del207-209 (75).

Em 2014, o último caso de CS relatado, um menino de 12 anos, nascido e criado em Salvador (BA) que procurou assistência médica com sintomas de fraqueza, tosse e recusa em se alimentar. A criança desenvolveu deficiência intelectual, não fala, não anda e interage socialmente somente com sorriso no rosto. Uma tomografia revelou atrofia cortical difusa, uma extensa calcificação cerebral e o espaço do líquido cefalorraquidiano aumentado (76).

Com relação ao que já foi descrito e caracterizado de XP no Brasil foram quatro relatos de caso (em 2003, 2004, 2011 e 2012) e três trabalhos de caracterização genética dos pacientes (em 2009, 2012 e 2015). Em 2003, em Santa Catarina, um relato de caso de uma criança de sete anos, com a face extremamente afetada por inúmeras cirurgias (77). Em 2004, Soares de Sá e colaboradores publicam um estudo de 20 anos de acompanhamento de pacientes, menores de 18 anos, com casos de câncer no Hospital do Câncer de São de São Paulo. Dentre esses pacientes três XP de 8, 16 e 17 anos com casos de melanoma nos membros, tronco, cabeça e pescoço (78). Em 2011, em Jundiaí, Pasquale relata 4 casos de pacientes XP extremamente afetados com um óbito durante a realização do estudo. A paciente que veio ao óbito em decorrência de complicações tumorais, dentre essas, uma neoplasia ginecológica devido a uma infecção por HPV, o que nos evidencia ao fato de que pacientes XP devem ser advertidos não somente com relação à proteção solar, mas também de infecções por HPV (79). Alguns estudos já mostraram que linhagens de células XP têm um aumento de instabilidade genômica e ficam extremamente mais sensíveis à morte induzida por UV ou por quimioterápicos como cisplatina quando transformadas por HPV (80). Ainda em São Paulo, em 2012, Cardoso e colaboradores, da Universidade de Bauru, publicam um relato de paciente XP de 41 anos com graves problemas odontológicos, leve problema neurológico, fotossensibilidade, com excisão de tumores no rosto, lábios, língua e mucosa bucal. As recorrentes cirurgias nessa região da boca levaram à microtomia o que dificultou a higienização bucal do paciente e até mesmo sua respiração (81).

Os estudos de caracterização genética envolvem os trabalhos de nosso grupo de pesquisa (2009 e 2013) e dois trabalhos de Santiago e colaboradores (2015 e 2016, em preparação) do Hospital do Câncer AC Camargo. Em 2009, foram relatados três pacientes XP, com duas mutações no gene *XPC*, sendo uma delas não descrita, c.1969G>T, e uma já descrita em pacientes na Europa, c.1643-1644delTG (82, 83). Esta segunda mutação foi reportada posteriormente como sendo resultado de um efeito fundador no norte da África (84). Em

2015, a partir de estudo de 26 pacientes XP, é descrita descreve a baixa incidência de pacientes XP-A no Brasil, com a descrição de uma mutação já descrita na literatura (85). A tabela 2 a seguir resume as mutações já descritas no Brasil a partir de 2000 até 2015.

Tabela 2 - Mutações de Pacientes XP e CS já publicadas no Brasil entre 2000 e 2015. São 16 pacientes estudados e 14 mutações descritas, sendo 11 não descritas anteriormente e 3 já descritas na literatura.

Artigo	NºPacientes	Gene	cDNA	Protein	Tipo	Literatura
2000 Berlota	8	CSA (ERCC8)	-	p.T104fs	Frameshift ins	-
		CSA (ERCC8)	-	p.T204K	missense	-
		CSA (ERCC8)	-	p.D266G	missense	-
		CSA (ERCC8)	IVS4+1G>A		splicing	-
2002 Resende	2	CSA (ERCC8)	IVS7-1G>A, c.618-1G>A		splicing	-
		CSA (ERCC8)	G/A int7spl.donor; cDNA ins83nt	p.Q228fs+X	splicing	-
		CSA (ERCC8)	G/A int7spl.acc; cDNA del 9nt	p.del207-209	splicing	-
2009 Leite	3	XPC	c.1969G>T (exon 9)	p.E657X	stop codon	novel
		XPC	c.1872_2031 (exon 9 deletion)		possible splicing error	novel
		XPC	c.1643-1644delTG (exon 8)		frame shift	Chavanne et al.,2000/Khan et al., 2006
		XPC	c.1626_1870del (245 nt deletion - Exon 8)		possible splicing error	Chavanne et al.,2000/Khan et al., 2006
2012 Soltys	2	XP-G (ERCC5)	c.83C>A	p.Ala28Asp	Missense	novel
		XP-G (ERCC5)	c.2904G>C	p.Trp968Cys	Missense	novel
2015 Santiago	1	XPA	c.619C>T (exon 5)	p.R207X	stop codon	Bartels, C.L. 2007; Vasquez, K.M.2002; Satokata, I. 1992

CAPÍTULO 3 - CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA CELULAR FRENTE AO DANO INDUZIDO POR CISPLATINA

3.1 INTRODUÇÃO

Estudos têm demonstrado que a Pol eta participa da translesão a danos induzidos pelo tratamento de células humanas com cisplatina (59, 105-107). Dessa forma, linhagens de células deficientes em Pol eta são normalmente sensíveis à cisplatina e umas das formas de caracterizarmos fenotipicamente as linhagens XP-V, tanto de Goiás, XP04GO, XP06GO e XP88GO, quanto de Minas Gerais, XP05MG, foi avaliando a sensibilidade ao tratamento com essa droga.

Esse quimioterápico é usado, principalmente, para tratamento de câncer de ovário, testículo e de células pequenas de pulmão (108). De forma geral, essa droga atua se ligando covalente ao DNA, formando monoadutos, entre a dupla fita ou em uma mesma fita. Essas ligações causam graves distorções e lesões na dupla hélice de DNA (105). A alta reatividade de espécies de Cisplatina mono-aquadas promove sua ligação covalente ao DNA, formando monoadutos (Pt-G). Esses monoadutos se tornam um problema maior quando são convertidos a diadutos formando ligações cruzadas (*cross-links*) entre as fitas de DNA. A distorção causada por essas lesões formam um bloqueio físico durante a fase S do ciclo celular, no processo de replicação, impedindo a progressão da replicação e de outros processos como a transcrição celular (108).

Dessa forma, o bloqueio físico gera um contexto de instabilidade na célula na medida em que, com a forquilha de replicação parada, é exposto o DNA simples fita, suscetível ao ataque de nucleases, além de gerar uma força de tensão na região, podendo levar a dupla quebra do DNA (DSB, do inglês *Double-Strand Break*). Em uma última tentativa de recuperar o processo de replicação, as vias de reparo de dupla quebra no DNA, recombinação homologa (HR, do inglês *homologous recombination*) e não homóloga (NHEJ, do inglês *Non Homologous End-Joining*), são recrutadas. Caso as células consigam sobreviver às lesões, replicar seu genoma e se multiplicar, podem ocorrer alterações (mutações e aberrações cromossômicas) podendo resultar na formação de tumores. Em um contexto de tratamento de tumores, impedir que a célula tumoral consiga lidar com esse estresse replicativo, de modo a bloqueando essas formas de reparo ou de tolerância ao dano, é uma estratégia para potencializar o efeito de agentes genotóxicos.

CAPÍTULO 4 – CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS

4.1. Conclusões

- Duas mutações foram identificadas no gene *POLH*, uma em sitio de *splicing* no intron 6, c.764+1 G>A, e uma troca não sinônima no exon 8, c.C907T [p.R303X], responsáveis pelo fenótipo clínico XP-V nos pacientes de Araras/Faina (GO). Com 17 pacientes, em cerca de mil habitantes, é uma das regiões com maior densidade de pacientes XP no mundo com grande heterogeneidade de fenótipos clínicos entre eles. Os dados indicam dois efeitos fundadores para introdução dos alelos naquela comunidade.
- Outros pacientes foram incluídos no estudo que abrangeu outras duas síndromes relacionadas a defeitos em NER, como CS e TTD. Desta forma, um total de 34 pacientes brasileiros foram caracterizados ao nível genético: 34 XP, 1 CS e 1 TTD, sendo que entre os pacientes XP identificamos; 26 XP-V, 4 XP-C, um XP-A, um XP-E, um CSB e um XP-D/TTD.
- Neste trabalho avaliamos o efeito do tratamento com a cisplatina nas linhagens primárias deficientes em Pol eta. Conforme é descrito pela literatura, essas linhagens foram mais sensíveis ao tratamento quando comparadas as linhagens controle FHN e GO01. Essa via de tolerância ao dano é essencial na capacidade de sobrevivência celular, assim como na restauração da forquilha de replicação parada frente ao dano.

4.2. Considerações finais

Um bebê pela manhã é levado para seu banho de sol diário e minutos depois sua pele se torna avermelhada com bolhas e queimaduras. Há aproximadamente 140 anos, Kaposi identificou esses sintomas em diversos pacientes e caracterizou uma síndrome genética, Xeroderma Pigmentosum. Atualmente sabemos que essa fotossensibilidade na pele, entre outros sintomas, característico de paciente XP, é resultado da exposição à radiação UV, componente da luz solar, e a ausência de proteínas relacionadas à defeitos nas vias de reparo ou tolerância de lesões no DNA. Uma vez feito o diagnóstico clínico, a família pode ser esclarecida com relação aos problemas da exposição à UV e orientada quanto a utilização de protetores solares, roupas que protegem contra UV, assim como a escola pode ser direcionada e adaptada a esses pacientes. Apesar de uma vida no escuro, esses pacientes,

também chamados de “crianças na lua”, terão uma grande melhora na qualidade de vida com a redução na incidência de tumores de pele e conseqüentemente de intervenções cirúrgicas ao longo da vida.

Um resultado importante deste estudo foi a contribuição para aposentadoria dos pacientes, tanto de Araras, quanto de Faina. Para pacientes com fenótipo clínico mais ameno os pedidos de aposentadoria eram indeferidos pela Secretaria de Saúde Pública de Goiás e o diagnóstico genético os ajudou nesse processo, já que se trata de um dado incontestável de que são portadores de XP. A disseminação do estudo genético e o conhecimento da doença levou a melhor compreensão da necessidade de cuidados frente a exposição solar entre os pacientes da comunidade. A presidente da associação, Gleice Machado (mãe de um dos pacientes) passou a distribuir panfletos de como se cuidar e proteger do sol em toda a comunidade e regiões vizinhas. Além disso, ela conquistou o direito de receber do estado protetores solar com a enzima de reparo (Eryfotona®), que são distribuídos aos pacientes em quantidade abundante, estimulando o uso diário.

Acreditamos que a continuidade de estudos diagnósticos em outros pacientes do país deve ser mantida. Em termos sociais, esse diagnóstico molecular permite apoio junto à comunidade, assim como auxilia no esclarecimento de como os pacientes e seus familiares podem prevenir pelo menos parte de seus sintomas (aqueles que afetam a diretamente a pele). Abre-se também perspectivas de realizar aconselhamento genético aos pacientes. Em termos científicos, esses dados contribuem para o conhecimento da frequência e distribuição de pacientes no país. É interessante observar que muitas das mutações encontradas em pacientes brasileiros ainda não foram relatadas na literatura, o que simplesmente indica o quanto nossa população foi pouco estudada para essas síndromes relacionadas a NER. Espera-se que novas mutações possam contribuir com o conhecimento dos mecanismos moleculares responsáveis pelos fenótipos celulares e mesmo clínicos dos pacientes. Por outro lado, a identificação de mutações que já foram relatadas, como no caso dos pacientes de Araras, pode ser investigada para se conhecer a eventual origem dessas mutações, com esclarecimento da história desses efeitos fundadores.

Ainda hoje não existe nenhum protocolo de terapia, exceto prevenção à luz solar, para esses pacientes. Estudos, como os descritos aqui, trazem a investigação científica mais próxima à comunidade de pacientes e familiares, mas é difícil entender hoje como

poderemos ajudá-los em termos terapêuticos. De qualquer forma, esses estudos podem trazer ao menos informações e algumas explicações sobre o que os afeta, o que é o mínimo que podemos oferecer a eles. Lembramos que muito do que sabemos sobre a origem do processo de carcinogênese devemos a pacientes XP, e cada vez mais fica claro que graças a eles (e também a pacientes com outras síndromes relacionadas a NER) estamos começando a entender porque envelhecemos. Esperamos que esses estudos poderão trazer melhor compreensão e eventual esperança de uma melhor qualidade de vida para os pacientes e seus familiares.

REFERÊNCIA*

1. Cartault F, Nava C, Malbrunot AC, Munier P, Hebert JC, N'guyen P, et al. A new XPC gene splicing mutation has lead to the highest worldwide prevalence of xeroderma pigmentosum in black Mahori patients. *DNA Repair (Amst)*. 2011;10(6):577-85.
2. Kaposi M, Fagge CH, Hebra F. *On Diseases of the Skin, Including the Exanthemata*. Oxford University: The New Sydenham Society; 1874. 425 p.
3. Kelner A. Photoreactivation of ultraviolet-irradiated *Escherichia coli*, with special reference to the dose-reduction principle and to ultraviolet-induced mutation. *J Bacteriol*. 1949;58(4):511-22.
4. Dulbecco R. Experiments on photoreactivation of bacteriophages inactivated with ultraviolet radiation. *J Bacteriol*. 1950;59(3):329-47.
5. Menck CF. Shining a light on photolyases. *Nat Genet*. 2002;32(3):338-9.
6. Friedberg EC. DNA damage and repair. *Nature*. 2003;421(6921):436-40.
7. Sancar A, Rupert CS. Cloning of the *phr* gene and amplification of photolyase in *Escherichia coli*. *Gene*. 1978;4(4):295-308.
8. Pettijohn DE, Hanawalt PC. Deoxyribonucleic acid replication in bacteria following ultraviolet irradiation. *Biochim Biophys Acta*. 1963;72:127-9.
9. Cleaver JE. Defective repair replication of DNA in xeroderma pigmentosum. *Nature*. 1968;218(5142):652-6.
10. Friedberg EC. The discovery that xeroderma pigmentosum (XP) results from defective nucleotide excision repair. *DNA Repair (Amst)*. 2004;3(2):183, 95.
11. Moraes MC, de Andrade AQ, Carvalho H, Guecheva T, Agnoletto MH, Henriques JA, et al. Both XPA and DNA polymerase η are necessary for the repair of doxorubicin-induced DNA lesions. *Cancer Lett*. 2012;314(1):108-18.
12. Menck CF, Munford V. DNA repair diseases: What do they tell us about cancer and aging? *Genet Mol Biol*. 2014;37(1 Suppl):220-33.
13. Sarasin A. The molecular pathways of ultraviolet-induced carcinogenesis. *Mutat Res*. 1999;428(1-2):5-10.
14. Crick F. The double helix: a personal view. *Nature*. 1974;248(5451):766-9.
15. Costa RM, Chiganças V, Galhardo RaS, Carvalho H, Menck CF. The eukaryotic nucleotide excision repair pathway. *Biochimie*. 2003;85(11):1083-99.
16. Friedberg EC, McDaniel LD, Schultz RA. The role of endogenous and exogenous DNA damage and

*De acordo com:

International Committee of Medical Journal Editors [Internet]. Uniform requirements for manuscripts submitted to biomedical journals. [2011 Jul 15]. Available from: http://nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html

mutagenesis. *Curr Opin Genet Dev.* 2004;14(1):5-10.

17.Schuch AP, Yagura T, Makita K, Yamamoto H, Schuch NJ, Agnez-Lima LF, et al. DNA damage profiles induced by sunlight at different latitudes. *Environ Mol Mutagen.* 2012;53(3):198-206.

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

19.Laugel V, Dalloz C, Durand M, Sauvanaud F, Kristensen U, Vincent MC, et al. Mutation update for the CSB/ERCC6 and CSA/ERCC8 genes involved in Cockayne syndrome. *Hum Mutat.* 2010;31(2):113-26.

20.Hanawalt PC, Spivak G. Transcription-coupled DNA repair: two decades of progress and surprises. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2008;9(12):958-70.

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

22.Sugasawa K, Ng JM, Masutani C, Iwai S, van der Spek PJ, Eker AP, et al. Xeroderma pigmentosum group C protein complex is the initiator of global genome nucleotide excision repair. *Mol Cell.* 1998;2(2):223-32.

23.Velmurugu Y, Chen X, Slogoff Sevilla P, Min JH, Ansari A. Twist-open mechanism of DNA damage recognition by the Rad4/XPC nucleotide excision repair complex. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2016;113(16):E2296-305.

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

25.Nance MA, Berry SA. Cockayne syndrome: review of 140 cases. *Am J Med Genet.* 1992;42(1):68-84.

26.Laugel V, Dalloz C, Tobias ES, Tolmie JL, Martin-Coignard D, Drouin-Garraud V, et al. Cerebro-oculo-facio-skeletal syndrome: three additional cases with CSB mutations, new diagnostic criteria and an approach to investigation. *J Med Genet.* 2008;45(9):564-71.

27.Itoh T, Ono T, Yamaizumi M. A new UV-sensitive syndrome not belonging to any complementation groups of xeroderma pigmentosum or Cockayne syndrome: siblings showing biochemical characteristics of Cockayne syndrome without typical clinical manifestations. *Mutat Res.* 1994;314(3):233-48.

28.Fujiwara Y, Ichihashi M, Kano Y, Goto K, Shimizu K. A new human photosensitive subject with a defect in the recovery of DNA synthesis after ultraviolet-light irradiation. *J Invest Dermatol.* 1981;77(3):256-63.

29.Horibata K, Iwamoto Y, Kuraoka I, Jaspers NG, Kurimasa A, Oshimura M, et al. Complete absence of Cockayne syndrome group B gene product gives rise to UV-sensitive syndrome but not Cockayne syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004;101(43):15410-5.

30. Itoh T, Yamaizumi M. UVs syndrome: establishment and characterization of fibroblastic cell lines transformed with simian virus 40 DNA. *J Invest Dermatol*. 2000;114(1):101-6.
31. Itoh T, Fujiwara Y, Ono T, Yamaizumi M. UVs syndrome, a new general category of photosensitive disorder with defective DNA repair, is distinct from xeroderma pigmentosum variant and rodent complementation group I. *Am J Hum Genet*. 1995;56(6):1267-76.
32. Spivak G, Itoh T, Matsunaga T, Nikaido O, Hanawalt P, Yamaizumi M. Ultraviolet-sensitive syndrome cells are defective in transcription-coupled repair of cyclobutane pyrimidine dimers. *DNA Repair (Amst)*. 2002;1(8):629-43.
33. Cleaver JE, Lam ET, Revet I. Disorders of nucleotide excision repair: the genetic and molecular basis of heterogeneity. *Nat Rev Genet*. 2009;10(11):756-68.
34. Nagase T, Kikuno R, Ishikawa K, Hirosawa M, Ohara O. Prediction of the coding sequences of unidentified human genes. XVII. The complete sequences of 100 new cDNA clones from brain which code for large proteins in vitro. *DNA Res*. 2000;7(2):143-50.
35. Nakazawa Y, Sasaki K, Mitsutake N, Matsuse M, Shimada M, Nardo T, et al. Mutations in UVSSA cause UV-sensitive syndrome and impair RNA polymerase II processing in transcription-coupled nucleotide-excision repair. *Nat Genet*. 2012;44(5):586-92.
36. Zhang X, Horibata K, Saijo M, Ishigami C, Ukai A, Kanno S, et al. Mutations in UVSSA cause UV-sensitive syndrome and destabilize ERCC6 in transcription-coupled DNA repair. *Nat Genet*. 2012;44(5):593-7.
37. Ogi T, Nakazawa Y, Sasaki K, Guo C, Yoshiura K, Utani A, et al. [Molecular cloning and characterisation of UVSSA, the responsible gene for UV-sensitive syndrome]. *Seikagaku*. 2013;85(3):133-44.
38. Pollitt RJ, Jenner FA, Davies M. Sibs with mental and physical retardation and trichorrhexis nodosa with abnormal amino acid composition of the hair. *Arch Dis Child*. 1968;43(228):211-6.
39. Lehmann AR. DNA repair-deficient diseases, xeroderma pigmentosum, Cockayne syndrome and trichothiodystrophy. *Biochimie*. 2003;85(11):1101-11.
40. Price VH, Odom RB, Ward WH, Jones FT. Trichothiodystrophy: sulfur-deficient brittle hair as a marker for a neuroectodermal symptom complex. *Arch Dermatol*. 1980;116(12):1375-84.
41. Itin PH, Sarasin A, Pittelkow MR. Trichothiodystrophy: update on the sulfur-deficient brittle hair syndromes. *J Am Acad Dermatol*. 2001;44(6):891-920; quiz 1-4.
42. Stefanini M, Lagomarsini P, Arlett CF, Marinoni S, Borrone C, Crovato F, et al. Xeroderma pigmentosum (complementation group D) mutation is present in patients affected by trichothiodystrophy with photosensitivity. *Hum Genet*. 1986;74(2):107-12.
43. Stefanini M, Lagomarsini P, Giliani S, Nardo T, Botta E, Peserico A, et al. Genetic heterogeneity of the excision repair defect associated with trichothiodystrophy. *Carcinogenesis*. 1993;14(6):1101-5.
44. Weeda G, Eveno E, Donker I, Vermeulen W, Chevallier-Lagente O, Taïeb A, et al. A mutation in the XPB/ERCC3 DNA repair transcription gene, associated with trichothiodystrophy. *Am J Hum Genet*. 1997;60(2):320-9.

45. Lehmann AR. The xeroderma pigmentosum group D (XPD) gene: one gene, two functions, three diseases. *Genes Dev.* 2001;15(1):15-23.
46. Giglia-Mari G, Coin F, Ranish JA, Hoogstraten D, Theil A, Wijgers N, et al. A new, tenth subunit of TFIIH is responsible for the DNA repair syndrome trichothiodystrophy group A. *Nat Genet.* 2004;36(7):714-9.
47. Schäfer A, Gratchev A, Seebode C, Hofmann L, Schubert S, Laspe P, et al. Functional and molecular genetic analyses of nine newly identified XPD-deficient patients reveal a novel mutation resulting in TTD as well as in XP/CS complex phenotypes. *Exp Dermatol.* 2013;22(7):486-9.
48. Swagemakers SM, Jaspers NG, Raams A, Heijnsman D, Vermeulen W, Troelstra C, et al. Pollitt syndrome patients carry mutation in TTDN1. *Meta Gene.* 2014;2:616-8.
49. Corbett MA, Dudding-Byth T, Crock PA, Botta E, Christie LM, Nardo T, et al. A novel X-linked trichothiodystrophy associated with a nonsense mutation in RNF113A. *J Med Genet.* 2015;52(4):269-74.
50. Jung EG. New form of molecular defect in xeroderma pigmentosum. *Nature.* 1970;228(5269):361-2.
51. Cleaver JE. Xeroderma pigmentosum: variants with normal DNA repair and normal sensitivity to ultraviolet light. *J Invest Dermatol.* 1972;58(3):124-8.
52. Lumb JR, Sideropoulos AS, Shankel DM. Inhibition of dark repair of ultraviolet damage in DNA by caffeine and 8-chlorocaffeine. Kinetics of inhibition. *Mol Gen Genet.* 1968;102(2):108-11.
53. Lehmann AR, Kirk-Bell S, Arlett CF, Paterson MC, Lohman PH, de Weerd-Kastelein EA, et al. Xeroderma pigmentosum cells with normal levels of excision repair have a defect in DNA synthesis after UV-irradiation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1975;72(1):219-23.
54. Yamada K, Takezawa J, Ezaki O. Translesion replication in cisplatin-treated xeroderma pigmentosum variant cells is also caffeine-sensitive: features of the error-prone DNA polymerase(s) involved in UV-mutagenesis. *DNA Repair (Amst).* 2003;2(8):909-24.
55. Masutani C, Araki M, Yamada A, Kusumoto R, Nogimori T, Maekawa T, et al. Xeroderma pigmentosum variant (XP-V) correcting protein from HeLa cells has a thymine dimer bypass DNA polymerase activity. *EMBO J.* 1999;18(12):3491-501.
56. Waters LS, Minesinger BK, Wiltrout ME, D'Souza S, Woodruff RV, Walker GC. Eukaryotic translesion polymerases and their roles and regulation in DNA damage tolerance. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2009;73(1):134-54.
57. Kannouche P, Stry A. Xeroderma pigmentosum variant and error-prone DNA polymerases. *Biochimie.* 2003;85(11):1123-32.
58. Wang Y, Woodgate R, McManus TP, Mead S, McCormick JJ, Maher VM. Evidence that in xeroderma pigmentosum variant cells, which lack DNA polymerase eta, DNA polymerase iota causes the very high frequency and unique spectrum of UV-induced mutations. *Cancer Res.* 2007;67(7):3018-26.

59. Cruet-Hennequart S, Gallagher K, Sokol AM, Villalan S, Prendergast AM, Carty MP. DNA polymerase η , a key protein in translesion synthesis in human cells. *Subcell Biochem.* 2010;50:189-209.
60. Zhao Y, Biertümpfel C, Gregory MT, Hua YJ, Hanaoka F, Yang W. Structural basis of human DNA polymerase η -mediated chemoresistance to cisplatin. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012;109(19):7269-74.
61. Inui H, Oh KS, Nadem C, Ueda T, Khan SG, Metin A, et al. Xeroderma pigmentosum-variant patients from America, Europe, and Asia. *J Invest Dermatol.* 2008;128(8):2055-68.
62. Kannouche P, Broughton BC, Volker M, Hanaoka F, Mullenders LH, Lehmann AR. Domain structure, localization, and function of DNA polymerase η , defective in xeroderma pigmentosum variant cells. *Genes Dev.* 2001;15(2):158-72.
63. Friedberg EC, Wagner R, Radman M. Specialized DNA polymerases, cellular survival, and the genesis of mutations. *Science.* 2002;296(5573):1627-30.
64. Gratchev A, Strein P, Utikal J, Sergij G. Molecular genetics of Xeroderma pigmentosum variant. *Exp Dermatol.* 2003;12(5):529-36.
65. Bienko M, Green CM, Crosetto N, Rudolf F, Zapart G, Coull B, et al. Ubiquitin-binding domains in Y-family polymerases regulate translesion synthesis. *Science.* 2005;310(5755):1821-4.
66. Baldeck N, Janel-Bintz R, Wagner J, Tissier A, Fuchs RP, Burkovics P, et al. FF483-484 motif of human Pol η mediates its interaction with the POLD2 subunit of Pol δ and contributes to DNA damage tolerance. *Nucleic Acids Res.* 2015;43(4):2116-25.
67. Pozhidaeva A, Pustovalova Y, D'Souza S, Bezsonova I, Walker GC, Korzhnev DM. NMR structure and dynamics of the C-terminal domain from human Rev1 and its complex with Rev1 interacting region of DNA polymerase η . *Biochemistry.* 2012;51(27):5506-20.
68. Despras E, Delrieu N, Garandeau C, Ahmed-Seghir S, Kannouche PL. Regulation of the specialized DNA polymerase η : revisiting the biological relevance of its PCNA- and ubiquitin-binding motifs. *Environ Mol Mutagen.* 2012;53(9):752-65.
69. Yang W. An overview of Y-Family DNA polymerases and a case study of human DNA polymerase η . *Biochemistry.* 2014;53(17):2793-803.
70. Medeiros JS, da Silva EO, de Mello RJ, Fittipaldi Jr H, de Carvalho MW. [Cockayne syndrome in two brothers]. *J Pediatr (Rio J).* 1995;71(6):344-8.
71. Guardiola A, Alvares-da-Silva CR, Grisolia JR, Silbermann R. [Cockayne syndrome. Case report]. *Arq Neuropsiquiatr.* 1999;57(1):106-10.
72. Karam SM, Costa JC, Jardim L, Pires RF, Lehmann AR, Giugliani R. Cockayne syndrome: report of a Brazilian family with confirmation of impaired RNA synthesis after UV-irradiation. 2000.
73. Bertola DR, Cao H, Albano LM, Oliveira DP, Kok F, Marques-Dias MJ, et al. Cockayne syndrome type A: novel mutations in eight typical patients. *J Hum Genet.* 2006;51(8):701-5.
74. Sant'Anna GRd, Piller RGL, Oliveira Mad, Duarte DA. Cockayne Syndrome: Case Report 1ed: Revista Brasileira de Pesquisa em Saúde; 2012. p. 57-62.

75. Resende C, Loureiro S, Cardoso E, Fonseca S, Sá J, Simões F. Cockayne's syndrome: report of two cases. Porto Alegre (RS); 2012.
76. Barata AM, Souza RO, Tavares FLS, Gonçalves CS, Garcia LL, Almeida CP, et al. COCKAYNE SYNDROME: A CASE REPORT. 2014.
77. Oliveira CRD, Elias L, Barros ACdM, Conceição DBd. Anesthesia in Patient with Xeroderma Pigmentosum. Case Report. 1 ed: Rev Bras Anesthesiol; 2003. p. 46 - 51.
78. Sá BCSd, Rezze GG, Scramim AP, Landman G, Neves RI. Cutaneous melanoma in childhood and adolescence: retrospective study of 32 patients. São Paulo: Melanoma Research; 2004. p. 487–92
79. Pasquale G, Storti LR, Favato NM, Lipay MVN, Alves CAXdM. Clinical and genetic evaluation of patients with xeroderma pigmentosum in Jundiaí – SP Jundiaí; 2011.
80. Cleaver JE, Afzal V, Feeney L, McDowell M, Sadinski W, Volpe JP, et al. Increased ultraviolet sensitivity and chromosomal instability related to P53 function in the xeroderma pigmentosum variant. Cancer Res. 1999;59(5):1102-8.
81. Cardoso CL, Fernandes LMPdSR, Rocha JF, Soares CT, Barreto JA, Damante JH. Xeroderma Pigmentosum – A case report with oral implications. 2012.
82. Leite RA, Marchetto MC, Muotri AR, Vasconcelos DeM, de Oliveira ZN, Machado MC, et al. Identification of XP complementation groups by recombinant adenovirus carrying DNA repair genes. J Invest Dermatol. 2009;129(2):502-6.
83. Chavanne F, Broughton BC, Pietra D, Nardo T, Browitt A, Lehmann AR, et al. Mutations in the XPC gene in families with xeroderma pigmentosum and consequences at the cell, protein, and transcript levels. Cancer Res. 2000;60(7):1974-82.
84. Soufir N, Ged C, Bourillon A, Austerlitz F, Chemin C, Stary A, et al. A prevalent mutation with founder effect in xeroderma pigmentosum group C from north Africa. J Invest Dermatol. 2010;130(6):1537-42.
85. Santiago KM, França de Nóbrega A, Rocha RM, Rogatto SR, Achatz MI. Xeroderma pigmentosum: low prevalence of germline XPA mutations in a Brazilian XP population. Int J Mol Sci. 2015;16(4):8988-96.
86. Opletalova K, Bourillon A, Yang W, Pouvelle C, Armier J, Despras E, et al. Correlation of phenotype/genotype in a cohort of 23 xeroderma pigmentosum-variant patients reveals 12 new disease-causing POLH mutations. Hum Mutat. 2014;35(1):117-28.
87. Tanioka M, Masaki T, Ono R, Nagano T, Otoshi-Honda E, Matsumura Y, et al. Molecular analysis of DNA polymerase eta gene in Japanese patients diagnosed as xeroderma pigmentosum variant type. J Invest Dermatol. 2007;127(7):1745-51.
88. Gordon D. Viewing and editing assembled sequences using Consed. Curr Protoc Bioinformatics. 2003;Chapter 11:Unit11.2.
89. Machado M, Magalhães WC, Sene A, Araújo B, Faria-Campos AC, Chanock SJ, et al. Phred-Phrap package to analyses tools: a pipeline to facilitate population genetics re-sequencing studies. Investig Genet. 2011;2(1):3.

- 90.Machado G. Nas asas da esperança: A história de dor e resistência da comunidade de Araras. Second Edition ed. Goiania - GO: Kelps; 2011. 146 p.
- 91.DiGiovanna JJ, Kraemer KH. Shining a light on xeroderma pigmentosum. *J Invest Dermatol.* 2012;132(3 Pt 2):785-96.
- 92.Webb S. Xeroderma pigmentosum. *BMJ.* 2008;336(7641):444-6.
- 93.Broughton BC, Cordonnier A, Kleijer WJ, Jaspers NG, Fawcett H, Raams A, et al. Molecular analysis of mutations in DNA polymerase eta in xeroderma pigmentosum-variant patients. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002;99(2):815-20.
- 94.Andrade-Lima LC, Andrade LN, Menck CF. ATR suppresses apoptosis after UVB irradiation by controlling both translesion synthesis and alternative tolerance pathways. *J Cell Sci.* 2015;128(1):150-9.
- 95.Calmels N, Greff G, Obringer C, Kempf N, Gasnier C, Tarabeux J, et al. Uncommon nucleotide excision repair phenotypes revealed by targeted high-throughput sequencing. *Orphanet J Rare Dis.* 2016;11:26.
- 96.Wheless L, Kistner-Griffin E, Jorgensen TJ, Ruczinski I, Berthier-Schaad Y, Kessing B, et al. A community-based study of nucleotide excision repair polymorphisms in relation to the risk of non-melanoma skin cancer. *J Invest Dermatol.* 2012;132(5):1354-62.
- 97.Chang DW, Gu J, Wu X. Germline prognostic markers for urinary bladder cancer: obstacles and opportunities. *Urol Oncol.* 2012;30(4):524-32.
- 98.Cleaver JE, Feeney L, Tang JY, Tuttle P. Xeroderma pigmentosum group C in an isolated region of Guatemala. *J Invest Dermatol.* 2007;127(2):493-6.
- 99.Nishigori C, Moriwaki S, Takebe H, Tanaka T, Imamura S. Gene alterations and clinical characteristics of xeroderma pigmentosum group A patients in Japan. *Arch Dermatol.* 1994;130(2):191-7.
- 100.Messaoud O, Ben Rekaya M, Cherif W, Talmoudi F, Boussen H, Mokhtar I, et al. Genetic homogeneity of mutational spectrum of group-A xeroderma pigmentosum in Tunisian patients. *Int J Dermatol.* 2010;49(5):544-8.
- 101.Sato M, Nishigori C, Yagi T, Takebe H. Aberrant splicing and truncated-protein expression due to a newly identified XPA gene mutation. *Mutat Res.* 1996;362(2):199-208.
- 102.Hirai Y, Kodama Y, Moriwaki S, Noda A, Cullings HM, Macphee DG, et al. Heterozygous individuals bearing a founder mutation in the XPA DNA repair gene comprise nearly 1% of the Japanese population. *Mutat Res.* 2006;601(1-2):171-8.
- 103.Soltys DT, Rocha CR, Lerner LK, de Souza TA, Munford V, Cabral F, et al. Novel XPG (ERCC5) mutations affect DNA repair and cell survival after ultraviolet but not oxidative stress. *Hum Mutat.* 2013;34(3):481-9.
- 104.Kleijer WJ, Laugel V, Berneburg M, Nardo T, Fawcett H, Gratchev A, et al. Incidence of DNA repair deficiency disorders in western Europe: Xeroderma pigmentosum, Cockayne syndrome and trichothiodystrophy. *DNA Repair (Amst).* 2008;7(5):744-50.

- 105.Vaisman A, Masutani C, Hanaoka F, Chaney SG. Efficient translesion replication past oxaliplatin and cisplatin GpG adducts by human DNA polymerase η . *Biochemistry*. 2000;39(16):4575-80.
- 106.Bassett E, King NM, Bryant MF, Hector S, Pendyala L, Chaney SG, et al. The role of DNA polymerase η in translesion synthesis past platinum-DNA adducts in human fibroblasts. *Cancer Res*. 2004;64(18):6469-75.
- 107.Chen YW, Cleaver JE, Hanaoka F, Chang CF, Chou KM. A novel role of DNA polymerase η in modulating cellular sensitivity to chemotherapeutic agents. *Mol Cancer Res*. 2006;4(4):257-65.
- 108.Wang D, Lippard SJ. Cellular processing of platinum anticancer drugs. *Nat Rev Drug Discov*. 2005;4(4):307-20.
- 109.Batista LF, Kaina B, Meneghini R, Menck CF. How DNA lesions are turned into powerful killing structures: insights from UV-induced apoptosis. *Mutat Res*. 2009;681(2-3):197-208.
- 110.Revet I, Feeney L, Bruguera S, Wilson W, Dong TK, Oh DH, et al. Functional relevance of the histone gammaH2Ax in the response to DNA damaging agents. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011;108(21):8663-7.
- 111.Tomicic MT, Aasland D, Naumann SC, Meise R, Barckhausen C, Kaina B, et al. Translesion polymerase η is upregulated by cancer therapeutics and confers anticancer drug resistance. *Cancer Res*. 2014;74(19):5585-96.
- 112.Squires S, Coates JA, Goldberg M, Toji LH, Jackson SP, Clarke DJ, et al. p53 prevents the accumulation of double-strand DNA breaks at stalled-replication forks induced by UV in human cells. *Cell Cycle*. 2004;3(12):1543-57.
- 113.Laposa RR, Feeney L, Crowley E, de Feraudy S, Cleaver JE. p53 suppression overwhelms DNA polymerase η deficiency in determining the cellular UV DNA damage response. *DNA Repair (Amst)*. 2007;6(12):1794-804.
- 114.Cordonnier AM, Fuchs RP. Replication of damaged DNA: molecular defect in xeroderma pigmentosum variant cells. *Mutat Res*. 1999;435(2):111-9.
- 115.Cruet-Hennequart S, Villalan S, Kaczmarczyk A, O'Meara E, Sokol AM, Carty MP. Characterization of the effects of cisplatin and carboplatin on cell cycle progression and DNA damage response activation in DNA polymerase η -deficient human cells. *Cell Cycle*. 2009;8(18):3039-50.
- 116.de Feraudy S, Revet I, Bezrookove V, Feeney L, Cleaver JE. A minority of foci or pan-nuclear apoptotic staining of gammaH2AX in the S phase after UV damage contain DNA double-strand breaks. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010;107(15):6870-5.
- 117.Quinet A, Vessoni AT, Rocha CR, Gottifredi V, Biard D, Sarasin A, et al. Gap-filling and bypass at the replication fork are both active mechanisms for tolerance of low-dose ultraviolet-induced DNA damage in the human genome. *DNA Repair (Amst)*. 2014;14:27-38.
- 118.Fassihi H, Sethi M, Fawcett H, Wing J, Chandler N, Mohammed S, et al. Deep phenotyping of 89 xeroderma pigmentosum patients reveals unexpected heterogeneity dependent on the precise molecular defect. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2016;113(9):E1236-45.