

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**  
**INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS**  
**PROGRAMA INTERUNIDADES DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOINFORMÁTICA**

**CAMILA CORRADI**

**Análise da mutagênese e assinatura mutacional em fibroblastos e tumores de  
pacientes xeroderma pigmentosum variante**

**Versão Corrigida**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa Interunidades de Pós-Graduação em Bioinformática da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutora em Ciências.

Área de Concentração: Bioinformática

Orientador: Prof. Dr. Carlos Frederico Martins Menck

São Paulo  
2024

## RESUMO

O DNA sofre exposição contínua à influência de fatores endógenos e exógenos, levando a danos que perturbam os processos de transcrição e replicação. A radiação UVA do Sol pode induzir danos diretos ao DNA, incluindo a formação de dímeros de ciclobutano pirimidina (CPD), e danos indiretos através da oxidação de bases nitrogenadas, proteínas e outras biomoléculas. Além da via de reparo por excisão de nucleotídeos, que pode corrigir esses danos, as células empregam mecanismos de tolerância como a síntese translesão (TLS). Durante o processo de replicação, a TLS recruta polimerases especializadas capazes de contornar lesões, prevenindo, assim, o colapso da forquilha replicativa. Deficiências no gene *POLH*, que codifica a DNA polimerase  $\eta$  (pol eta), uma polimerase fundamental da TLS, resultam em uma rara síndrome autossômica recessiva conhecida como xeroderma pigmentosum variante (XP-V). A ausência da pol eta resulta em um aumento significativo na incidência de câncer de pele em pacientes XP-V devido à sua capacidade reduzida de replicar DNA danificado. Além disso, observou-se redução na capacidade de remoção de dímeros de pirimidina induzidos pela radiação UVA, enfatizando o impacto substancial da ausência desta polimerase na mutagênese destas células. Neste estudo, empregamos o sequenciamento do exoma de fibroblastos XP-V e XP-V complementados com pol eta funcional, cultivados por seis meses em condições isentas de radiação UV ou exposição direta à luz visível. Com essa abordagem, investigamos a mutagênese espontânea que ocorreu nestas células. Os resultados destacaram um notável aumento nas mutações endógenas na linhagem XP-V em comparação com sua contraparte isogênica complementada. A mera ausência de pol eta resulta em um aumento significativo nas mutações C>A, C>T e T>C, e o perfil mutacional dos clones XP-V se distancia consideravelmente de qualquer assinatura mutacional anteriormente registrada. Em experimento independente, as mesmas linhagens foram submetidas à irradiação UVA, com um grupo pré-tratado com o antioxidante N-acetilcisteína (NAC), seguido de clonagem celular e sequenciamento do exoma para identificar as mutações induzidas por UVA em condições de proteção ao estresse oxidativo. Como esperado, foi observado aumento significativo de mutações após a incidência da radiação UVA, efeito atenuado nos clones tratados previamente com NAC. Destacamos que o antioxidante NAC protege as células, fato observado pela redução expressiva das transversões C>A, bem como das transições C>T, sendo estas provavelmente causadas por dímeros de pirimidina não reparados. Por fim, conduzimos o sequenciamento do exoma de onze tumores de pele provenientes de um agrupamento genético de pacientes XP-V. A maioria desses tumores apresentou assinaturas mutacionais fortemente vinculadas à exposição à luz UV, juntamente com o previsível acúmulo de mutações C>T em regiões ricas dipirimidinas. Ressaltamos a prevalência notável do motivo C•A nas transversões C>A em carcinomas basocelulares XP-V, mais uma vez sugerindo a possível emergência de uma assinatura mutacional relacionada exclusivamente à ausência de pol eta.

**Palavras-chave:** Xeroderma pigmentosum variante. Mutagênese. Assinatura mutacional. Câncer de pele. Sequenciamento do exoma completo.

## ABSTRACT

DNA experiences continual exposure to the influence of both endogenous and exogenous factors, leading to damage that disrupts transcription and replication processes. UVA radiation from sunlight can induce direct DNA damage, including the formation of cyclobutane pyrimidine dimers (CPD), and indirect damage through the oxidation of nitrogenous bases, proteins, and other biomolecules. In addition to the nucleotide excision repair pathway, which can rectify such damage, cells employ tolerance mechanisms like Translesion Synthesis (TLS). During replication, TLS recruits specialized polymerases capable of bypassing lesions, thus preventing the collapse of the replicative fork. Deficiencies in the *POLH* gene, which encodes DNA polymerase  $\eta$  (pol eta), a key TLS polymerase, lead to a rare autosomal recessive syndrome known as xeroderma pigmentosum variant (XP-V). The absence of pol eta results in a significant increase in skin cancer in XP-V patients due to their reduced ability to replicate damaged DNA. Furthermore, a decrease in the removal of pyrimidine dimers induced by UVA radiation has been observed, emphasizing the substantial impact of the absence of this polymerase on the mutagenesis of these cells. In this study, we conducted whole-exome sequencing on XP-V and XP-V fibroblasts complemented with functional pol eta, cultured for six months under conditions free of UV radiation and direct exposure to visible light. With this approach, we investigated the spontaneous mutagenesis occurring in these cells. The results unveiled a notable rise in endogenous mutations in the XP-V lineage compared to its complemented isogenic counterpart. The mere absence of pol eta resulted in a significant increase in C>A, C>T and T>C mutations, and the mutational profile of the XP-V clones diverges significantly from any previously documented mutational signature. In an independent experiment, the same cell lines were subjected to UVA irradiation, with one group pre-treated with the antioxidant N-acetylcysteine (NAC), followed by cell cloning and exome sequencing to identify UVA-induced mutations under oxidative stress protection conditions. As expected, a significant increase in mutations was observed after UVA exposure, with an attenuated effect in clones pre-treated with NAC. We emphasize that the antioxidant NAC protects cells, as evidenced by the significant reduction in C>A transversions and C>T transitions, likely caused by unrepaired pyrimidine dimers. Finally, we sequenced the exome of eleven skin tumors from a genetic cluster of XP-V patients. Most of these tumors exhibited mutational signatures strongly linked to UV light exposure, along with the predictable accumulation of C>T mutations in regions rich in pyrimidines. Notably, highlight the remarkable prevalence of the **C•A** motif in C>A transversions within XP-V basal cell carcinomas, once again suggesting the possible emergence of a mutational signature uniquely related to the absence of pol eta.

**Keywords:** Xeroderma pigmentosum. Mutagenesis. Mutational Signatures. Skin cancer. Whole-exome sequencing.