

ESTRESSE OXIDATIVO, LESÕES NO GENOMA E PROCESSOS DE SINALIZAÇÃO NO CONTROLE DO CICLO CELULAR**Carolina M. Berra e Carlos F. M. Menck**

Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, Av. Prof. Lineu Prestes, 1374, 05508-900 São Paulo - SP, Brasil

Paolo Di Mascio*

Departamento de Bioquímica, Instituto de Química, Universidade de São Paulo, Av. Prof. Lineu Prestes, 748, 05508-900 São Paulo - SP, Brasil

Recebido em 21/2/05; aceito em 16/12/05; publicado na web em 1/8/06

OXIDATIVE STRESS, GENOME LESIONS AND SIGNALING PATHWAYS IN CELL CYCLE CONTROL. The generation of reactive oxygen species (ROS) may be both beneficial to cells, performing functions in intracellular signaling and detrimental, modifying cellular biomolecules. ROS can cause DNA damage, such as base damage and strand breaks. Organisms respond to chromosome insults by activation of a complex and hierarchical DNA-damage response pathway. The extent of DNA damages determines cell fate: cell cycle arrest and DNA repair or cell death. The ATM is a central protein in the response to DNA double-strand breaks by acting as a transducer protein. Collected evidences suggest that ATM is also involved in the response to oxidative DNA damage.

Keywords: ATM; checkpoints; oxidative stress.

INTRODUÇÃO

As células vivas presentes em uma atmosfera rica em oxigênio estão constantemente expostas aos possíveis danos causados por espécies reativas de oxigênio (ROS – “reactive oxygen species”), que podem ser originadas tanto exógena quanto endogenamente. As fontes exógenas de ROS incluem luz ultravioleta (UV) principalmente nos comprimentos de onda maiores que 280 nm – UVA e UVB, irradiação ionizante e agentes químicos. Já as ROS formadas intracelularmente podem ser originadas como consequência do próprio metabolismo celular, uma vez que elétrons provenientes da cadeia de transportes de elétrons, localizada na mitocôndria, podem interagir com várias moléculas intracelulares. ROS são também produzidas durante processos patológicos, como, por ex., o que ocorre em uma resposta inflamatória celular.

É importante salientar que ROS nem sempre são consequência do metabolismo celular, mas podem ser também geradas pelas oxidases (enzimas específicas da membrana plasmática) como resposta a fatores de crescimento e citocinas e, conseqüentemente, podem servir como segundo mensageiro em alguns processos específicos de sinalização celular¹. Em geral, deve-se notar que a geração intracelular de ROS, considerada normal em níveis fisiológicos, quando não é necessariamente lesiva, tem um importante papel vital, uma vez que essas espécies, nesses casos produzidas de forma controlada, atuam na regulação da sinalização celular e da expressão gênica¹.

ROS é um termo bastante amplo que abrange não somente radicais de oxigênio como radical hidroxila ($\cdot\text{OH}$), óxido nítrico ($\text{NO}\cdot$) e radical superóxido ($\text{O}_2\cdot^-$), mas também derivados do oxigênio que não são radicais, como peróxido de hidrogênio (H_2O_2), ácido hipocloroso (HOCl), ozônio (O_3) e oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$)², exemplificados na Tabela 1. Evolutivamente, foram selecionadas várias estratégias antioxidantes para as células lidarem com a toxicidade do oxigênio. Os agentes considerados como antioxidantes

compreendem: enzimas que removem cataliticamente radicais e espécies reativas, como por ex., as enzimas superóxido dismutase (SOD), glutatona redutase, glutatona peroxidase e catalases (Tabela 1); proteínas que minimizam a disponibilidade de pró-oxidantes, tais como íons ferro e íons cobre, como por ex., as transferrinas, ferritinas, metalotioneínas e haptoglobinas; proteínas que protegem processos celulares contra danos oxidativos através de outros mecanismos não enzimáticos, como por ex., as proteínas de estresse (“stress proteins”); moléculas de baixo peso molecular que possuem a capacidade de captar ROS via auto-oxidação, como por ex., glutatona e aquelas que possuem grupo tiol (SH), ou vitaminas como α -tocoferol, ácido ascórbico e β -caroteno.

Apesar da existência desses agentes e mecanismos antioxidantes, quando a formação de ROS excede a capacidade antioxidante celular, pode haver a geração de uma condição conhecida como estresse oxidativo, cujos resultados podem ser bastante danosos às células. Essa condição pode variar bastante entre organismos, tipos celulares e até mesmo entre células de um mesmo tecido, uma vez que a capacidade antioxidante das células pode ser bastante diversificada.

Os principais alvos de ROS incluem DNA, lipídeos, proteínas e açúcares, sendo que a ordem de preferência de ataque depende de muitos fatores, como o local onde a espécie reativa é gerada, a habilidade relativa de uma biomolécula ser oxidada e a disponibilidade de íons metálicos associados a essa biomolécula³. No entanto, enquanto lipídeos, proteínas e açúcares podem ser removidos via degradação, o mesmo não deve ocorrer com o DNA, uma vez que é a molécula responsável por todas as informações genéticas de todas as células de um organismo vivo.

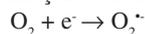
MECANISMOS DE REPARO DE DNA

Evolutivamente, foram selecionadas várias estratégias para tolerar ou reparar danos causados no material genético celular⁴. Dentre os vários mecanismos de reparo já descritos existem aqueles que atuam de forma a executar eficientemente a excisão completa dessas lesões⁵.

*e-mail: pdmascio@iq.usp.br

Tabela 1. Exemplos de formação e desativação enzimática de ROS[#]**Geração de ROS**

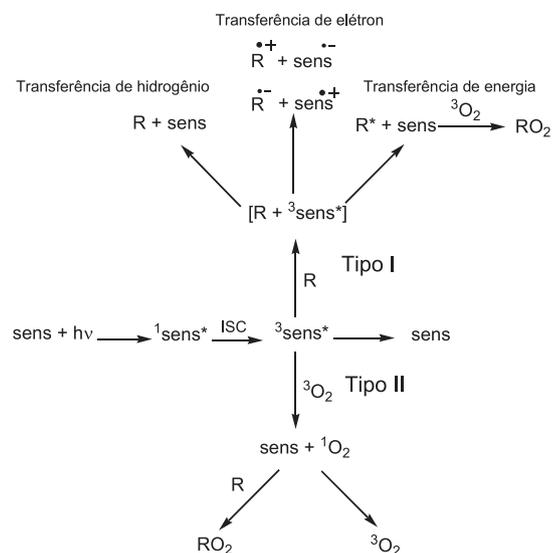
Formação de radical superóxido



Formação de radical hidroxila - Reação de Fenton



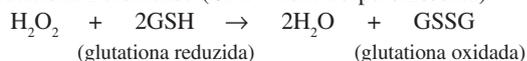
*Formação de oxigênio singlete por fotossensibilização Tipo II

**Proteção contra ROS**

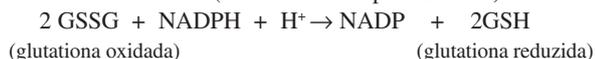
Superóxido Dismutase (SOD – citoplasma, mitocôndria)



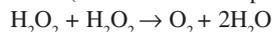
Glutationa Peroxidase (GPx – fora do peroxissoma)



Glutationa Redutase (GRd – fora do peroxissoma)



Catalase (CAT – dentro do peroxissoma)

[#] Adaptada das refs. 2 e 12

Representação esquemática dos mecanismos fotoquímicos do tipo I e do tipo II. Abreviaturas: hn: radiação incidente; sens: fotossensibilizador no estado fundamental; ¹sens: fotossensibilizador no estado singlete excitado; ³sens*: fotossensibilizador no estado triplete excitado; sens⁻: radical ânion do fotossensibilizador; sens⁺: radical cátion do fotossensibilizador; R: reagente; R⁻: radical ânion do substrato orgânico; R⁺: radical cátion do substrato orgânico; ISC: cruzamento intersistemas.

Sabe-se que bases oxidadas do DNA são primeiramente corrigidas pelo mecanismo de reparo por excisão de bases (BER – “base excision repair”), conhecido por atuar, principalmente, em modificações causadas por agentes endógenos. O mecanismo molecular do BER inicia-se, primeiramente, pelo reconhecimento e

excisão de bases danificadas pelas DNA glicosilases sem ou com atividade 3'-AP liase associada⁶. A excisão da base resulta em um sítio abásico (AP - apurínico ou apirimidínico) sem ou com incisão 3', que é reconhecido por outro grupo de enzimas, as AP-endonucleases, que fazem a incisão na extremidade 3' ou 5' do sítio AP, gerando uma lacuna. Esta é preenchida através de polimerização e ligação de novos nucleotídeos à sequência de DNA⁷.

O reparo por excisão de nucleotídeos (NER – “nucleotide excision repair”) é um dos mais importantes processos de reparo e tem sido intensamente estudado devido a sua versatilidade em operar, principalmente, em danos provocados por agentes exógenos que causam distorção da dupla-hélice do DNA, como por ex., aqueles causados por luz UV⁸. O processo do NER em eucariontes envolve a ação de mais de 30 proteínas que atuam em 5 passos sucessivos: reconhecimento da lesão; abertura da dupla hélice de DNA onde está localizada a lesão; dupla incisão distante alguns nucleotídeos dos lados 5' e 3' do sítio da lesão; síntese do novo DNA utilizando como molde a fita não danificada e ligação da porção 5' da nova fita sintetizada à cadeia pré-existente. O NER possui atividade heterogênea em regiões distintas do genoma e prossegue mais rapidamente e com maior fidelidade na fita transcrita de um gene ativo que na fita ou em um gene não transcrito. Esse processo, dependente da ação da RNA polimerase II (RNAPolII), denomina-se reparo acoplado à transcrição (TCR), que assegura um rápido reparo dos genes ativos em contraponto com o reparo do genoma global (GGR), iniciado por um complexo de reconhecimento diferente.

Outro mecanismo importante na proteção da molécula de DNA é o reparo por recombinação. Uma das lesões que pode ser reparada por esse mecanismo é a dupla quebra da cadeia de DNA criada por vários processos normais da célula ou por agentes exógenos, como irradiação ionizante. Existem dois caminhos envolvidos no reparo desse tipo de lesão: recombinação homóloga (HR – “homologous recombination”), que assegura um reparo bastante preciso; e junção de pontas não homólogas (NHEJ – “non-homologous end joining”), sujeito a erro⁷.

O reparo do emparelhamento errôneo de DNA (MMR – “mismatch repair”) corrige pares errôneos de bases e alças desemparelhadas no DNA, eventualmente introduzidos por erros de replicação, ou lesões que interfiram com a atividade replicativa das DNA polimerases. Também está envolvido em meiose e recombinação⁹.

Atualmente muitos pesquisadores vêm propondo a existência de interação entre os diferentes mecanismos de reparo de DNA. Por ex., embora TCR tenha sido inicialmente descrito como sendo responsável pela remoção de lesões induzidas por luz UV, é hoje reconhecido por ser um fenômeno mais geral que opera em outros tipos de lesões no DNA. Entre essas, podemos citar as lesões oxidativas geradas por irradiação ionizante ou induzidas por ROS como timina glicol (Tg) e 8-oxo-7,8-diidroguanosina (8-oxoGuo)¹⁰. Outro exemplo pode ser a interação entre NER e MMR, onde MSH2 (“mismatch repair protein 2”), uma proteína conhecida por estar envolvida em MMR, foi descrita por interagir fisicamente com alguns componentes do NER¹¹. Dessa forma, o que se sugere é que os mecanismos de reparo de DNA, apesar das suas preferências por determinadas lesões, trabalham de uma forma bastante integrada.

OXIDAÇÃO DO DNA

A indução de danos oxidativos nas bases do DNA ocorre a partir da sua reação com ROS. Essas lesões podem ocorrer devido à oxidação direta dos ácidos nucléicos ou, muitas vezes, podem levar à formação de quebras em uma das cadeias do DNA (quebras simples - SSB “single strand break”) ou quebras simples em posições aproximadamente simétricas nas duas cadeias do DNA (quebras

duplas - DSB “double strand break”). Além disso, quebras simples podem gerar quebras duplas durante a replicação celular.

Mais de 20 diferentes tipos de danos nas bases do DNA foram identificados após a exposição dessa biomolécula às diversas formas de estresses oxidativos, tanto *in vitro* quanto *in vivo*¹². A guanina, que exibe o menor potencial de ionização entre as bases nitrogenadas, tem sido a escolha preferencial dos estudos das reações de oxidação das purinas, uma vez que existem metodologias eficientes para a sua detecção. Desta forma, a guanina vem sendo utilizada como um bom exemplo de oxidação de bases nitrogenadas. O radical hidroxila ($\cdot\text{OH}$) é bastante empregado na geração de reações radiculares com a guanina presente tanto no “pool” de nucleosídeos (2'-deoxiguanosina, dGuo) formando 8-oxo-7,8-diidro-2'-deoxiguanosina (8-oxodGuo), quanto na sua forma nucleotídica (formando 8-oxoGuo)¹³. Oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$) também é capaz de reagir significativamente com a guanina em pH neutro¹⁴, sendo bastante empregado em estudos que envolvem oxidação de purinas. A formação de 8-oxodGuo pela exposição a elétrons livres é um processo que ocorre em uma menor escala, contudo, a hidratação de radicais catiônicos da guanina leva, predominantemente, à formação de 8-oxodGuo¹³⁻¹⁸ (Figura 1).

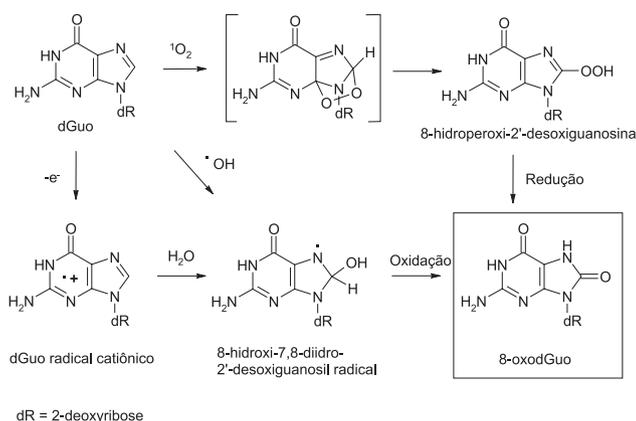


Figura 1. Reações de oxidação da 2'-desoxiguanosina (dGuo) com radical hidroxila ($\cdot\text{OH}$), elétron livre ($-e$) e oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$), na geração de 8-oxo-7,8-diidro-2'-desoxiguanosina (8-oxodGuo)

A guanina oxidada tem grande importância biológica, uma vez que pode causar emparelhamento errôneo com a adenina (A), gerando uma transversão de GC para TA. Além disso, aparentemente 8-oxodGuo é capaz de bloquear a transcrição¹⁰. Sabe-se que reparo de DNA está intimamente interligado com regulação do ciclo celular, transcrição e replicação, e que esses mecanismos usam, em parte, fatores comuns¹². Quando o tipo e a quantidade de danos superam a capacidade de reparo das células, esses mecanismos celulares essenciais podem ser seriamente afetados. Sendo assim, caso essas lesões não sejam removidas, podem levar as células à morte, ou resultarem na incorporação de mutações no genoma, sendo transmitidas para as gerações futuras. Mais ainda, essas mutações podem provocar efeitos genotóxicos severos e, conseqüentemente, gerar instabilidade genômica e até aparecimento de câncer⁸.

A PROTEÍNA ATM E O CONTROLE DOS “CHECKPOINTS” DO CICLO CELULAR

Problemas genéticos que perturbam os mecanismos de reparo estão quase que invariavelmente associados a síndromes severas, normalmente caracterizadas pela degeneração de tecidos (especialmente do sistema nervoso e sistema imunológico), alta sensibili-

dade a certos agentes genotóxicos, envelhecimento precoce, instabilidade cromossômica, retardo no desenvolvimento, malformação e predisposição a câncer¹⁹. Como exemplos dessas síndromes, podemos citar xeroderma pigmentosum (XP), síndrome de Cockayne (CS), tricotiodistrofia (TTD) – que são associadas a alterações no mecanismo de NER; síndrome de Bloom (BS) – ligada a problemas no reparo por recombinação homóloga; ataxia telangectasia (AT) – geneticamente descrita por apresentar mutação na proteína ATM (“ataxia telangectasia mutated”) associada ao mecanismo celular de resposta a lesões no DNA¹⁹.

Atenção especial tem sido dada à proteína ATM, devido ao seu papel central na cascata de sinalização de uma das lesões mais citotóxicas, a quebra da dupla fita de DNA²⁰. Fenotipicamente os pacientes apresentam degeneração cerebelar - que leva a uma severa disfunção neuromotora progressiva-, imunodeficiência, instabilidade genômica, alta incidência de tumores malignos, sensibilidade à radiação ionizante e a agentes que induzem quebra da dupla fita de DNA¹⁹.

A proteína ATM é homóloga a integrantes da família das fosfatidilinositol 3'-quinases e apresenta atividade quinase induzida por irradiação ionizante²¹. Além disso, os membros dessa família, em vários aspectos, estão envolvidos na detecção de danos no DNA e controle da progressão do ciclo celular^{22,23}. Esse mecanismo de detecção e sinalização dos danos, conhecido como “checkpoint” (traduzido como pontos de verificação), representa a primeira resposta celular contra lesões no DNA, seguida da consequente ativação de uma rede intrínca de sinalização. Ao mesmo tempo, o “checkpoint” permite que as células parem o ciclo celular e ganhem tempo para reparar os danos, antes de recomeçar o ciclo e completar eventos subseqüentes, como replicação de DNA e mitose²¹. Recentemente, tem-se demonstrado que o controle de “checkpoints” também está envolvido em muitas outras vias, como no controle da ativação dos mecanismos de reparo de DNA, no posicionamento das proteínas de reparo no local do DNA lesado, no controle da transcrição gênica, no posicionamento e comprimento dos telômeros e, em alguns casos, na indução da morte celular via apoptose²⁴. Dessa forma, o *checkpoint* compreende uma sub-rotina que integra não somente respostas a danos, mas também caminhos essenciais para a sobrevivência celular. Para ativar ao mesmo tempo tantas vias de sinalização existe um sofisticado sistema sensor e transdutor que converte, simultaneamente, o sinal celular de danos para vários efetores¹ (Figura 2).

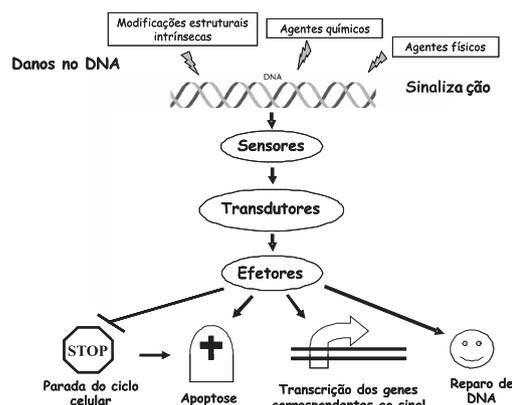


Figura 2. Esquema geral dos mecanismos propostos para sinalização da presença de danos no DNA. As setas representam eventos de ativação, enquanto que a seta cortada representa evento de inibição. Adaptado da ref. 24

As proteínas sensoras, que detectam inicialmente alterações na estrutura do DNA e iniciam o processo de sinalização, ainda são

desconhecidas, mas existem muitos candidatos para essa função, como PARP (poli[ADP-ribose] polimerase), DNA-PK (proteína quinase dependente de DNA), BRCA1 (“breast cancer associated gene 1”), o complexo Nbs1-MRE11-RAD50, e as MSH2/6 (“mismatch repair protein” 2 e 6) e MLH2 (homóloga à proteína MutL de *E. coli*) que são proteínas envolvidas no reparo de bases desemparelhadas (MMR)²⁴.

Ao contrário das proteínas sensoras, o conhecimento sobre o processo de transdução dos sinais de danos está um pouco mais avançado. No caso de dupla quebra no DNA, sabidamente gerada por irradiação ionizante ou por erro de replicação, a proteína ATM parece ter um papel central nesse sistema como sendo uma das primeiras transdutoras da presença do dano via fosforilação de vários efetores. O controle preciso e decisivo dessa proteína inicia-se com a ativação e estabilização de p53 que, entre suas atividades, atua como fator de transcrição. ATM também é capaz de fosforilar a histona H2AX, um processo que parece ser essencial no recrutamento de fatores de reparo, como RAD51 e BRCA1^{25,26}. Outro substrato da proteína ATM é a CHK2, uma proteína quinase relacionada ao “checkpoint” na transição da fase G1/S e da fase S e que, por sua vez, também fosforila p53. Além disso, ATM pode ativar a proteína BRCA1, que é uma das reguladoras do “checkpoint” das fases S e G2/M¹⁹. A lista de substratos alvos de ATM é bastante vasta e esses exemplos ilustram algumas vias de sinalização. Contudo, muitas respostas dependentes dessa proteína ainda são desconhecidas.

A PROTEÍNA ATM NA RESPOSTA AO ESTRESSE OXIDATIVO

Alguns autores sugerem que a proteína ATM, além de estar envolvida na sinalização de quebra na dupla fita de DNA, também está envolvida na resposta celular a danos oxidativos, uma vez que células deficientes nessa proteína são hipersensíveis aos efeitos tóxicos do peróxido de hidrogênio, do óxido nítrico e do superóxido. Além disso, essas células re-sintetizam glutatona de uma forma extremamente lenta, após a depleção com maleato dietil²¹. Mais ainda, camundongos que possuem mutação no gene *ATM* apresentam altos índices de estresse oxidativo, principalmente em tecidos alvo como o cerebelo, profundamente afetado em pacientes AT²⁷.

Corroborando essa hipótese, Shackelford e colaboradores²¹ verificaram que células deficientes no gene *ATM* não apresentam “checkpoints” relacionados às fases G1 e G2 ou indução de p53 após exposição ao agente oxidante *t*-butil-hidroperóxido, sugerindo que estes pontos de checagem sejam os momentos cruciais da sinalização a estresse oxidativo e da ativação dos subsequentes efetores do mecanismo de sinalização a esse tipo de lesões. Assim, os autores sugerem que a sensibilidade aumentada a agentes oxidantes de pacientes AT está relacionada à falha do mecanismo de verificação.

Contudo, não se sabe ainda se ATM responde diretamente ao dano no DNA ou se responde às alterações do estado redox celular, independente do dano em si²¹. Um bom exemplo dessa situação são os estudos realizados com tumores sólidos onde, internamente, a concentração de oxigênio varia consideravelmente. Hammond e colaboradores²⁸ demonstraram que a reoxigenação de tumores provoca danos oxidativos detectáveis nesses tecidos, levando a uma resposta rápida de indução da sinalização de lesão no DNA. Esses autores sugerem que essa indução ocorre através da ativação de ATM via detecção de ROS, uma vez que, na ausência dessa proteína, há diminuição da fosforilação de p53. Contudo, ainda não se sabe ao certo quais são os agentes específicos que reconhecem os danos e ativam toda essa cascata de sinalização. Este é um dos pontos cruciais para elucidar os mecanismos que envolvem a sinalização celular de lesões oxidativas via ATM.

QUESTÕES EM ABERTO E PERSPECTIVAS

Os caminhos pelos quais as células percebem e transmitem os sinais de danos no DNA começaram a ser o foco de atenção de muitos grupos de pesquisa. Considerável progresso tem ocorrido quanto ao entendimento dos componentes de resposta a danos em eucariontes. Hoje se admite que o controle dos “checkpoints”, que inicialmente se acreditava estar comprometido apenas com o controle da progressão do ciclo celular, parece ser um dos mecanismos que integram um conjunto de respostas celulares a danos no DNA. Contudo, o modo como os danos no DNA ativam os mecanismos de resposta celular é uma das principais questões a serem elucidadas nos próximos anos. Por ex., como os sensores reconhecem uma lesão? Existem sensores específicos para lesões específicas ou diferentes lesões podem ser reconhecidas por um número pequeno de sensores que são capazes de amplificar o sinal recrutando diferentes transdutores?

Outro ponto ainda bastante obscuro do mecanismo de resposta aos danos é a relação entre detecção do dano e recrutamento dos mecanismos de reparo de DNA. Como é feita a relação entre os sensores e as proteínas de reparo, uma vez que estas também necessitam ter acesso direto ao DNA? Seriam os danos no DNA em si os sinais ou seriam os processos de reparo que ativariam esse mecanismo de resposta? Da mesma forma que a célula tem um mecanismo que percebe os danos, não deveria ter também um mecanismo que percebe quando o DNA foi reparado para que a célula retome o seu metabolismo normal e volte a ter um ciclo completo? Se esse mecanismo é o próprio reparo ou se é algum outro mecanismo associado ao reparo, isso ainda precisa ser averiguado.

Outras questões estão relacionadas à ativação das proteínas quinases. Como é a regulação da ativação de uma determinada proteína em resposta a um certo dano? Como elas reconhecem um determinado substrato para a posterior fosforilação. Como é feita a seleção de substratos específicos?

Apesar do considerável progresso no entendimento das respostas moleculares aos estresses celulares, muito ainda precisa ser estudado para um melhor entendimento da relação entre estresse celular, controle da transição do ciclo celular, reparo de DNA e decisão entre sobrevivência ou morte.

AGRADECIMENTOS

À FAPESP, ao CNPq, ao PRONEX/FINEP e CNPq - Instituto do Milênio Redoxoma. P. Di Mascio e C. M. Berra são bolsistas da John Simon Guggenheim Memorial Foundation e da FAPESP, respectivamente.

REFERÊNCIAS

1. Barzilai, A.; Yamamoto, K.-I.; *DNA Repair* **2004**, *3*, 1109.
2. Halliwell, B.; Gutteridge, J. M. C.; *Free Radicals in Biology and Medicine*, Oxford University Press: Oxford, 1999.
3. Evans, M. D.; Dizdaroglu, M.; Cooke, M. S.; *Mutat. Res.* **2004**, *567*, 1.
4. De Laat, W. L.; Jaspers, N. G. J.; Hoeijmakers, J. H. J.; *Genes Dev.* **1999**, *13*, 768.
5. Friedberg, E. C.; *Nature* **2003**, *421*, 436.
6. Lindahl, T.; Wood, R. D.; *Science* **1999**, *286*, 1897.
7. Costa, R. M. A.; Lima, W. C.; Vogel, C. I. G.; Berra, C. M.; Luche, D. D.; Medina-Silva, R.; Galhardo, R. S.; Menck, C. F. M.; Oliveira, V. R.; *Gen. Mol. Biol.* **2001**, *24*, 131.
8. Costa, R. M. A.; Chigaças, V.; Galhardo, R. S.; Carvalho, H.; Menck, C. F. M.; *Biochimie* **2003**, *85*, 1083.
9. Buermeyer, A. B.; Deschênes, S. M.; Baker, S. M.; Liskay, R. M.; *Annu. Rev. Genet.* **1999**, *33*, 533.
10. Le Page, F.; Kwok, E. E.; Avrutskaya, A.; Gentil, A.; Leadon, S. A.; Sarasin, A.; Cooper, P. K.; *Cell* **2000**, *101*, 159.

11. Bertrand, P.; Tishkoff, D. X.; Filosi, N.; Dasgupta, R.; Kolodner, R. D.; *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1998**, *95*, 14278.
12. Slupphaug, G.; Kavli, B.; Krokan, H. E.; *Mutat. Res.* **2003**, *531*, 231.
13. Cadet, J.; Douki, T.; Gasparutto, D.; Ravanat, J.-L.; *Mutat. Res.* **2003**, *531*, 5.
14. Ravanat, J.-L.; Martinez, G. R.; Medeiros, M. H. G.; Di Mascio, P.; Cadet, J.; *Arch. Biochem. Biophys.* **2004**, *423*, 23.
15. Martinez, G. R.; Medeiros, M. H. G.; Ravanat, J.-L.; Cadet, J.; Di Mascio, P.; *Biol. Chem.* **2002**, *383*, 607.
16. Ravanat, J.-L.; Sauvaigo, S.; Caillat, S.; Martinez, G. R.; Medeiros, M. H. G.; Di Mascio, P.; Favier, A.; Cadet, J.; *Biol. Chem.* **2004**, *385*, 17.
17. Ravanat, J.-L.; Di Mascio, P.; Martinez, G. R.; Medeiros, M. H. G.; Cadet, J.; *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 40601.
18. Martinez, G. R.; Loureiro, A. P. M.; Marques, S. A.; Miyamoto, S.; Yamaguchi, L. F.; Onuki, J.; Almeida, E. A.; Garcia, C. C. M.; Barbosa, L. F.; Medeiros, M. H. G.; Di Mascio, P.; *Mutat. Res.* **2003**, *544*, 115.
19. Shiloh, Y.; *Nat. Rev. Cancer* **2003**, *3*, 155.
20. Barzilai, A.; Rotman, G.; Shiloh, Y.; *DNA Repair* **2002**, *1*, 3.
21. Shackelford, R. E.; Innes, C. L.; Sieber, S. O.; Heinloth, A. N.; Leadon, S. A.; Paules, R. S.; *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 21951.
22. Keith, C. T.; Schreiber, S. L.; *Science* **1995**, *270*, 50.
23. Savitsky, K.; Sfez, S.; Tagle, D. A.; Ziv, Y.; Sarti, A.; Collins, F. S.; Shiloh, Y.; Rotman, G.; *Hum. Mol. Genet.* **1995**, *4*, 2025.
24. Zhou, B.-B. S.; Elledge, S. J.; *Nature* **2000**, *408*, 433.
25. Redon, C.; Pilch, D. R.; Rogakou, E.; Sedelnikova, O. A.; Newrock, K.; Bonner, W. M.; *Curr. Opin. Genet. Dev.* **2002**, *12*, 162.
26. Celeste, A.; Petersen, S.; Romanienko, P. J.; Fernandez-Capetillo, O.; Chen, H. T.; Sedelnikova, O. A.; Reina-San-Martin, B.; Coppola, V.; Meffre, E.; Difilippantonio, M. J.; Redon, C.; Pilch, D. R.; Orlan, A.; Eckhaus, M.; Camerini-Otero, R. D.; Tessarollo, L.; Livak, F.; Manova, K.; Bonner, W. M.; Nussenzweig, M. C.; Nussenzweig, A.; *Science* **2002**, *296*, 922.
27. Barlow, C.; Dennery, P. A.; Shigenaga, M. K.; Smith, M. A.; Morrow, J. D.; Roberts, L. J.; Wynshaw-Boris, A.; Levine, R. L.; *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1999**, *96*, 9915.
28. Hammond, E. M.; Dorie, M. J.; Giaccia, A. J.; *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 12207.