

Vías de reparación del ADN: nuevos blancos en la terapia contra el cáncer

José Díaz Chávez,* Guadalupe Domínguez Gómez**

RESUMEN

La quimiorresistencia y radiorresistencia de las células cancerosas son los principales obstáculos en el tratamiento y manejo del cáncer. Un importante mecanismo que permite el desarrollo de resistencia a la terapia es que las células cancerosas reconocen el daño al ADN inducido por agentes quimioterapéuticos y por la radiación ionizante y lo reparan mediante la activación de diversas vías de reparación de ADN. Por tanto, inhibidores de vías específicas de reparación del ADN podrían aumentar la eficacia de los agentes quimioterapéuticos que inducen lesiones en el ADN, así como revertir la resistencia terapéutica asociada con la reparación del ADN. En este artículo se revisan las principales vías de reparación y se discuten los avances recientes en el desarrollo de nuevos inhibidores de las vías de reparación del ADN, muchos de los cuales se encuentran actualmente en fases preclínicas y clínicas de investigación.

Palabras clave: reparación, ADN, cáncer.

ABSTRACT

Increased chemo-resistance and radio-resistance of cancer cells is a major obstacle in the treatment and management of cancer. An important mechanism that underlies the development of such therapeutic resistance is that cancer cells recognize DNA lesions induced by DNA-damaging agents and by ionizing radiation, and repair these lesions by activating various DNA repair pathways. Therefore, inhibitors of specific DNA repair pathways might prove efficacious when used in combination with DNA-damaging chemotherapeutic drugs and reversing the associated therapeutic resistance associated with DNA repair. This paper reviews the major DNA repair pathways and discusses recent advances in the development of novel inhibitors of DNA repair pathways; many of these agents are under preclinical/clinical investigation.

Key words: repair, DNA, cancer.

Los agentes que dañan el ADN, predominantemente radiación y quimioterapias citotóxicas, se han utilizado exitosamente en el tratamiento de pacientes con una gran variedad de tumores durante varias décadas y continúan

siendo clave en los protocolos actuales de tratamiento contra el cáncer. Sin embargo, aunque estos tratamientos poseen cierta selectividad por la inducción de muerte en células tumorales, la utilidad clínica de tales agentes es frecuentemente limitada por ocasionar efectos adversos en tejidos normales. El resultado de los efectos colaterales puede ser grave, incluye toxicidad en el sistema gastrointestinal y hematopoyético, lo que limita el grado de eficacia que puede lograrse clínicamente. Además, existen múltiples mecanismos (regulación de las concentraciones del fármaco, defectos en la apoptosis o en las vías de reparación del daño al ADN) por los cuales los tumores desarrollan resistencia y, por tanto, los pacientes dejan de responder al tratamiento. En consecuencia, se han buscado alternativas que incrementen la potencia de las terapias de daño al ADN sobre el tejido tumoral sin afectar las células normales. Tales estrategias no sólo deben incrementar la eficacia sin toxicidad, sino también proveer la oportunidad de mantener la respuesta al tratamiento, disminuyendo la dosis de la quimioterapia.

* Investigador en Ciencias Médicas.

** Ayudante de Investigación.
Unidad de Investigación Biomédica en Cáncer, Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM/Instituto Nacional de Cancerología.

Correspondencia: Dr. José Díaz Chávez. Instituto Nacional de Cancerología. Av. San Fernando 22, colonia Sección XVI, CP 14080, México, DF.

Correo electrónico: josediaz030178@hotmail.com

Recibido: junio, 2010. Aceptado: octubre, 2010.

Este artículo debe citarse como: Díaz-Chávez J, Domínguez-Gómez G. Vías de reparación del ADN: nuevos blancos en la terapia contra el cáncer. Rev Esp Med Quir 2010;15(4):221-227.

www.nietoeditores.com.mx

Esto ayudaría a reducir los efectos adversos indeseables asociados con la administración de estos fármacos a la máxima dosis tolerada.¹

Factores ambientales, tales como la luz UV y agentes oxidantes, o errores en los procesos de replicación, exponen constantemente a las células a bajos niveles de daño al ADN. Para sobrevivir a estas situaciones de daño al ADN inducido o espontáneo, las células han desarrollado mecanismos complejos para vigilar la integridad del ADN activando vías de reparación si el ADN no es totalmente replicado o si se detecta un daño en él. Frecuentemente la respuesta celular al daño al ADN y la reparación del mismo son referidas como vía de señalización que requiere un gran número de proteínas sensoras, transductoras y efectoras, las cuales forman una red de interacciones entre varias vías. En la última década, se ha incrementado exponencialmente el interés –y por lo tanto el conocimiento– en estos procesos, por lo que han surgido nuevas oportunidades terapéuticas para agentes que regulan estas vías.^{2,3}

PRINCIPALES TIPOS DE DAÑO AL ADN INDUCIDO POR EL TRATAMIENTO CONTRA EL CÁNCER

Daño al ADN por rompimientos de doble cadena del ADN y cadena sencilla

Los rompimientos de doble cadena del ADN (RDCs), pueden conducir a la muerte celular o a la pérdida de brazos de cromosomas, translocaciones, es decir, inestabilidad genómica si no se reparan.⁴ Los RDCs pueden ser inducidos directa o indirectamente por muchos agentes anticancerígenos. Los RDCs directos pueden ser inducidos por radiación ionizante, luz UV (terapia fotodinámica), radicales libres y agentes radiomiméticos como la bleomicina.⁵ Los RDCs son causados por ciertos anticancerígenos de manera selectiva sobre las células que están proliferando (durante la fase S) impidiendo la progresión de la replicación o transcripción. Los RDCs indirectos son también conocidos como RDCs asociados con la replicación, éstos se forman después de un daño inicial al ADN. Por ejemplo, cuando una horquilla de replicación se encuentra un rompimiento de cadena sencilla (RCS) sobre la cadena líder del ADN templado, ésta puede colapsar, convirtiendo al RCS en un RDC,

estos pueden ser inducidos por tratamiento con radiación ionizante o bleomicina.⁶⁻⁸

Modificaciones de bases, entrecruzamientos intra-cadena, intercadena y ADN-proteína

Muchos agentes terapéuticos pueden modificar bases del ADN, intercalarse entre ellas, o formar entrecruzamientos entre bases vecinas. Tales lesiones del ADN también pueden bloquear la progresión de horquillas de replicación durante la fase S del ciclo celular, produciendo indirectamente RDCs.⁹ Por ejemplo, los agentes alquilantes comúnmente utilizados en tratamientos clínicos pueden modificar una sola base, entrecruzar dos diferentes bases o también entrecruzar ADN con proteína, dependiendo de la estructura molecular específica del compuesto.¹⁰ Los Agentes alquilantes actualmente usados en quimioterapia pertenecen a las siguientes familias: mostazas nitrogenadas (ciclofosfamida, ifosfamida, busulfan, etc.), nitrosoureas (BCNU [bis-cloronitrosourea o carmustina]), aziridinas (mitomicina C), triazenos y compuestos de platino (cisplatino, carboplatino y oxaliplatino).¹¹

Bloqueo del metabolismo de nucleótidos y síntesis de ADN

El daño al ADN también puede ser inducido por agentes que en lugar de ocasionar daño directo al ADN, inhiben su síntesis teniendo como blanco enzimas o complejos ADN-proteína que son requeridos para la replicación del ADN. Por ejemplo, antifolatos (metrotrexato), fluoropirimidinas (5-fluorouracilo), gemcitabina, análogos de adenosina, etc. Los cuales son utilizados como agentes quimioterapéuticos basados en su capacidad para bloquear el metabolismo de las vías de nucleótidos y secundariamente conducen a lesiones como RDCs.¹² Otro mecanismo que interfiere con los procesos de replicación y transcripción es mediado por inhibidores de topoisomerasas.¹³ Las topoisomerasas son enzimas que deshacen la torsión de la doble hélice del ADN y relajan el superenrollamiento del ADN durante la replicación y transcripción por medio de rompimientos transitorios del ADN.¹⁴ Los inhibidores de estas enzimas evitan la ligación de estos rompimientos de ADN, ocasionando RCSs transitorios o RDCs persistentes. Las antraciclina (doxorubicina y derivados) son inhibidores de la

topoisomerasa II, mientras la camptotecina y los derivados son inhibidores de la topoisomerasa I; estos agentes causan RDCs y son muy importantes en el tratamiento de algunos tipos de cáncer (cáncer de pulmón de células pequeñas, de ovario, etc.).¹³

PRINCIPALES VÍAS DE REPARACIÓN DEL ADN

Los RDCs directos son principalmente reparados por recombinación no homóloga (RNH), mientras RDCs asociados con el proceso de replicación son reparados por recombinación homóloga (RH). Los aductos de ADN son causados por agentes alquilantes, éstos pueden ser eliminados y reparados antes de que se lleve a cabo el proceso de replicación. Esto se lleva a cabo por la vía de reparación por escisión de bases (BER por sus siglas en inglés). La BER elimina una base o una secuencia corta conteniendo la base dañada. La vía de reparación por escisión de nucleótidos (NER por sus siglas en inglés) puede eliminar una cadena sencilla de ADN dañado con una longitud de 24-30 pares de bases. Otra vía de reparación importante es la vía de reparación directa (RD), la cual puede reparar el ADN dañado sin eliminar la base dañada.¹⁴

INHIBIDORES DE LA REPARACIÓN DEL ADN EN COMBINACIÓN CON COMPUESTOS ANTINEOPLÁSICOS CONVENCIONALES

El conocimiento básico de la reparación del ADN, desde cómo las lesiones de ADN son creadas a las vías que son capaces de reparar estas lesiones, se ha incrementado considerablemente en los últimos años. Este conocimiento permite pensar en combinaciones de agentes citotóxicos e inhibidores de reparación del ADN para potenciar la muerte de las células cancerosas. Varios inhibidores de la reparación del ADN están siendo evaluados en ensayos clínicos y preclínicos (Cuadro 1).

Sensibilizadores a agentes alquilantes

No obstante los efectos adversos causados por los agentes alquilantes en la médula ósea y otros tejidos normales, fármacos como ciclofosfamida, ifosfamida, melfalán, clorambucil y dacarbizina siguen siendo las

quimioterapias más prescritas en adultos y niños con tumores sólidos y enfermedades hematológicas, particularmente en combinación con antraciclinas y esteroides. Recientemente, un agente alquilante de ADN y metilador desarrollado en el decenio de 1980, temozolida (un fármaco oral que cruza la barrera hematoencefálica), cambió la práctica clínica en el tratamiento de gliomas de alto grado en adultos y niños.¹⁵ Otra clase de agentes que están siendo probados en ensayos clínicos en combinación con temozolida consiste en pseudosustratos para la O-6-metilguanina-ADN metiltransferasa (MGMT), una alquiltransferasa que remueve alquilaciones sobre la posición O6 de la guanina en la vía de reparación directa del ADN. Los compuestos con mejores expectativas son la O6-benzilguanina y lomeguatrib (AstraZeneca, Londres, Reino Unido); este último también es conocido como O6-(4-bromotenil) guanina o PaTrin-2.¹⁶ La resistencia a agentes alquilantes O6 puede ser revertida en modelos preclínicos por eliminación de MGMT y una relación entre la actividad de MGMT y la resistencia a nitrosoureas y agentes metilantes en células tumorales creciendo *in vitro* y modelos xerográficos.¹⁶ O6-benzilguanina y lomeguatrib recientemente se probaron en ensayos clínicos de fase I-II. En el caso de O6-benzilguanina, un ensayo clínico de fase I determinó no sólo la dosis máxima tolerada de temozolida cuando se combinó con O6-benzilguanina, sino también la dosis efectiva para eliminar completamente la actividad de la MGMT a las 48 h.¹⁷ Sin embargo, los resultados obtenidos también muestran que la combinación con la quimioterapia citotóxica de O6-benzilguanina y lomeguatrib causó mielosupresión significativa, por lo que se necesita una reducción significativa en las dosis de los agentes alquilantes prescritas de manera estándar en la quimioterapia.¹⁸ Por otro lado, también se está probando la combinación de temozolida con inhibidores de la poli(ADP-ribosa) polimerasa 1 (PARP1) en varios ensayos clínicos (Cuadro 1). PARP1 es necesario para una eficiente reparación del ADN por la vía BER, las lesiones al ADN inducidas por la temozolida son reparadas por esta vía por lo que la inhibición de PARP1 retarda la reparación de este tipo de daño. Los inhibidores de PARP1 que están siendo actualmente probados en combinación con temozolida son: GPI-21016 (Guilford Pharmaceuticals, Baltimore, Maryland, Estados Unidos),

Cuadro 1. Inhibidores de la reparación del ADN que están siendo evaluados en ensayos clínicos y preclínicos

<i>Compuesto (compañía)</i>	<i>Molécula blanco o vía de reparación</i>	<i>Monoterapia o combinación con compuestos antineoplásicos</i>	<i>Fase de ensayo clínico</i>	<i>Referencias</i>
AZD-2281 (AstraZeneca)	PARP	Gemcitabina Carboplatino Topotecan Monoterapia	Fase II Fase II Fase II Fase II	http://www.astrazenecaclinical-trials.com/article/525925.aspx
AG014699 (Pfizer)	PARP	Temozolomida Radiación ionizante Topotecan	Fase II Fase II Fase II	http://www.eddn.org/clinicalTr_caResUK.html
INO-1001 (Inotek)	PARP	Temozolomida	Fase I	http://www.inotekcorp.com/content/ino-1001.asp
BSI-201 (Bipar Sciences)	PARP	Monoterapia Gemcitabina-carboplatino	Fase I Fase II	http://www.biparsciences.com/BSI201.html
ABT-888 (Abbott Laboratories)	PARP	Temozolomida Compuestos de platino Ciclofosfamida Radiación ionizante MNNG Inhibidores de topoisomerasa I	Fase II Fase II Fase I Fase I Fase I Fase I	NCT00526617
TRC-102 (Tracon Pharma)	BER	Temozolomida Pemetrexed	Fase I Fase I	http://www.traconpharma.com/content/pipeline_overview.html
Lomeguatrib (AstraZeneca)	MGMT	Irinotecan Temozolomida	Fase I Fase II	http://www.astrazenecaclinical-trials.com/article/525925.aspx
O6-Benzilguanina	MGMT	Temozolomida	Fase II	http://clinicalstudies.info.nih.gov/cgi/detail.cgi?A_2006-C-0089.html
XL844 (Exelixis122)	CHK1, CHK2	Gemcitabina	Fase I planned	http://www.exelixis.com/pipeline_xl844.shtml

BER: reparación por escisión de bases; CHK: cinasa del checkpoint; MGMT: O-6-metilguanina-ADN metiltransferasa; PARP: poli(ADP-ribosa) polimerasa.

INO-1001 (Inotek Pharmaceuticals, Beverly, Massachusetts, Estados Unidos) y AG-014699 (Pfizer GRD, La Jolla, California, Estados Unidos).

Quimioterapia a base de platino

El cisplatino, carboplatino y oxaliplatino son los tres agentes quimioterapéuticos más comúnmente prescritos para tratar tumores sólidos. La resistencia a compuestos de platino es uno de los principales problemas clínicos y actualmente no existen agentes que puedan revertir esta resistencia. Sin embargo, recientemente un estudio preclínico demostró que los inhibidores de PARP en combinación con platino preferencialmente matan células tumorales induciendo completa o parcial regresión de una amplia variedad de tumores xenogénicos

en ratones desnudos.¹⁹ Por ejemplo, se ha demostrado que el ABT-888 (Abbott Laboratories, Chicago, Illinois, Estados Unidos), un potente inhibidor de PARP1 y PARP2, potencia la regresión de tumores tratados con temozolida, cisplatino o ciclofosfamida en modelos xenogénicos.²⁰ Aunque el mecanismo de cooperación entre los inhibidores de PARP y los compuestos antineoplásicos mencionados anteriormente aún no se han aclarado, estos resultados han dado lugar a la realización de estudios en fase clínica (Cuadro 1).

Radiosensibilizadores

La proteína cinasa ADN-dependiente (ADN-PK) es importante en la vía de reparación RNH cuando ocurre un daño inducido por radiación ionizante. Células de-

fectuosas en ADN-PK son muy sensibles a la radiación ionizante, lo que indica que la inhibición de ADN-PK podría sensibilizar tumores al tratamiento con radiación.²¹ Pequeñas moléculas que reversiblemente inhiben la actividad de ADN-PK se están utilizando en fases preclínicas finales e iniciando ensayos clínicos. En particular, NU7441 sensibiliza las células tumorales a inhibidores de la topoisomerasa II.²²

INHIBIDORES DE LA REPARACIÓN DEL ADN COMO MONOTERAPIA

Como se discutió anteriormente, la mayor parte de las pequeñas moléculas inhibitoras de la reparación del ADN se ha probado en ensayos clínicos como sensibilizadores de células tumorales a la quimioterapia. Sin embargo, el daño al ADN también se presenta espontáneamente en células en ausencia de tratamientos terapéuticos y las vías de reparación del ADN son, por tanto, esenciales para la sobrevivencia de las células sin tratamiento. Por lo que la reparación del ADN es un blanco ideal para inhibir la proliferación de células cancerosas donde los inhibidores de la reparación del ADN podrían ser exclusivamente tóxicos a las células cancerosas y, por tanto, asociarse con efectos adversos mínimos para los pacientes.

De hecho, los inhibidores de la reparación del ADN trabajan como agentes sencillos en pacientes con tumores defectuosos en alguna vía de reparación del ADN. El ejemplo más notable es el uso de los inhibidores de PARP para tratar pacientes con cáncer de mama y ovario hereditarios que presentan deficiencia de una de las copias silvestres de los genes *BRCA1* o *BRCA2*.²³ Las células con mutaciones de *BRCA1* y *BRCA2* presentan defectos en la vía de reparación por recombinación homóloga.²⁴ Estas células son cien a mil veces más sensibles a los inhibidores de PARP que las células que son heterocigotas o silvestres, lo que demuestra su potencial como tratamientos específicos de tumores con mutaciones de *BRCA1* o *BRCA2*.²⁵ Una explicación para esta sensibilidad es que los inhibidores de PARP inducen rompimientos de cadena sencilla que pueden convertirse en RDCs, los cuales serían normalmente reparados por recombinación homóloga, pero esta vía está bloqueada en células de cáncer deficientes de *BRCA1* o

BRCA2.²⁶ Estas observaciones han conducido a ensayos clínicos de fase II de monoterapia usando el inhibidor de PARP AZD2281 (AstraZeneca) que actualmente recluta pacientes con cáncer de mama y ovario, las cuales presentan mutaciones en *BRCA1* o *BRCA2*. Por otra parte el inhibidor de PARP1 AG014699 (Pfizer GRD) se está utilizando en otro estudio clínico de fase II que recluta pacientes portadoras de mutaciones de *BRCA1* o *BRCA2* con cáncer avanzado localmente o metastásico de ovario y mama. Sin embargo, no todos los pacientes con mutaciones en *BRCA1* o *BRCA2* responden a los inhibidores de PARP como monoterapia. Las razones están actualmente bajo investigación. Las células defectuosas en proteínas relacionadas con recombinación distintas a *BRCA1* o *BRCA2*, tales como *RAD51*, *RAD54*, *XRCC2*, *XRCC3*, *DSS1*, *ATM*, *ATR*, *CHK1*, *CHK2*, *NBS1* y componentes de la vía de reparación de anemia de Fanconi, también presentan un incremento en la sensibilidad a la inhibición de reparación del ADN.^{26,27} Esto sugiere que los inhibidores de PARP podrían también ser útiles en el tratamiento de varios tipos de tumores con defectos en la recombinación homóloga.

INHIBIDORES DE LAS VÍAS DE REPARACIÓN DE ROMPIMIENTOS DE DOBLE CADENA DEL ADN

La hipótesis de que el bloqueo del punto de control en G2 podría potenciar el efecto de compuestos que dañan el ADN surgió en la década de 1980 y fue reforzada en la de 1990. La cafeína se identificó como un inhibidor de *ATR* y *ATM*,²⁸ dos proteínas fundamentales en la respuesta a rompimientos de doble cadena. La cafeína causa que las células pasen a mitosis sin reparar el ADN, lo que resulta en apoptosis. Después de este trabajo, estudios adicionales demostraron radiosensibilización selectiva de células con *p53* mutado seguido de la inhibición del punto de control de G2 por el análogo de estaurosporina (*UCN-01*) y cafeína.^{29,30} Posteriormente, se descubrió que la proteína *Chk1*, otra proteína crítica en la respuesta a RDC, era uno de los blancos de *UCN-01*, reconociéndose así el potencial de *Chk1* como un blanco terapéutico.³¹ Actualmente, *UCN-01* se encuentra en estudios clínicos de fase I en combinación con perifosina en pacientes con recaída y leucemia aguda

resistente, así mismo en combinación con cisplatino en tumores sólidos y con irinotecan en casos de cáncer de mama triples negativos.³² En 2004, se identificó un inhibidor específico de ATM nombrado KU-55933. Este compuesto puede sensibilizar eficientemente células tumorales a la radiación y agentes quimioterapéuticos, tales como camptotecina y etopósido.³³

Dado que el complejo MRN es un componente clave de las vías de reparación de los rompimientos de doble cadena del ADN, es requerido para activación del punto de control en G2 del ciclo celular y además en los síndromes que se originan de las deficiencias de MRE11 y NBS1 se presenta radiosensibilización, podemos deducir que estas proteínas podrían ser un blanco atractivo en el tratamiento del cáncer.^{34,35} En ese sentido, existen algunos estudios básicos que empiezan a demostrar la utilidad de bloquear el complejo MRN, por ejemplo, un pequeño péptido de una región conservada de NBS1 que interactúa con ATM, se encontró que inhibe la respuesta a daño del ADN radiosensibilizando células cancerosas, sugiriendo que NBS1 puede ser un blanco efectivo en la terapia contra el cáncer.³⁶ Así mismo, un estudio reciente identificó un inhibidor específico del complejo MRN, conocido como Mirin. Mirin inhibe la activación de ATM dependiente del complejo MRN e inactiva la actividad de endonucleasa de MRE11. Sin embargo, éste es un estudio preliminar y falta más trabajo por hacer para demostrar la actividad antitumoral de este compuesto en modelos animales.

PERSPECTIVAS

Los regímenes actuales de quimioterapia demuestran que la excesiva producción de lesiones durante la replicación es una exitosa forma de matar las células cancerosas. También se ha observado que las células tumorales por sí solas exhiben altos niveles de lesiones de replicación endógena que resultan en inestabilidad genómica.³⁷ En teoría, los inhibidores de la reparación del ADN pueden usarse para incrementar el daño en las lesiones replicativas que presentan las células tumorales convirtiéndolas en lesiones fatales que específicamente maten a las células cancerosas. Por ejemplo, existe evidencia de que el incremento en la expresión o actividad de oncogenes puede inducir estrés replicativo. En tales tumores sería

posible usar inhibidores de la reparación del ADN para hacer las lesiones replicativas específicas del cáncer más tóxicas, resultando en una muerte selectiva de las células cancerosas que expresan oncogenes.³⁸

CONCLUSIONES

El potencial de los inhibidores de la reparación del ADN en el futuro de la terapia contra el cáncer está comenzando a ser aparente, debido a que una selectiva inhibición de las vías de reparación del ADN podría utilizarse para favorecer la quimioterapia, tal es el caso de los inhibidores de PARP en cáncer con defectos en alguna vía de reparación del ADN, lo que resulta en aumento en la inducción de la muerte celular. Este tipo de terapia es muy ventajosa cuando se compara con la actual quimioterapia porque produciría efectos colaterales mínimos resultando en lesiones altamente tóxicas que pueden inducir muerte celular de las células cancerosas. Sin embargo, una limitación potencial de este tipo de terapia es que estaría restringida a tumores con defectos en la reparación del ADN y que podrían desarrollarse mecanismos de resistencia. Hace falta mucho trabajo por hacer en la caracterización de lesiones específicas de tumores para tratar el cáncer. La investigación básica para incrementar el conocimiento de la naturaleza tóxica de las lesiones replicativas, así como la obtención de una visión más clara de las vías de reparación del ADN y sus interacciones, son decisivas para el futuro de los inhibidores de la reparación del ADN como agentes en la terapia contra el cáncer.

REFERENCIAS

1. Wade Harper J, Elledge SJ. The DNA damage response: ten years after. *Mol Cell* 2007;28:739-45.
2. O'Connor MJ, Martin NMB, Smith GCM. Targeted cancer therapies based on the inhibition of DNA strand break repair. *Oncogene* 2007;26:7816-7824.
3. Zhu Y, Hu J, Hu Y, Liu W. Targeting DNA repair pathways: a novel approach to reduce cancer therapeutic resistance. *Cancer Treat Rev* 2009;35:590-596.
4. Khanna KK, Jackson SP. DNA double-strand breaks: signaling, repair and the cancer connection. *Nat Genet* 2001;27:247-254.
5. Yu TW, Anderson D. Reactive oxygen species-induced DNA damage and its modification: a chemical investigation. *Mutat Res* 1997;379:201-210.

6. Kuzminov A. Single-strand interruptions in replicating chromosomes cause double-strand breaks. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98:8241-8246.
7. Saleh-Gohari N, Bryant HE, Schultz N, Parker KM, et al. Spontaneous homologous recombination is induced by collapsed replication forks that are caused by endogenous DNA single-strand breaks. *Mol Cell Biol* 2005;25:7158-7169.
8. Li X, Heyer WD. Homologous recombination in DNA repair and DNA damage tolerance. *Cell Res* 2008;18:99-113.
9. Hurley LH. DNA and its associated processes as targets for cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 2002;2:188-200.
10. Lawley PD, Phillips DH. DNA adducts from chemotherapeutic agents. *Mutat Res* 1996;355:13-40.
11. Bouziane M, Miao F, Ye N, Holmquist G, et al. Repair of DNA alkylation damage. *Acta Biochim Pol* 1998;45:191-202.
12. Kinsella AR, Smith D. Tumor resistance to antimetabolites. *Gen Pharmacol* 1998;30:623-626.
13. Pommier Y. Topoisomerase I inhibitors: camptothecins and beyond. *Nat Rev Cancer* 2006;6:789-802.
14. Christmann M, Tomicic MT, Roos WP, Kaina B. Mechanisms of human DNA repair: an update. *Toxicology* 2003;193:3-34.
15. Stupp, R, Mason WP, van den Bent MJ, Weller M, et al. Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N Engl J Med* 2005;352:987-996.
16. Gerson SL, Berger NA, Arce C, Petzold SJ, Willson JK. Modulation of nitrosourea resistance in human colon cancer by O6-methylguanine. *Biochem Pharmacol* 1992; 43:1101-1107.
17. Middleton MR, Margison GP. Improvement of chemotherapy efficacy by inactivation of a DNA-repair pathway. *Lancet Oncol* 2003;4:37-44.
18. Quinn JA, Desjardins A, Weingart J, Brem H, et al. Phase I trial of temozolomide plus O6-benzylguanine for patients with recurrent or progressive malignant glioma. *J Clin Oncol* 2005;23:7178-7187.
19. Khan O, Middleton MR. The therapeutic potential of O6-alkylguanine DNA alkyltransferase inhibitors. *Expert Opin Investig Drugs* 2007;16:1573-1584.
20. Miknyoczki SJ, Jones-Bolin S, Pritchard S, Hunter K, et al. Chemopotential of temozolomide, irinotecan, and cisplatin activity by CEP-6800, a poly (ADP-ribose) polymerase inhibitor. *Mol Cancer Ther* 2003;2:371-382.
21. Donawho CK, Luo Y, Luo Y, Pennig TD, et al. ABT-888, an orally active poly (ADP-ribose) polymerase inhibitor that potentiates DNA-damaging agents in preclinical tumor models. *Clin Cancer Res* 2007;13:2728-2737.
22. Zhao Y, Thomas HD, Batey MA, Cowell IG, et al. Preclinical evaluation of a potent novel DNA-dependent protein kinase inhibitor NU7441. *Cancer Res* 2006;66:5354-5362.
23. Bryant HE, Schultz N, Thomas HD, Parker KM, et al. Specific killing of BRCA2-deficient tumours with inhibitors of poly(ADP-ribose) polymerase. *Nature* 2005;434:913-917.
24. Moynahan ME, Chiu JW, Koller BH, Jasin M. Brca1 controls homology-directed DNA repair. *Mol Cell* 1999;4:511-518.
25. Helleday T, Bryant HE, Schultz N. Poly (ADP-ribose) polymerase (PARP-1) in homologous recombination and as a target for cancer therapy. *Cell Cycle* 2005; 4:1176-1178.
26. McCabe N, Turner NC, Lord CJ, Kluzek K, et al. Deficiency in the repair of DNA damage by homologous recombination and sensitivity to poly(ADP-ribose) polymerase inhibition. *Cancer Res* 2006;66:8109-8115.
27. Bryant HE, Helleday T. Inhibition of poly (ADP-ribose) polymerase activates ATM which is required for subsequent homologous recombination repair. *Nucleic Acids Res* 2006;34:1685-1691.
28. Sarkaria JN, Busby EC, Tibbetts RS, Roos P, et al. Inhibition of ATM and ATR kinase activities by the radiosensitising agent, caffeine. *Cancer Res* 1999;59:4375-4382.
29. Tibbetts RS, Brumbaugh KM, Williams JM, Sarkaria JN, et al. A role for ATR in the DNA damage-induced phosphorylation of p53. *Gene Dev* 1999;13:152-157.
30. Ribeiro JC, Barnetson AR, Jackson P, Ow K, et al. Caffeine-increased radiosensitivity is not dependent on a loss of G2/M arrest or apoptosis in bladder cancer cell lines. *Int J Radiat Biol* 1999;75:481-492.
31. Graves PR, Yu L, Schwarz JK, Gales J, et al. The CHK1 protein kinase and the Cdc25C regulatory pathways are targets of the anticancer agent UCN-01. *J Biol Chem* 2000;275:5600-5605.
32. Hotte SJ, Oza A, Winkler EW, Moore M, et al. Phase I trial of UCN-01 in combination with topotecan in patients with advanced solid cancers: a Princess Margaret hospital phase II consortium study. *Ann Oncol* 2006;17:334-340.
33. Hickson I, Zhao Y, Richardson CJ, Green SJ, et al. Identification and characterization of a novel and specific inhibitor of the ataxia-telangiectasia mutated kinase ATM. *Cancer Res* 2004;64:9152-9159.
34. Stewart GS, Maser RS, Stankovic T, Bressan DA, et al. The DNA double-strand break repair gene hMRE11 is mutated in individuals with an ataxia-telangiectasia-like disorder. *Cell* 1999; 99:577-587.
35. Girard PM, Foray N, Stumm M, Waugh A, et al. Radiosensitivity in Nijmegen Breakage Syndrome cells is attributable to a repair defect and not cell cycle checkpoint defects. *Cancer Res* 2000; 60:4881-4888.
36. Cariveau MJ, Tang X, Cui XL, Xu B. Characterization of an NBS1 C-terminal peptide that can inhibit ataxia telangiectasia mutated (ATM)-mediated DNA damage responses and enhance radiosensitivity. *Mol Pharmacol* 2007;72:320-326.
37. Di Micco R, Fumagalli M, Cicalese A, Piccinin S, et al. Oncogene-induced senescence is a DNA damage response triggered by DNA hyperreplication. *Nature* 2006;444:638-642.
38. Gorgoulis VG, Vassiliou LV, Karakaidos P, Zacharatos P, et al. Activation of the DNA damage checkpoint and genomic instability in human precancerous lesions. *Nature* 2005;434:907-913.