



Universitat Autònoma de Barcelona

**ADVERTIMENT.** L'accés als continguts d'aquesta tesi queda condicionat a l'acceptació de les condicions d'ús establertes per la següent llicència Creative Commons:  [http://cat.creativecommons.org/?page\\_id=184](http://cat.creativecommons.org/?page_id=184)

**ADVERTENCIA.** El acceso a los contenidos de esta tesis queda condicionado a la aceptación de las condiciones de uso establecidas por la siguiente licencia Creative Commons:  <http://es.creativecommons.org/blog/licencias/>

**WARNING.** The access to the contents of this doctoral thesis it is limited to the acceptance of the use conditions set by the following Creative Commons license:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=en>



Universitat Autònoma de Barcelona

**ESTUDI DE LA RESPOSTA A LES RADIACIONS  
IONITZANTS DE DUES LÍNIES CEL·LULARS AMB  
DIFERENT RADIOSENSIBILITAT**

MIREIA BORRÀS FRESNEDA

Memòria presentada per optar al Grau de Doctora en Biologia Cel·lular per  
la Universitat Autònoma de Barcelona

Directors:

Dr. Lleonard Barrios Sanromà i Dra. Gemma Armengol Rosell

Bellaterra, 2016





Universitat Autònoma de Barcelona

**Departament de Biologia Cel·lular, de Fisiologia i d'Immunologia**

Unitat de Biologia Cel·lular

**Departament de Biologia Animal, de Biologia Vegetal i d'Ecologia**

Unitat d'Antropologia Biològica

El **Dr. Lleonard Barrios Sanromà**, catedràtic del Departament de Biologia Cel·lular, de Fisiologia i d'Immunologia de la Universitat Autònoma de Barcelona,

i la **Dra. Gemma Armengol Rosell**, professora titular del Departament de Biologia Animal, de Biologia Vegetal i d'Ecologia de la Universitat Autònoma de Barcelona,

CERTIFIQUEN:

Que **Mireia Borràs Fresneda** ha realitzat sota la seva direcció el treball d'investigació que s'exposa en la memòria titulada "Estudi de la resposta a les radiacions ionitzants de dues línies cel·lulars amb diferent radiosensibilitat" per optar al grau de Doctora per la Universitat Autònoma de Barcelona.

Que aquest treball s'ha dut a terme a la Unitat de Biologia Cel·lular del Departament de Biologia Cel·lular, de Fisiologia i d'Immunologia i a la Unitat d'Antropologia Biològica del Departament de Biologia Animal, de Biologia Vegetal i d'Ecologia.

I per tal que així consti, firmen el present certificat.

Bellaterra, 19 d'abril de 2016.

Dr. Lleonard Barrios Sanromà

Dra. Gemma Armengol Rosell

Mireia Borràs Fresneda



Aquesta tesi s'ha realitzat amb el finançament d'un conveni de col·laboració amb el Consejo de Seguridad Nuclear i el projecte 2014 SGR 354 de la Generalitat de Catalunya. Mireia Borràs Fresneda ha gaudit d'una beca predoctoral per a Personal Investigador en Formació (PIF), concedida per la Universitat Autònoma de Barcelona (456-01-4/2011).



*A mi madre,  
la más luchadora.*

*A la meva padrina,  
el meu àngel de la guarda.*





*Seia al pupitre del meu davant, semblava una noia de silenci realment contingut quan atenia a les explicacions dels professors, un silenci contingut, però no sense contingut. Mentre escoltava, atenta, es removia contínuament a la cadira, prenia apunts sense parar, mossegava el tap del bolígraf, assentia i dissentia depenent de l'estat d'elucubració en el que es trobava, es posava els cabells insistentment darrere de les orelles i fins i tot, dins d'aquesta coreografia d'abstracció intel·lectual, li donava temps per girar-se, mirar-te i captar si el teu silenci tenia el mateix contingut que el seu, li agradava intuir si estàvem entenent el mateix. En resum, prenia una actitud clarament gràfica d'inquietud per comprendre i inclús d'intolerància a la incertesa quan no tenia el convenciment absolut de que ho estava fent, era una inconformista obsessivament íntegra. Tot això, encara que pot resultar anecdòtic, podria considerar-se un bon antecedent del que tenim entre les mans, la seva tesi doctoral, una amplificació ambiciosa del seu interès per l'especialitat. Als meus ulls, ella és un bon exemple d'amplificació perquè detesta les fases intermitjes, li agrada la perspectiva i els reptes i els assumeix amb persistència i profunditat, és d'aquelles persones d'aptituds tridimensionals incapaç de concebre les coses amb subtotalitat.*

*Amb tu el recorregut és inestimable, tan sols sé que tens la capacitat de dirigir-te cap a on decideixis projectar-te, així que només em queda desitjar que desitgis el que vulguis. Tu, tan compromesa sempre, sempre estaràs visible en tot el que veus.*

*Thank you for loving me, t'estimo, Lídia*



## AGRAÏMENTS

En primer lloc vull agrair al Dr. Lleonard Barrios, haver-me donat l'oportunitat de realitzar aquesta tesi doctoral a la UAB sota la seva direcció. Per suposat també a la Dra. Gemma Armengol. Gràcies a tots dos pel vostre suport i ajuda al llarg d'aquesta tesi, així com l'esforç i dedicació que hi heu dipositat, pel vostre esperit crític i per les vostres aportacions, cadascuna de les quals m'han fet créixer com a investigadora i com a persona. Gràcies també al Paquito, perquè sempre ha tingut bons consells i idees a aportar.

Vull donar les gràcies a alguns dels serveis de la UAB, en primer lloc al Servei de Microscòpia: a la Mònica, a la Meri i en especial al Martí. Gràcies Martí per les teves macros! També al Servei de Citometria de l'IBB, especialment a la Manuela Costa, gracias Manu por tu dedicación, perseverancia y por estar siempre dispuesta a escuchar y a dar tu opinión.

Les meves dues cases ("literalment") durant més de 4 anys i mig, les Unitats de Biologia Cel·lular i d'Antropologia Biològica. Per una banda, la Unitat de Bio Cel, començant pels "matxaques": no podia oblidar-me de la Lydia i l'Anna Mallol, les meves mentores i companyes de despatx, gràcies per haver-me ajudat a ubicar-me al principi, i pel bon rollo del despatx, que anava augmentant a mesura que arribava el divendres! Dra. Patiño, que decirte... eres alegría y energía, y como tú decías en tu tesis, ¡qué fácil ha sido y es todo contigo amiga! Anna Godo, Sergi Novo i Laia Hernández, hem compartit molts bons moments! Els de ses illes balears, Andreu, Aina, Teresa i Mireia Solé (com sí ho fossis gairebé), eternes discussions entre mallorquins i menorquins... ai Andreu! ens hem recolzat i hem rigut molt aquests últims mesos de tortura! Gràcies per donar-me ànims! Aina, només dir-te que tens un gran cor i ets molt vàlida, creu-t'ho més *porque tú lo vales!* Gràcies per venir-me a veure al despatx a *horas tardías*

i obligar-me a marxar, encara que no et feia cas i em donaves un petó/abraçada d'ànims! Mireia S. m'alegro d'haver-te conegut i Teresa ànims amb les immunos! Albert i Dani, un doctor i l'altre a punt de ser-ho! La Toni's, sabbes que a veces te mataría... pero también se te quiere un poquito, siempre te preocupas por los demas! Inma, ànims amb la última etapa! Joan, que poc vas durar al nostre despatx, culpa de la Marta és clar! Gràcies per ajudar-me tantes vegades amb els problemes informàtics i aguantar que et vingués a molestar! Piquenvauer, la reina indiscutible de la unitat, peculiar i esbojarrada com tu sola, però t'has fet estimar, tot i que vas posar al límit la meva paciència! Tot t'anirà com tu diries de puta mare! A los nuevos, Rober, Celia y Lourdes mucha suerte en vuestro camino. Rober todo irá genial, confía más en ti y no tengas miedo, y ¡ponte límites que aún estas en los inicios! ¡Ya llegaran tiempos peores! Silvia i Maria Jesús, les dues sempre amb una rialla i sempre disposades a ajudar, gràcies! Jonatan y David, por los buenos momentos compartidos, Jonatan ánimos y que tengas mucha suerte!

El meu mirall, tan sols amb una mirada som capaces de saber que pensar l'altra i això no passa tots els dies! Gràcies Marta per ser la millor companya de despatx que podia tenir, hem format un equip amb molta química i per suposat *cotilleo power*, ja saps que et trobaré molt a faltar! Sempre ens quedarà el vermut. Laia Vergés, hem estat juntes pràcticament des de l'inici, gràcies per moltes coses, per ser bondat en estat pur, per estar sempre disposada a ajudar, per tenir sempre un somriure d'orella a orella i sobretot per convidar-me a la teva boda, sens dubte, la més bonica a la que he assistit.

Nerea, aún recuerdo mis primeras prácticas de cultivos, me has enseñado muchas cosas y siempre hemos tenido muy buena sintonía. Mariona, vas ensenyar-me a fer immunos de la coneguda histona gamma-H2AX i tantes d'altres coses. Gràcies per rebre'm sempre amb un somriure i donar-me una

sabia resposta. Jorge, has perdido tu apuesta, ¡leerás como muy pronto en julio!  
¡Me he reído mucho contigo! Continuant pel pis de dalt, gràcies a tots, Laura, Zaida, Ester, Marta, Joan, Anna, Elena, Fanny, Montse, Josep i Carme. Carme, ja pots estar tranquila, que no et robaré més al Leo! Ets encantadora!

La Unitat d'Antropologia Biològica, gràcies a les tècnics de laboratori per la seva ajuda i simpatia, la Núria, la Pilar i la Jéssica. Gràcies Jéssica per la teva ajuda i per tot el que hem vas ensenyar al principi de la tesi! Gràcies també a la María Rosa Caballín. Gràcies a la Maria Cabezas, la Maria Chicano, la Mar, la Rut i el Pere per les estones que hem pogut compartir al meu segon despatx, al lab o a la cuineta! Gràcies també a dues perles que van fer el màster a Antropo, la Maria Guardiola i la Marta Manubens, sou la canya! Hem passat bons moments dins i fora de la UAB!

Les meves amigues de radiacions, Roser, gràcies per les bones estones que vam compartir en els meus inicis a la sala de micros, i per sort, he pogut conèixe't fora de la uni i m'he n'alegro molt!

Com oblidar-me de tu Mo? Aix... les paraules es quedaran curtes segur! Hem sigut literalment inseparables, un bon equip i un equilibri perfecte. Infinites gràcies per tot, tant a nivell tècnic com encendre'm el bany de 37°C, ajudar-me a acabar les immunos amb innumerables portes i a programar-me i/o parar-me el MetaCyte; com a nivell personal, *sempre* pendent de mi, les visites al lab per preguntar-me com ho portava, les trucades eternes al despatx i el suport moral i científic que m'has donat. També hem compartit moltes estones fora de la UAB, trobaré a faltar les birres i els sopars a hores intempestives però també les sessions de *shopping*! Gràcies per tot carallot!! Molta sort a NY!!!

Fora de les fronteres de la UAB, a tots els meus amics, que per sort són molts!  
*Trio maravilla*, Lúdia i Laura, sou part de la meva raó de ser i ja sabeu que no tinc

paraules suficients per expressar el que us estimo. Gràcies per ser-hi sempre!!! Judith i Jana, quins bons moments vam compartir a la uni i que boniques són les quedades a l'època nadalenca, tan de bo ho poguem fer sempre! Les ChupiPandi biotec: Xènia, ja saps que ets com la germana que no tinc, sempre iguals! una mica més pija això sí xd! Cris, t'admiro tant.. he après molt de la teva valentia, gràcies pels sushis! Pili, sempre disposada a ajudar, tens un gran cor! Marta, ets la següent! Sara i Ester, gràcies! Els amics d'Alfarràs, especialment al Ramón Ojeda, que ha tingut la paciència i la bona voluntat de dissenyar l'embolcall d'aquesta tesi, mai t'ho podré agrair prou! Gràcies Jordi, perquè sempre has estat un gran amic, i el recolzament que sempre m'has brindat es manté latent amb el temps!

A toda mi familia, mama, eres mi ejemplo a seguir, aunque la mayoría de veces no te lo diga. Madre coraje, perseverante y luchadora, gracias por creer siempre en mi. ¡Tata eres la mejor! Te debo tantas cosas... eres bondad, dulzura y generosidad, es lo que te hace ser tan especial. Als meus nens Clàudia i Jordiet, les rialles que m'heu tret en moments claus, encara que sigueu petits i no en sigueu del tot conscients. Y el último, pero no por eso menos importante, Alberto. Contigo vino la alegría y la calidez, ¡que viva Zaragoza! Gracias por esa complicidad, por tu forma de ser y por tu apoyo incondicional durante esta etapa.







<b>RESUM</b> .....	<b>1</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>3</b>
<b>ABREVIATURES I ACRÒNIMS</b> .....	<b>5</b>
<b>1. INTRODUCCIÓ</b> .....	<b>9</b>
1.1. Radiacions ionitzants i el seu efecte biològic .....	11
1.2. Resposta al dany en el DNA ( <i>DNA damage response</i> ) .....	15
1.2.1. Detecció dels DSBs i amplificació del senyal .....	16
1.2.2. Vies de reparació dels DSBs .....	18
1.2.2.1. Via de reparació NHEJ .....	18
1.2.2.2. Via de reparació HR .....	19
1.2.3. Formació d'alteracions cromosòmiques radioinduídes .....	20
1.2.4. Punts de control del cicle cel·lular ( <i>checkpoints</i> ).....	22
1.2.4.1. Punt de control G1/S .....	22
1.2.4.2. Punt de control G2/M .....	23
1.2.5. Inducció de mort cel·lular .....	24
1.3. Radiosensibilitat i radioresistència cel·lular dels teixits normals .....	25
1.3.1. Radioteràpia: toxicitat del teixit normal i variabilitat en la resposta del pacient .....	26
1.3.2. Desenvolupament d'assajos predictius basats en la radiosensibilitat cel·lular in vitro .....	28
1.3.2.1. Assaig de clonogenicitat .....	30
1.3.2.2. Assajos citogenètics .....	32
1.3.2.3. Assajos de detecció de dany en el DNA .....	33
1.3.2.4. Assaig d'apoptosi .....	35
1.3.2.5. Estudis basats en genòmica i transcriptòmica funcional.....	37
1.3.2.5.1. <i>Radiogenòmica</i> .....	37
1.3.2.5.2. <i>Estudis d'expressió gènica</i> .....	38

<b>2. OBJECTIUS</b> .....	<b>45</b>
<b>3. RESULTATS</b> .....	<b>49</b>
3.1. Comparison of methods to quantify histone H2AX phosphorylation and its usefulness for prediction of radiosensitivity .....	51
3.2. Differences in DNA repair capacity, cell death and transcriptional response after irradiation between a radiosensitive and a radioresistant cell line .....	75
<b>4. DISCUSSIÓ</b> .....	<b>111</b>
4.1. Utilització de les LCLs com a model per avaluar la radiosensibilitat in vitro .....	113
4.2. Resposta de dues LCLs amb diferent sensibilitat mitjançant assajos cel·lulars i d'expressió gènica després de l'exposició a RI.....	115
<b>5. CONCLUSIONS</b> .....	<b>127</b>
<b>6. BIBLIOGRAFIA</b> .....	<b>131</b>

## RESUM

El factor limitant de la dosi aplicada en els tractaments de radioteràpia és la tolerància del teixit normal. Aquesta tolerància mostra variabilitat entre pacients i aproximadament un 5% dels pacients que reben radioteràpia pateixen toxicitat elevada en el teixit normal. Per aquesta raó, s'han dedicat molts esforços en trobar un assaig que pugui predir-la, per poder establir en el futur tractaments de càncer individualitzats. Per aconseguir aquest propòsit, és necessari l'estudi dels mecanismes moleculars que determinen la radiosensibilitat. En aquest context, l'objectiu principal d'aquesta tesi ha estat estudiar la resposta a les radiacions ionitzants (RI) de dues línies cel·lulars limfoblastoides, una línia cel·lular radiosensible (4060, RS) i una altra radioresistent (20037, RR), mitjançant assajos cel·lulars i d'expressió gènica. Primer, es va avaluar la fosforilació de la histona H2AX en les dues línies, utilitzant diferents metodologies microscòpiques i citometria de flux, observant-se sempre majors recomptes de *foci* de  $\gamma$ -H2AX o un major increment d'intensitat d'immunofluorescència en la línia RS en comparació amb la línia RR. A més, el sistema microscòpic automàtic va ser la metodologia més ràpida pel recompte de *foci* i per tant va representar una eina molt útil. Segon, es va avaluar la inducció de *foci* de  $\gamma$ -H2AX i la seva cinètica de desaparició fins a 24 h postirradiació. La línia RS va presentar recomptes significativament superiors de *foci* en gairebé tots els temps postirradiació analitzats, així com una taxa de desaparició més lenta en comparació amb la línia RR. Tercer, es va avaluar la freqüència d'alteracions cromosòmiques completes i incompletes (CCE i ICE, respectivament) en les dues línies 24 h després d'irradiar. La línia RS va mostrar una freqüència significativament major d'ICE en comparació amb la línia RR. Quart, es va analitzar la mortalitat cel·lular induïda per una dosi de 2 Gy, observant-se que era major en la línia RS que en la línia RR. Finalment, es va utilitzar la

metodologia QuantSeq per identificar perfils d'expressió gènica diferencial de les dues línies cel·lulars a diferents temps postirradiació. En comparació amb la línia RR, la línia RS presentava una major i prolongada expressió diferencial de gens, tant a les 4 com a les 24 h després d'irradiar. L'anàlisi funcional 24 hores després d'irradiar va mostrar que la línia RS encara presentava gens diferencialment sobreexpressats relacionats amb resposta al dany en el DNA, efectors de p53 i apoptosi, mentre que la línia RR ja no en sobreexpressava. En conjunt, els resultats d'aquesta tesi demostren que les dues línies cel·lulars tenen diferent resposta a les RI i, tot i ser uns resultats preliminars, podrien ser un bon model per avaluar la toxicitat del teixit normal en pacients de càncer després de la radioteràpia.

## ABSTRACT

The tolerance of the normal tissue represents the limiting factor on the radiation dose given in radiotherapy. There is significant variation between patients in terms of normal tissue toxicity, and about 5% of cancer patients receiving radiotherapy show high toxicity. For that reason, efforts have been focused on searching a predictive assay of normal tissue radiosensitivity for tailoring individualized radiotherapy treatments in the future. To achieve this goal, understanding the molecular mechanisms underlying radiation sensitivity is necessary. In this scenario, the present thesis aimed to study the response to ionizing radiation of two lymphoblastoid cell lines, one radiosensitive (4060, RS) and another radioresistant (20037, RR), using cell-based assays and gene expression analysis. First, quantification of H2AX phosphorylation was assessed using different microscopic methodologies and flow cytometry. The RS cell line always showed higher *foci* counts and higher levels of immunofluorescence intensity than the RR cell line. The automated microscopy system represented an improvement of the speed for scoring  $\gamma$ -H2AX *foci* when compared with the other microscopic methodologies. Second, the kinetics of  $\gamma$ -H2AX *foci* induction and disappearance was evaluated after irradiation up to 24 h. The RS cell line showed significantly higher *foci* counts for almost all the post-irradiation times tested and a slower rate of their disappearance in comparison with the RR cell line. Third, the frequency of complete and incomplete chromosome aberrations (CCE and ICE, respectively) was scored after irradiation in both cell lines, showing the RS cell line a significantly higher frequency of ICE than the RR cell line. Fourth, radiation-induced cell death was evaluated after 2 Gy irradiation, presenting the RS cell line a higher mortality than the RR cell line. Finally, QuantSeq methodology was used to identify differential gene expression profiles of both cell lines at different post-irradiation times. The RS cell line

presented a greater and a prolonged differential expression of genes, both at 4 and 24 h after irradiation, in comparison with the RR cell line. Functional analysis revealed that 24 h after irradiation genes involved in DNA damage response, p53 effectors and apoptosis were still differentially up-regulated in the RS cell line but not in the RR cell line. Collectively, the results from this thesis demonstrate that the two cell lines respond differently to ionizing radiation. Although these data are preliminary, they could serve as a model to study normal tissue radiation toxicity of cancer patients.

## ABREVIATURES I ACRÒNIMS

<b>20037 RR</b>	Línia cel·lular radioresistent, provinent de limfòcits B immortalitzats amb el virus d'Epstein-Barr
<b>4060 RS</b>	Línia cel·lular radiosensible, provinent de limfòcits B immortalitzats amb el virus d'Epstein-Barr
<b>53BP1</b>	<i>Tumor protein p53 binding protein 1</i>
<b>ATM</b>	<i>Ataxia telangiectasia mutated</i>
<b>ATR</b>	<i>Ataxia telangiectasia and rad3 related</i>
<b>AURKA</b>	<i>Aurora kinase A</i>
<b>BCL2</b>	<i>B-cell lymphoma-2</i>
<b>BD</b>	<i>Base damage</i>
<b>BRCA1/2</b>	<i>Breast cancer 1/2</i>
<b>CCE</b>	<i>Complete chromosome elements</i>
<b>CDC25A</b>	<i>Cell division cycle 25A</i>
<b>CDKN1A</b>	<i>Cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (p21)</i>
<b>CDKs</b>	<i>Cyclin-dependent kinases</i>
<b>CHK1/2</b>	<i>Checkpoint kinase 1/2</i>
<b>CtIP</b>	<i>[C-terminal binding protein]-interacting protein</i>
<b>DDR</b>	<i>DNA damage response</i>
<b>DNA-PKcs</b>	<i>DNA-dependent protein kinase catalytic subunit</i>
<b>DSBs</b>	<i>Double strand breaks</i>
<b>E2F/7</b>	<i>E2F transcription factor(s)/7</i>
<b>FDXR</b>	<i>Ferredoxin reductase</i>
<b>FISH</b>	<i>Fluorescence in situ hybridization</i>
<b>GWAS</b>	<i>Genome-wide association study</i>
<b>Gy</b>	Gray
<b><math>\gamma</math>-H2AX</b>	Histona H2AX fosforilada en el residu serina 139



<b>HR</b>	<i>Homologous recombination</i>
<b>ICE</b>	<i>Incomplete chromosome elements</i>
<b>IF</b>	<i>Immunofluorescence</i>
<b>IRIF</b>	<i>Ionizing radiation-induced foci</i>
<b>KIF20A</b>	<i>Kinesin family member 20A</i>
<b>LCLs</b>	<i>Lymphoblastoid cell lines</i>
<b>LET</b>	<i>Linear energy transfer</i>
<b>MAP2K6</b>	<i>Mitogen-activated protein kinase kinase 6</i>
<b>MDC1</b>	<i>Mediator of DNA damage checkpoint 1</i>
<b>MDM2</b>	<i>Mouse double minute 2 homolog</i>
<b>MRE11</b>	<i>Meiotic recombination 11</i>
<b>MRN</b>	<i>MRE11-RAD50-NBS1</i>
<b>NBS/1</b>	<i>Nijmegen breakage syndrome/1</i>
<b>NGS</b>	<i>Next-generation sequencing</i>
<b>NHEJ</b>	<i>Non-homologous end-joining</i>
<b>PARP</b>	<i>Poly(ADP-ribose) polymerase</i>
<b>pb</b>	<i>Parells de bases</i>
<b>PHLDA3</b>	<i>Pleckstrin homology like domain family A member 3</i>
<b>PI</b>	<i>Propidium iodide</i>
<b>PLK1</b>	<i>Polo like kinase 1</i>
<b>PNA</b>	<i>Peptide nucleic acid</i>
<b>RAD50/51</b>	<i>Receptor associated protein 50/51</i>
<b>RBE</b>	<i>Relative biological effectiveness</i>
<b>RI</b>	<i>Radiació ionitzant</i>
<b>RNA-Seq</b>	<i>RNA-sequencing analysis</i>
<b>RPA</b>	<i>Replication protein A</i>
<b>RRM2B</b>	<i>Ribonucleotide reductase regulatory TP53 inducible subunit M2B</i>
<b>SESN1</b>	<i>Sestrin 1</i>

<b>SF</b>	<i>Surviving fraction</i>
<b>SNPs</b>	<i>Single nucleotide polymorphisms</i>
<b>SOD2</b>	<i>Superoxide dismutase 2 mitochondrial</i>
<b>SSBs</b>	<i>Single strand breaks</i>
<b>TGFB1</b>	<i>Transforming growth factor beta 1</i>
<b>TP53</b>	<i>Tumor protein p53 (p53)</i>
<b>TP53I3</b>	<i>Tumor protein p53 inducible protein 3</i>
<b>TRIAP1</b>	<i>TP53 regulated inhibitor of apoptosis 1</i>
<b>TUNEL</b>	<i>Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling</i>
<b>XLf</b>	<i>XRCC4-like factor</i>
<b>XRCC1/4</b>	<i>X-ray repair complementing defective repair in chinese hamster cells 1/4</i>



---

# 1. INTRODUCCIÓ

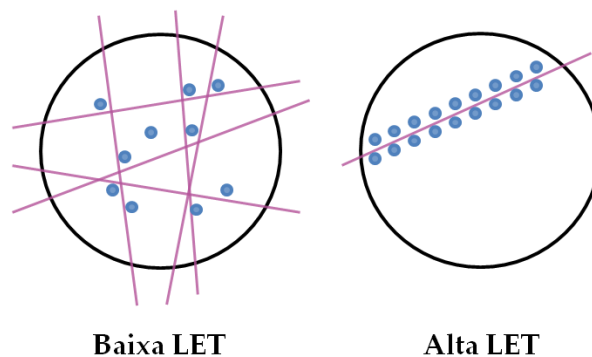
---



## 1. 1. Radiacions ionitzants i el seu efecte biològic

Les radiacions ionitzants (RI) són aquelles que al travessar un material tenen suficient energia com per ionitzar els àtoms que el conformen, arrencant electrons d'aquests àtoms i causant que aquests àtoms esdevinguin ionitzats.

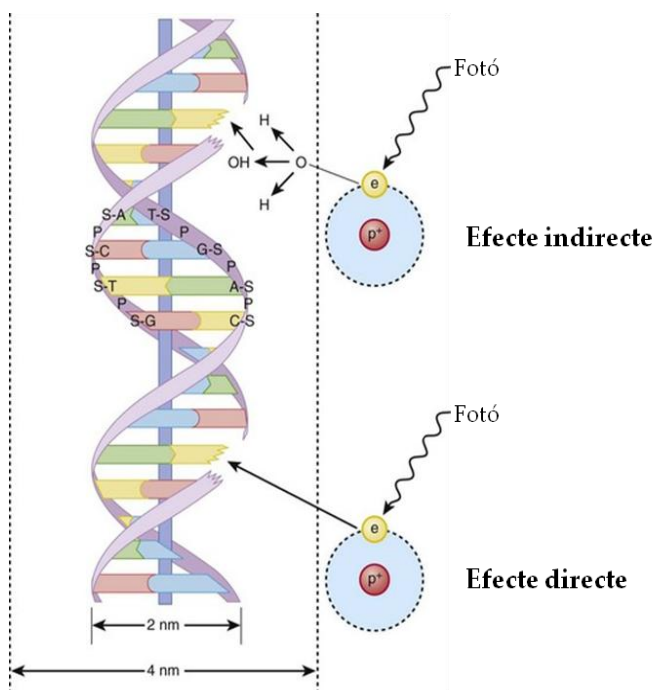
L'energia dipositada per les RI varia en funció del tipus de radiació. Podem classificar les RI en dos tipus, les ones electromagnètiques (fotons), com els raigs X i  $\gamma$ , que no tenen massa ni càrrega, i les radiacions corpusculars, com les partícules  $\alpha$  i  $\beta$  i els neutrons que tenen massa i/o càrrega. La dosi absorbida (D) es defineix com la quantitat d'energia absorbida per unitat de massa i s'expressa en grays ( $Gy=J/Kg$ ). L'energia mitjana dipositada per unitat de recorregut de les RI es coneix amb el nom de transferència lineal d'energia o LET (de l'anglès *linear energy transfer*). Es poden diferenciar radiacions de baixa i d'alta LET. Les que produeixen un baix nombre d'ionitzacions en un únic recorregut són les de baixa LET, i les que produeixen un elevat nombre d'ionitzacions al llarg del recorregut són les d'alta LET (IAEA, 2011) (Figura 1).



**Figura 1.** Patró d'ionització per radiacions de baixa i d'alta LET. Adaptada de Tubiana *et al.* (1990).

L'efecte biològic de les RI pot variar en funció del tipus de radiació. Així, a la mateixa D, radiacions de diferent LET poden produir efectes biològics diferents. L'eficàcia biològica relativa o RBE (de l'anglès *relative biological effectiveness*) es defineix com la ràtio entre la D d'una radiació de referència (normalment s'utilitzen els raigs X de 250 KeV) i la D d'una radiació problema que produeixen el mateix efecte biològic. En base a aquest concepte, es va introduir el terme de dosi equivalent (H), que té com a unitat el sievert ( $Sv=J/Kg$ ) i permet mesurar el mateix efecte biològic independentment del tipus de radiació (revisat per Hall i Giaccia, 2006).

L'exposició a RI pot danyar les biomolècules, entre les quals, els danys induïts en el DNA són els més importants. Aquests danys en el DNA poden produir-se per acció directa de les RI, on aquesta o electrons secundaris induïts per ionitzacions interaccionen directament amb el DNA, donant lloc a trencaments o modificacions dels seus enllaços. Alternativament, les radiacions poden produir danys en el DNA de manera indirecta, ionitzant altres molècules presents en la cèl·lula (especialment l'aigua), produint radicals lliures químicament reactius capaços de difondre suficientment lluny com per produir alteracions en el DNA (Hall i Giaccia, 2006; Lehnert, 2008) (Figura 2).

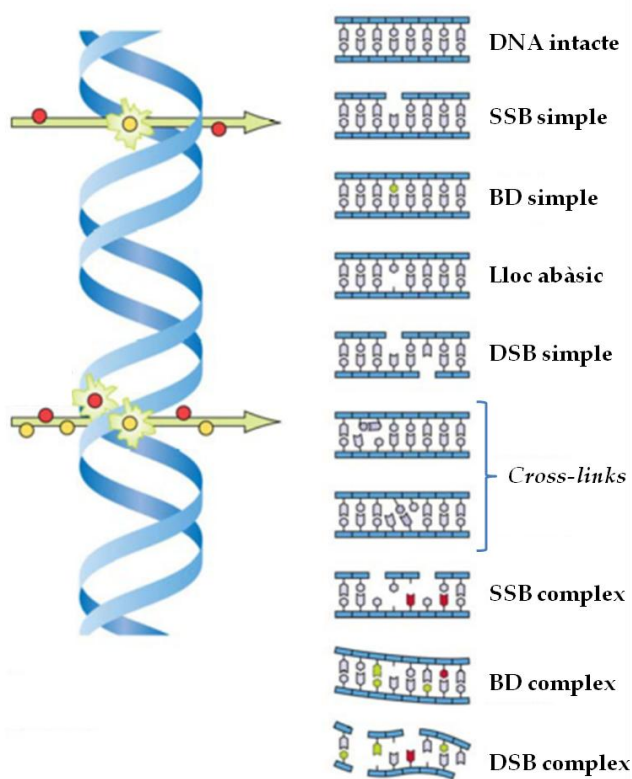


**Figura 2.** Efecte directe i indirecte de les RI en el DNA. Modificada de Frush i Slovis (2013).

Degut a que les cèl·lules estan formades per aproximadament un 80% d'aigua, els efectes biològics de les RI es produeixen majoritàriament a través de la radiòlisi de l'aigua ( $\text{H}_2\text{O}$ ). La ionització de l'aigua és una cascada de transformacions químiques que resulten en la formació de radicals lliures, com per exemple els radicals hidrogen i hidroxil ( $\text{H}\cdot$  i  $\text{OH}\cdot$ ). Els radicals lliures són espècies químiques altament reactives ja que contenen almenys un electró orbital desaparellat (Hall i Giaccia, 2006). Aquests radicals lliures a més d'interaccionar amb el DNA també poden interaccionar entre si, per formar per exemple, peròxid d'hidrogen ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ). S'ha descrit que la peroxidació dels lípids a través dels radicals lliures és un procés destructiu que altera l'estructura i funció de la membrana cel·lular, així com també de les membranes mitocondrials (Lehnert, 2008). Els productes resultants d'aquesta peroxidació poden danyar també les proteïnes i el DNA (Rzeszowska-Wolny *et al.*, 2009).



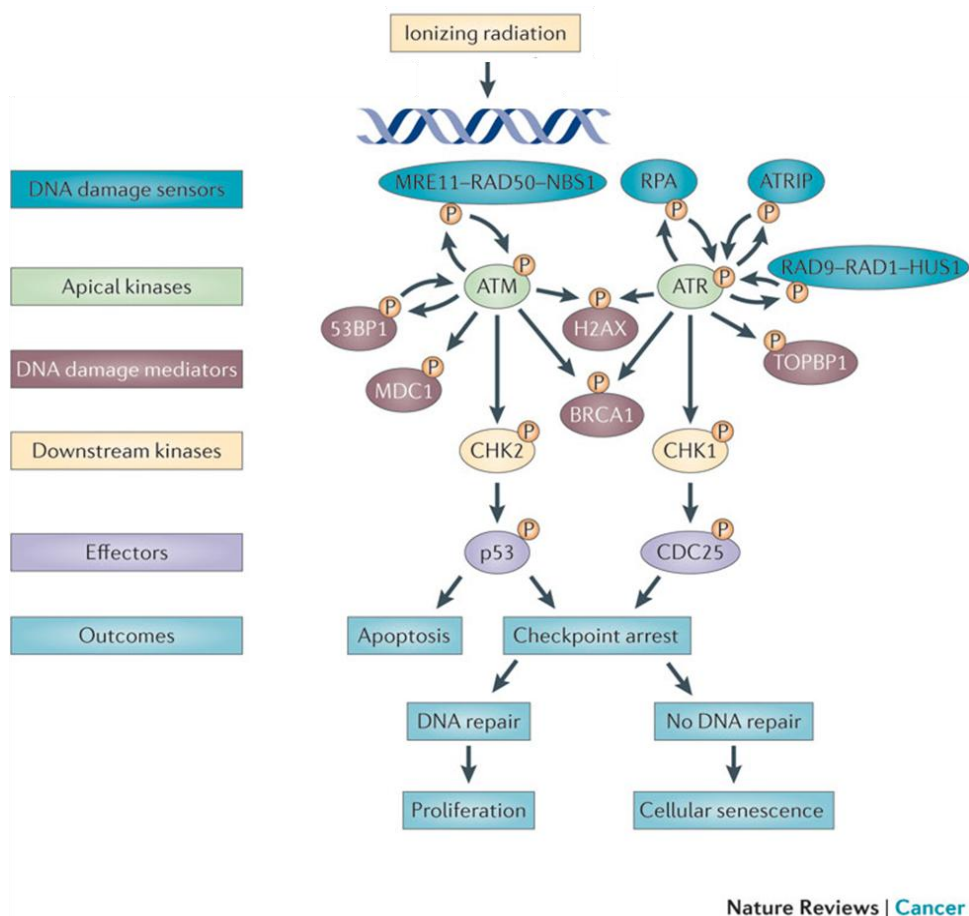
Els principals danys en el DNA induïts per les RI són: danys de base o BD (de l'anglès *base damage*), unions DNA-proteïna i unions DNA-DNA (en anglès *cross-links*), trencaments de cadena senzilla de DNA o SSBs (de l'anglès *single strand breaks*) i trencaments de doble cadena de DNA o DSBs (de l'anglès *double strand breaks*) (Teoule i Cadet, 1978; Dizdaroglu *et al.*, 1991) (Figura 3). Els DSBs es consideren les lesions amb un efecte biològic més important, i són els principals causants de la formació d'alteracions cromosòmiques i a més, es relacionen amb la carcinogènesi o la mort cel·lular (Natarajan, 1984; Hall i Giaccia, 2006; Goodarzi i Jeggo, 2012).



**Figura 3.** Principals lesions induïdes en el DNA per radiació. Modificada de IAEA (2011).

## 1.2. Resposta al dany en el DNA (*DNA damage response*)

El material genètic danyat representa una amenaça per a la cèl·lula, ja sigui per la seva transmissió a la descendència o per la seva pròpia supervivència. Per aquest motiu, les cèl·lules han desenvolupat vies i mecanismes que responen front al dany en el DNA. Aquestes vies s'anomenen vies de resposta al dany en el DNA o DDR (de l'anglès *DNA damage response*). Centrant-nos en els DSBs, quan en una cèl·lula se'n produeixen s'activen complexos proteics de detecció (sensors del dany) i senyalització (transmissors i mediadors) que alhora activaran i reclutaran proteïnes (efectors) que per un costat aturaran la progressió del cicle cel·lular i per l'altre activaran la maquinària de reparació del DNA (Figura 4). Si aquest dany és reparat, la cèl·lula podrà continuar proliferant, però si aquest dany és persistent es pot induir la senescència cel·lular, i si no es pot reparar, es poden iniciar processos de mort cel·lular per apoptosi (Sulli *et al.*, 2012) (Figura 4).

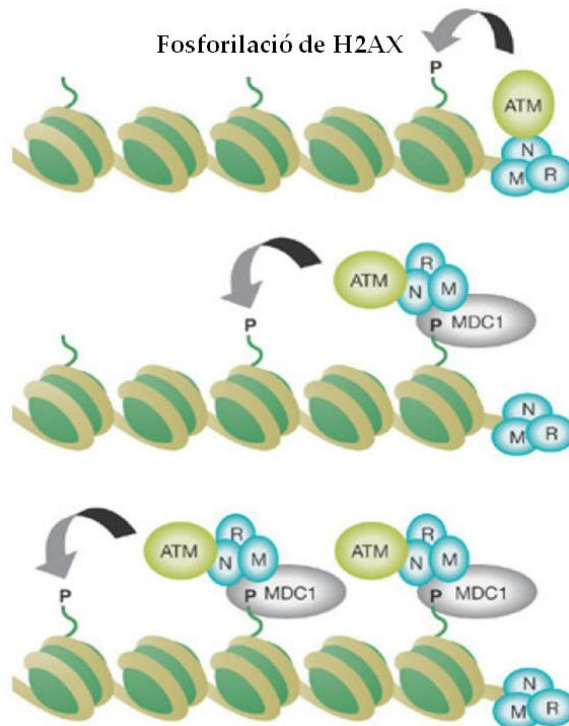


**Figura 4.** Esquema de la *DNA damage response*. Modificada de Sulli *et al.* (2012).

### 1.2.1. Detecció dels DSBs i amplificació del senyal

Quan es produeixen DSBs s'activa la DDR, en primer lloc es recluten proteïnes de la família PARP (de l'anglès *poly(ADP-ribose) polymerase*), que promouen la modificació de la cromatina per reclutar altres factors en el lloc del DSB. A continuació, el complex MRN (MRE11-RAD50-NBS1) s'uneix al lloc del DSB i recluta les cinases ATM (de l'anglès *ataxia telangiectasia mutated*), ATR (de l'anglès *ataxia telangiectasia and rad3 related*) i les DNA-PKcs (de l'anglès *DNA-dependent protein kinase catalytic subunit*). ATM s'autofosforila i produeix la fosforilació de centenars de proteïnes, entre elles la histona H2AX, en el residu

serina 139, generant  $\gamma$ -H2AX (Rogakou *et al.*, 1998) (Figura 5). Aquesta fosforilació també pot ser realitzada per ATR i DNA-PKcs. La fosforilació de H2AX facilita la unió de MDC1 (de l'anglès *mediator of DNA damage checkpoint 1*) que promou l'amplificació del senyal amb el reclutament de més MRN i ATM, i al seu torn, creant dominis de  $\gamma$ -H2AX que s'estenen centenars de quilobases al llarg de la cromatina en els extrems propers al DSB (Bonner *et al.*, 2008) (Figura 5). L'ensamblatge d'aquestes proteïnes culmina amb el reclutament de les proteïnes 53BP1 (de l'anglès *tumor protein p53 binding protein 1*) i BRCA1 (de l'anglès *breast cancer 1*) en el lloc del DSB (Figura 4). L'acumulació o modificació local de  $\gamma$ -H2AX i/o d'altres proteïnes en els extrems del DSB donen lloc a la formació d'uns *foci* coneguts com IRIF (de l'anglès *ionizing radiation-induced foci*), que es consideren marcadors de la presència del DSB (Ciccia i Elledge, 2010; Goodarzi i Jeggo, 2012; Sulli *et al.*, 2012; Price i D'Andrea, 2013).



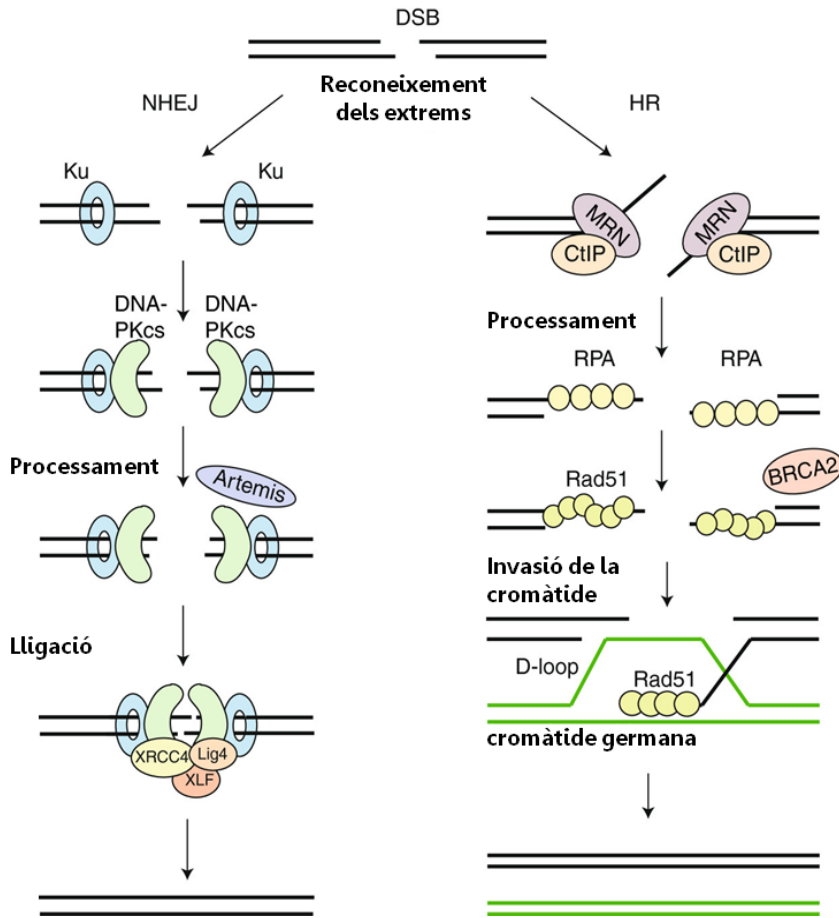
**Figura 5.** Fosforilació de la histona H2AX i amplificació del senyal. Modificada de West i van Attikum (2006).

## 1.2.2. Vies de reparació dels DSBs

Les principals vies de reparació dels DSBs són: la via de reparació per unió d'extremos no homòlegs o NHEJ (de l'anglès *non-homologous end-joining*) i la via de reparació per recombinació homòloga o HR (de l'anglès *homologous recombination*) (revisat per Huertas, 2010) (Figura 6). La NHEJ és considerada la principal via de reparació dels DSBs en cèl·lules de mamífer, ja que és activa durant tot el cicle cel·lular. En canvi, la HR necessita una cromàtide germana intacta com a motlle i per tant sols funciona en les fases S i G2 del cicle cel·lular (Price i D'Andrea, 2013; Srivastava i Raghavan, 2015). Es considera que la NHEJ pot produir errors en els llocs de lligació del DSB, ja que els extrems del DSB es processen enzimàticament. En canvi, l'HR restaura més fidelment el trencament del DNA ja que utilitza la cromàtide germana com a motlle per a la reparació (Ciccia i Elledge, 2010).

### 1.2.2.1. Via de reparació NHEJ

La NHEJ es basa en el reconeixement i processament dels extrems trencats del DNA per nucleases, seguit d'una síntesi i lligació d'aquests extrems (Price i D'Andrea, 2013). El primer pas en la via és la unió de l'heterodímer Ku70/80 als extrems del DSB, impeding la digestió nucleotídica del DNA. Ku promou la unió de les DNA-PKcs als dos extrems i la seva activació. L'autofosforilació de les DNA-PKcs facilita l'accés als extrems del DNA d'enzims com Artemis, que els processarà degut a la seva activitat exonucleasa. Finalment, es produeix la síntesi de DNA (per les polimerases  $\mu$  i  $\lambda$ ) i la lligació dels extrems trencats gràcies a l'acció de la DNA lligasa IV, que forma part d'un complex juntament amb XRCC4 i XLF (Mahaney *et al.*, 2009; Lieber, 2010; Dueva i Iliakis, 2013) (Figura 6).



**Figura 6.** Esquema de les vies de reparació per NHEJ i HR. Modificada de Brandsma i Gent (2012).

### 1.2.2.2. Via de reparació HR

Com s'ha dit anteriorment, aquesta via de reparació necessita com a motlle la cromàtide germana per poder dur a terme la reparació. El primer pas és el reconeixement del trencament pel complex MRN i el posterior processament dels extrems per part del complex MRN-CtIP (de l'anglès [*C-terminal binding protein*]-interacting protein) (Chapman *et al.*, 2012; Dueva i Iliakis, 2013). Després, es generen dos extrems 3' de cadena senzilla, que són protegits per diferents proteïnes, com RPA (de l'anglès *replication protein A*). Mitjançant BRCA2, RPA és

reemplaçada per RAD51, la qual és necessària per a la invasió de la cromàtide germana i la formació de l'estructura en llaç D, permetent la síntesi de DNA des de l'extrem 3' i la posterior lligació (revisat per Li i Heyer, 2008) (Figura 6).

### **1.2.3. Formació d'alteracions cromosòmiques radioinduídes**

Quan els danys en el DNA d'una cèl·lula són abundants, s'incrementa la probabilitat de que alguns no siguin reparats o que siguin reparats erròniament. Quan això succeeix, si la cèl·lula arriba a metafase es poden observar alteracions cromosòmiques. Les alteracions cromosòmiques poden ser de tipus cromosoma o de tipus cromàtide, depenent de la fase del cicle en que es produeixen.

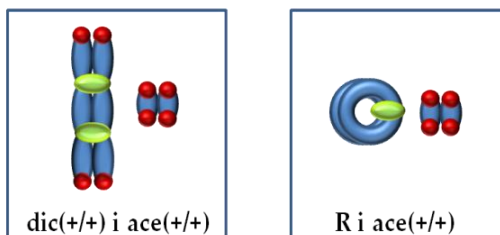
Les alteracions de tipus cromosoma serien les produïdes abans de la replicació (fases G0 o G1 del cicle cel·lular) i per tant en metafase estan afectades les dues cromàtides. Si els cromosomes resultants presenten problemes de segregació en la mitosi, aquestes alteracions es consideren com a inestables, i inclouen els cromosomes dicèntrics, els cromosomes en anell i els fragments acèntrics. Per altra banda, quan les alteracions cromosòmiques es mantenen durant successives divisions, és a dir, no presenten problemes de segregació en la mitosi, es consideren com alteracions estables, incloent les translocacions, les inversions i les insercions. Les alteracions de tipus cromàtide es produeixen en la fase G2 del cicle cel·lular, observant-se com a discontinuïtats de la cromatina en una sola cromàtide anomenades *breaks* i *gaps* (IAEA, 2011).

En relació al resultat de la reparació, aquestes alteracions cromosòmiques es poden classificar en: elements cromosòmics complets o CCE (de l'anglès *complete chromosome elements*) quan els extrems generats pels DSBs són reparats, encara que es formin alteracions cromosòmiques. En canvi, es consideren elements cromosòmics incomplets o ICE (de l'anglès *incomplete chromosome elements*) aquells en que tots o alguns dels extrems generats pels DSBs no es reparen. El

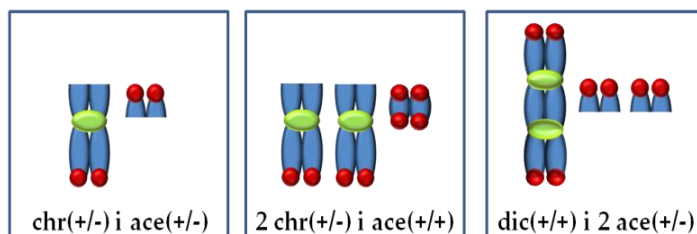
que permet distingir ambdós tipus d'alteracions és que en els CCE els cromosomes conserven els telòmers, mentre en els ICE hi ha extrems cromosòmics sense telòmers (Figura 7).

Per visualitzar determinades alteracions cromosòmiques, com els cromosomes dicèntrics, els cromosomes en anell o els fragments acèntrics, la metodologia clàssica de tinció uniforme és suficient i molt útil. La tècnica de FISH (de l'anglès *fluorescence in situ hybridization*), utilitzant sondes de cromosomes sencers, permet també la identificació d'altres alteracions cromosòmiques no visualitzables amb tinció uniforme, com per exemple les translocacions (Savage i Simpson, 1994). La FISH utilitzant sondes de PNA (de l'anglès *peptide nucleic acid*) pancentromèriques i pantelomèriques permet la detecció de centròmers i telòmers i per tant distingir de forma inequívoca els CCE dels ICE (Lansdorp *et al.*, 1996; Rodríguez *et al.*, 2009).

#### Complete chromosome elements (CCE)



#### Incomplete chromosome elements (ICE)



**Figura 7.** Esquema representatiu dels tipus d'alteracions cromosòmiques CCE i ICE que es poden observar amb FISH pancentromèrica i pantelomèrica.



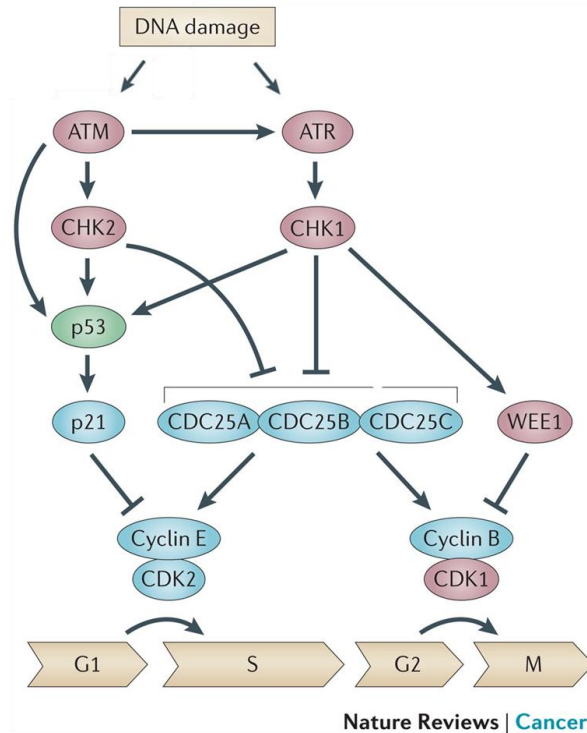
### 1.2.4. Punts de control del cicle cel·lular (*checkpoints*)

Davant la presència de DSBs, la progressió en el cicle cel·lular es pot bloquejar en diferents punts de control (en anglès *checkpoints*) per intentar reparar aquest dany. Els punts de control més estudiats són els de les transicions entre fases del cicle cel·lular. Aquestes transicions, així com la progressió del cicle, estan regulats per complexos de CDKs (de l'anglès *cyclin-dependent kinases*) i ciclines. Les ciclines són proteïnes que s'expressen i es degraden cíclicament durant períodes concrets del cicle, i tenen la funció de regular l'activitat de les CDKs. Els principals *checkpoints* relacionats amb dany en el DNA es troben en les transicions G1/S i G2/M, per controlar les cèl·lules abans que repliquin el DNA o abans del progrés cap a la mitosi, respectivament (Figura 8). Cal assenyalar que en d'altres fases del cicle cel·lular hi ha també punts de control on es poden produir bloquejos si es detecten danys en el DNA.

#### 1.2.4.1. Punt de control G1/S

La transició de G1 a S requereix l'activació successiva dels complexos CDK4/6-Ciclina D i CDK2-Ciclina E. Aquests tenen com a diana la proteïna Rb, que en ser fosforilada allibera el factor de transcripció E2F, que activa l'expressió de gens que codifiquen per proteïnes necessàries per a la replicació (fase S). Després de la producció de DSBs, i per tal d'evitar l'entrada a la fase S del cicle cel·lular, s'inicien dues vies de control per inhibir els complexos CDK4/6-Ciclina D i CDK2-Ciclina E en el *checkpoint* G1/S. En primer lloc, existeix una via ràpida que consisteix en l'activació de CHK2 a través d'una fosforilació dependent d'ATM, que provocarà l'eliminació de CDC25A (de l'anglès *cell division cycle 25A*) i la inhibició del complex CDK2-Ciclina E. Per altra banda, hi ha una via lenta que implica l'activació i estabilització de p53 dissociant-la del seu regulador negatiu MDM2 (de l'anglès *mouse double minute 2 homolog*). p53 activa i estabilitzada

promou la transcripció d'altres gens, com el de p21 que s'uneix i inhibeix els complexos CDKs-Ciclins bloquejant la transició G1/S (Deckbar *et al.*, 2011; Bouwman i Jonkers, 2012) (Figura 8).



**Figura 8.** Activació dels *checkpoints* en resposta al dany en el DNA. Modificada de Bouwman i Jonkers (2012).

#### 1.2.4.2. Punt de control G2/M

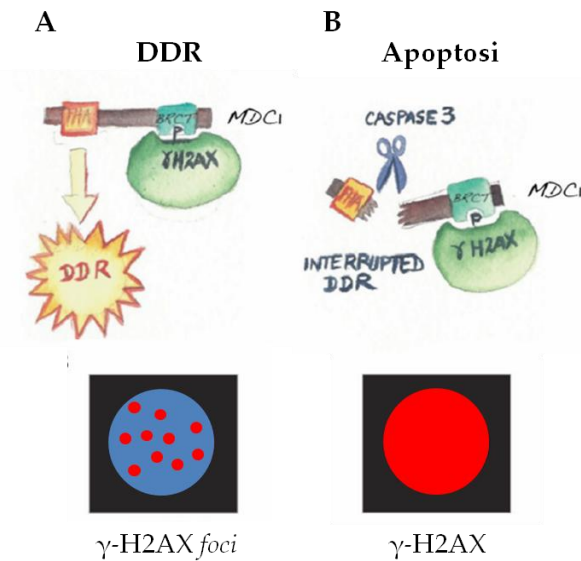
La progressió normal de G2 a M requereix del complex CDK1-Ciclina B1. Davant els danys en el DNA, en el *checkpoint* G2/M s'evita la progressió de la cèl·lula cap a la mitosi regulant l'activitat d'aquest complex per dues vies dependents d'ATM. En una via més ràpida, ATM activa (per fosforilació) les cinases CHK1 i CHK2, que per la seva part inactiven (per fosforilació) CDC25, la qual cosa no permet l'activació del complex CDK1-Ciclina B1. Per altra banda, hi ha una via més lenta dependent de p53, amb un mecanisme d'actuació menys

conegut on s'activa la transcripció d'inhibidors del cicle cel·lular com p21, que també poden actuar inhibint el complex CDK1-Ciclina B1 (Löbrich i Jeggo, 2007; Deckbar *et al.*, 2011) (Figura 8).

### **1.2.5. Inducció de mort cel·lular**

Quan una cèl·lula presenta nombrosos danys en el DNA, una de les respostes cel·lulars pot ser l'activació de les vies de mort cel·lular. De fet, s'ha descrit que quan hi ha nivells de DSBs que comprometen la seva reparació, es poden activar mecanismes d'apoptosi per la via intrínseca (revisat per Maier *et al.*, 2016). La proteïna p53 és la principal iniciadora d'una cascada de senyalitzacions que conduiran a la formació de cossos apoptòtics. p53 regula l'activitat de proteïnes de la família BCL2 (de l'anglès *B-cell lymphoma-2*), família que inclou proteïnes amb activitat tant pro- com anti-apoptòtica. L'acumulació nuclear de p53 condueix a l'expressió dels gens pro-apoptòtics de la família BCL2, com *PUMA*, *BAX* i *NOXA*. BAX inicia la via d'apoptosi permeabilitzant la membrana mitocondrial externa i permetent la sortida del citocrom c de l'espai intermembrana al citosol. El citocrom c s'uneix a altres molècules formant un complex anomenat apoptosoma, que inclou entre d'altres, la caspasa-9 (Cain *et al.*, 2000). Aquesta caspasa activarà altres caspases efectores, com la caspasa-3 i la caspasa-7, iniciant així una cascada que promourà la mort de la cèl·lula. En aquest procés la cromatina es condensa a la perifèria del nucli i el DNA es degrada (Zhang i Xu, 2000). Durant la degradació del DNA en l'apoptosi, la histona H2AX és també fosforilada en el residu Ser139 (Rogakou *et al.*, 2000), igual que quan s'indueixen DSBs per l'efecte de les RI. No obstant, el patró de distribució dels *foci* d'histona durant l'apoptosi és diferent a l'observat quan s'activa la DDR. Mentre que les RI indueixen un patró de *foci* disseminats en el nucli cel·lular, el patró de  $\gamma$ -H2AX durant l'apoptosi es caracteritza per un tinció

pannuclear (revisat per Solier i Pommier, 2009) (Figura 9). Segons Doyle i Griffiths (1998), en condicions *in vivo* les cèl·lules apoptòtiques són reconegudes i ràpidament eliminades per les cèl·lules fagocítiques, en canvi, en un cultiu cel·lular això no es pot produir i conseqüentment la no eliminació de cossos apoptòtics també pot desencadenar processos de mort cel·lular per necrosi.



**Figura 9.** Esquema explicatiu dels patrons de marcatge dels foci de  $\gamma$ -H2AX en la DDR (A) i en l'apoptosi (B). Modificada de Solier i Pommier (2014).

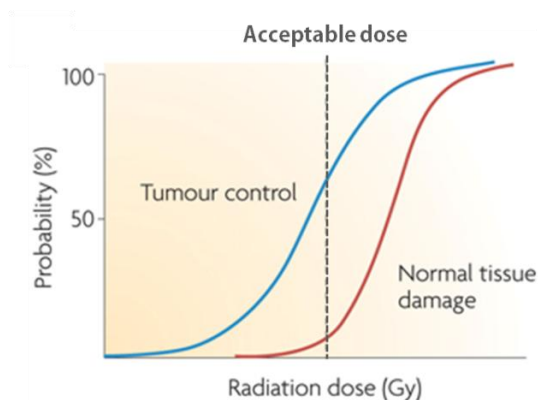
### 1.3. Radiosensibilitat i radioresistència cel·lular dels teixits normals

Com ja s'ha comentat, la radiació pot provocar mort cel·lular en els teixits normals, considerant-se més sensibles aquells teixits amb una elevada taxa proliferativa, com per exemple la medul·la òssia. En canvi, es considera que teixits on les cèl·lules rarament es divideixen, tendeixen a ser més radioresistents (Hall i Giaccia, 2006).

Un dels tipus cel·lulars considerats com a radiosensibles són els limfòcits de sang perifèrica, malgrat que en sang perifèrica no es divideixen si no hi ha un estímul antigènic. Per tant, els limfòcits serien una excepció que no segueix la classificació descrita anteriorment (Hall i Giaccia, 2006). S'ha observat que els recomptes de limfòcits disminueixen després de dosis d'irradiació entre 0.3-1 Gy. Irradiacions a dosis més altes poden també afectar el nombre de cèl·lules sanguínies totals (Waselenko *et al.*, 2004; Hall i Giaccia, 2006). La radiosensibilitat dels limfòcits pot ser explicada parcialment per la seva alta tendència a patir apoptosi (Health Protection Agency, 2013).

### **1.3.1. Radioteràpia: toxicitat del teixit normal i variabilitat en la resposta del pacient**

Actualment, la radioteràpia es considera un dels tractaments més efectius contra el càncer i s'utilitza per tractar més d'un 50% dels pacients de càncer (Barnett *et al.*, 2015). L'èxit de la radioteràpia en eradicar un tumor depèn principalment de la dosi total de radiació aplicada, però la tolerància del teixits normals circumdants limita aquesta dosi (Burnet *et al.*, 1996). Malgrat que la incidència i severitat del dany en el teixit normal és dosi-dependent (Figura 10), es coneix que la toxicitat del teixit normal front a una mateixa dosi de radiació mostra variabilitat entre pacients, indicant que existeixen variacions individuals en la radiosensibilitat intrínseca (Turesson *et al.*, 1996; Andreassen *et al.*, 2002).

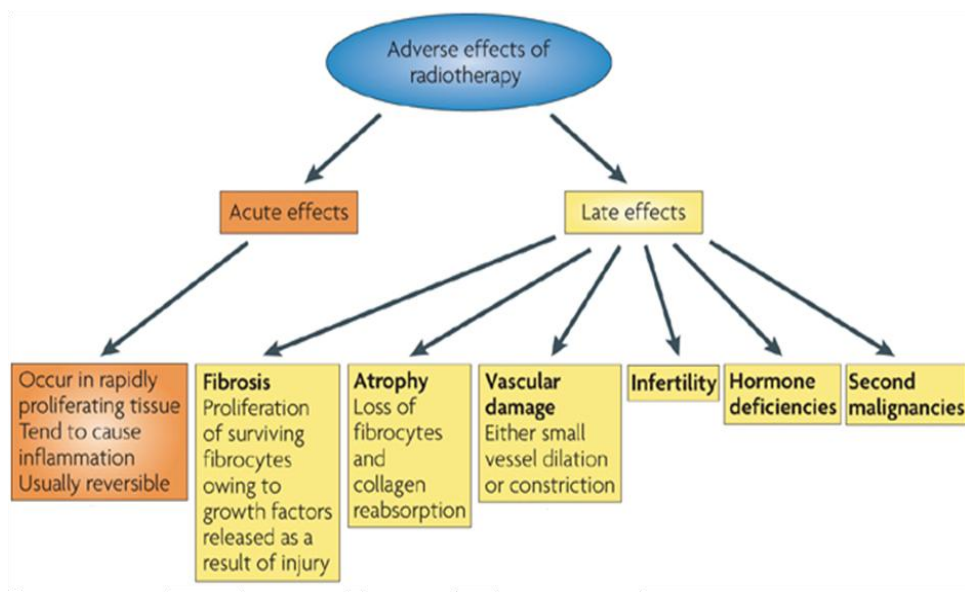


**Figura 10.** Corbes dosi-efecte en tractaments de radioteràpia. La línia de punts mostra una dosi teòrica associada aproximadament amb un 60% de control del tumor i aproximadament amb un 5% de toxicitat del teixit normal. Modificada de Barnett *et al.* (2009).

L'establiment de protocols de radioteràpia individualitzats es basa en el balanç entre disminuir la dosi, per limitar la incidència de complicacions severes del teixit normal a un nivell acceptable (aproximadament un 5%), i augmentar la dosi per incrementar la probabilitat de control del tumor (Burnet *et al.*, 1998; Barnett *et al.*, 2009) (Figura 10). Per aconseguir aquest propòsit, seria necessari un millor coneixement dels mecanismes que determinen i/o influeixen la radiosensibilitat intrínseca. Tot i que es coneix que hi ha diversos factors que poden contribuir a aquesta variabilitat interindividual, s'ha descrit que fins a un 80% podria estar determinada per factors genètics (Turesson *et al.*, 1996; Safwat *et al.*, 2002; Mayer *et al.*, 2011; Hornhardt *et al.*, 2014).

Aproximadament un 5% dels pacients de càncer que reben radioteràpia pateixen toxicitat del teixit normal (Chua i Rothkamm, 2013). Els efectes secundaris aguts tenen lloc durant o poc després del tractament, són normalment reversibles i generalment no es consideren limitants per a la dosi de radiació. Afecten sobretot a teixits amb una elevada taxa proliferativa, com la pell, el tracte gastrointestinal i el sistema hematopoètic. Els efectes secundaris tardans es

manifesten entre 6 mesos i varis anys després del tractament. Degut a que aquests efectes poden ser permanents, són els que determinen les restriccions aplicades en la dosi per limitar la toxicitat a nivells acceptables. Aquests efectes tardans tenen lloc en cèl·lules que es divideixen més lentament, com les del fetge, del cor i del sistema nerviós central. La patogènesi en el teixit normal inclou fibrosi, atròfia i dany vascular. Altres efectes inclouen infertilitat, deficiències hormonals i neoplàsies secundàries (Figura 11).

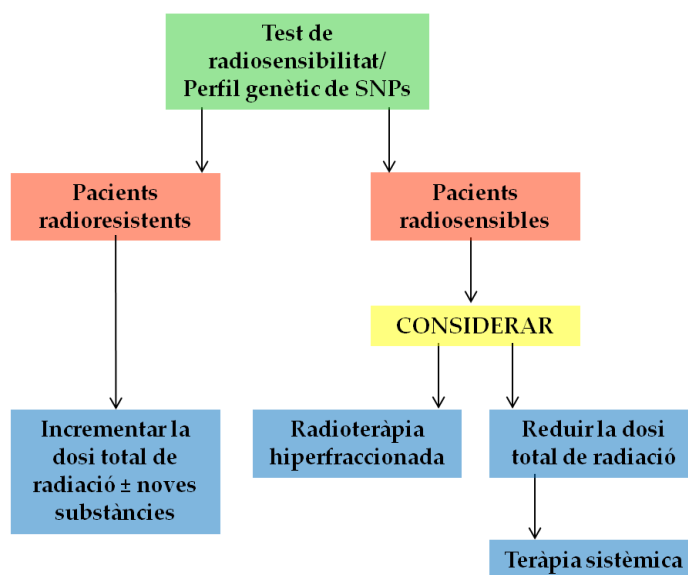


**Figura 11.** Efectes adversos aguts i tardans després de tractaments amb radioteràpia. Modificada de Barnett *et al.* (2009).

### 1.3.2. Desenvolupament d'assajos predictius basats en la radiosensibilitat cel·lular *in vitro*

S'han dedicat molts esforços a buscar un test que permeti conèixer si un pacient presentarà una radiosensibilitat acusada en els teixits normals. La identificació dels individus amb més risc de patir-la seria de gran importància donat que, en casos extrems, es podria realitzar un tractament de radioteràpia

hiperfraccionada, reduir la dosi total de radiació aplicada o buscar tractaments alternatius. En canvi, en els pacients amb una resposta més resistent, es podria incrementar la dosi per tal d'augmentar la probabilitat de control del tumor, amb la combinació de noves substàncies que indueixin la radiosensibilització dels tumors (Health Protection Agency, 2013; Maier *et al.*, 2016) (Figura 12).



**Figura 12.** Utilitat potencial d'un test predictiu de radiosensibilitat en tractaments de radioteràpia. Adaptada de Health Protection Agency (2013).

Els primers estudis realitzats en aquest camp es centraven principalment en individus amb una extrema radiosensibilitat a les RI, degut a que presentaven mutacions associades amb defectes en el reconeixement del dany en el DNA o en la seva reparació. Exemples serien les síndromes d'A-T (de l'anglès *ataxia-telangiectasia*), que presenten mutacions associades amb ATM, i de NBS (de l'anglès *nijmegen breakage syndrome*), que són deficientes en NBS1 (Taylor *et al.*, 1975; Weemaes *et al.*, 1981). No obstant, aquestes síndromes són molt rares i la radiosensibilitat associada afecta una petita part de la població.



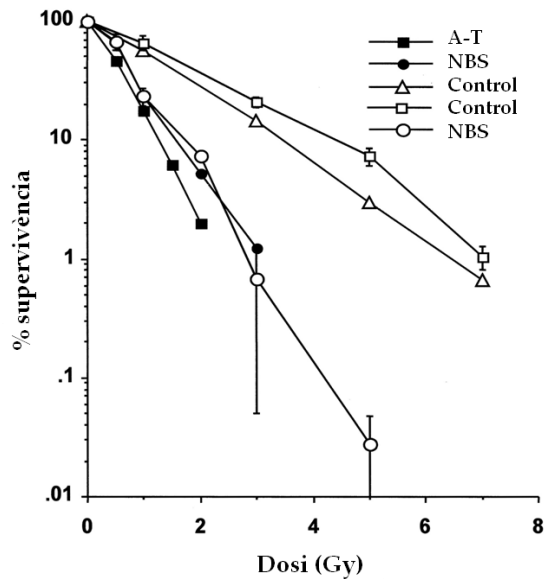
En els anys 1980s es va descriure que hi havia una variació en la radiosensibilitat de fibroblasts provinents de pacients amb o sense síndromes genètiques (Arlett i Harcourt, 1980; Little *et al.*, 1988). Per això, estudis posteriors es van centrar en investigar la relació entre la radiosensibilitat cel·lular avaluada *in vitro* i la toxicitat del teixit normal en tractaments de radioteràpia. L'objectiu d'aquests era el desenvolupament d'un assaig predictiu *in vitro* que permetés identificar els individus radiosensibles i, com a resultat, l'establiment de protocols de tractament individualitzats per a cada tipus de pacient (Burnet *et al.*, 1998). Tenint present aquest objectiu, els estudis es van dissenyar tenint en compte dues aproximacions: els estudis prospectius, on s'avaluava la resposta del teixit normal durant la radioteràpia (Geara *et al.*, 1993; Widell *et al.*, 2003; Beaton *et al.*, 2013a) i els estudis retrospectius, on s'avaluava aquesta resposta després de la radioteràpia (Nachtrab *et al.*, 1998; Hoeller *et al.*, 2003; Chua *et al.*, 2011). Els estudis mencionats van trobar una correlació positiva entre la radiosensibilitat cel·lular i clínica. En canvi, en altres estudis no es va trobar aquesta associació (Peacock *et al.*, 2000; Slonina *et al.*, 2000; El-Awady *et al.*, 2005; Werbrouck *et al.*, 2011), argumentant-se que altres factors biològics així com factors tècnics i/o metodològics (com el tipus d'assaig escollit) podrien explicar la variabilitat de resultats.

Els assajos que clàssicament s'han utilitzat i s'utilitzen encara per avaluar la radiosensibilitat són: el de clonogenicitat, els citogenètics, els de dany en el DNA i el d'apoptosi.

### **1.3.2.1. Assaig de clonogenicitat**

L'assaig de formació de colònies o clonogenicitat (de l'anglès *colony-forming or clonogenic assay*) es basa en la capacitat d'una sola cèl·lula per proliferar i formar una colònia, mesurant-se la fracció de supervivència o SF (de l'anglès *surviving*

*fraction*) entre 14 i 21 dies després d'una o varies dosis d'irradiació. Els primers estudis realitzats amb aquest assaig ja suggerien que existia una correlació entre la radiosensibilitat i una disminució de la SF tant utilitzant fibroblasts com limfòcits (Woods *et al.*, 1988; West *et al.*, 1995; Kiltie *et al.*, 1997; Girard *et al.*, 2000) (Figura 13).



**Figura 13.** Corbes de supervivència després de l'exposició a les dosis de radiació indicades en línies cel·lulars de fibroblasts provinents de pacients control i pacients amb les síndromes A-T i NBS. Modificada de Girard *et al.* (2000).

Malgrat que aquest assaig es considera lent i laboriós, encara és considerat com la tècnica *gold standard* per mesurar la radiosensibilitat cel·lular de cèl·lules tumorals (Hall *et al.*, 2014). No obstant, pel teixit normal s'han suggerit altres marcadors cel·lulars d'anàlisi més ràpida que podrien tenir interès en la vessant clínica. Els més estudiats són els assajos citogenètics, els assajos de dany en el DNA i l'assaig d'apoptosi (Chua i Rothkamm, 2013; Barnett *et al.*, 2015).

### 1.3.2.2. Assajos citogenètics

La radiosensibilitat també es pot avaluar realitzant el recompte d'alteracions de tipus cromosoma o de tipus cromàtide, o bé mitjançant el recompte de micronuclis.

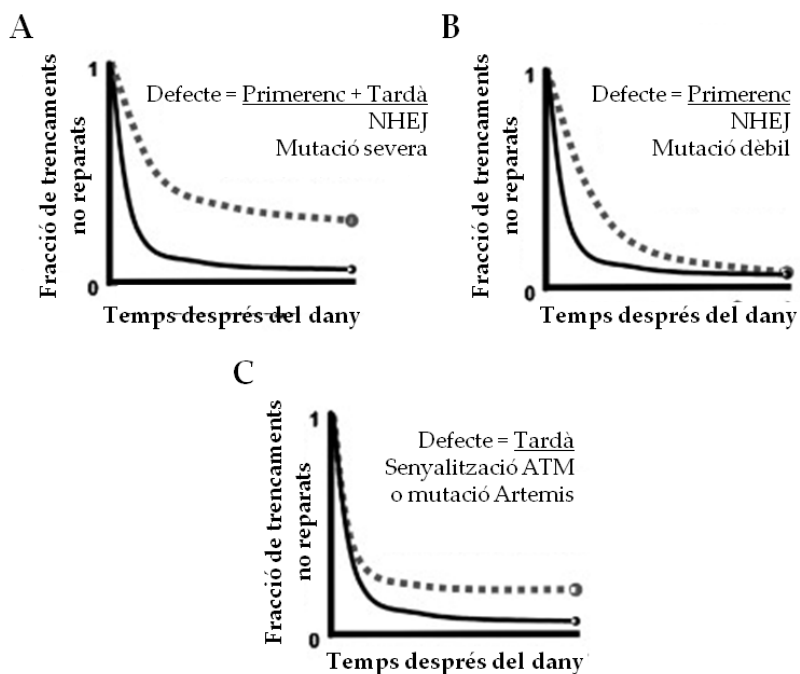
S'ha descrit una relació entre l'increment en el nombre d'alteracions de tipus cromosoma en limfòcits procedents de pacients amb càncer i una resposta del teixit normal més aguda després de la radioteràpia (Hoeller *et al.*, 2003; Chua *et al.*, 2011; Beaton *et al.*, 2013a; Beaton *et al.*, 2013b). L'anàlisi de la freqüència de *breaks* i *gaps* en limfòcits i en línies cel·lulars provinents de pacients després de la irradiació en la fase G2 del cicle cel·lular s'anomena *G2 assay* i és un mètode que s'ha proposat com un biomarcador per avaluar la radiosensibilitat individual (Sanford *et al.*, 1989; Pantelias i Terzoudi, 2011; Pinkawa *et al.*, 2016).

L'assaig de micronuclis va ser descrit per primer cop en limfòcits per Fenech i Morley l'any 1985, i mesura la freqüència de micronuclis que solen estar formats per peces cromosòmiques amb problemes de segregació durant la mitosi i que no s'integren als nuclis fills. Scott *et al.* (1998) van proposar aquest assaig com un possible test per predir la radiosensibilitat. Més tard, varis estudis també han trobat una correlació positiva entre la freqüència de micronuclis i la radiosensibilitat (Di Giorgio *et al.*, 2004; Sprung *et al.*, 2005; Djuzenova *et al.*, 2006). No obstant, altres estudis han reportat resultats controvertits (Barber *et al.*, 2000a; Finnon *et al.*, 2012; Pajic *et al.*, 2015). Pajic *et al.* (2015) van comparar la resposta de limfòcits exposats a RI amb l'assaig de dicèntrics i amb el de micronuclis i van veure que l'assaig de dicèntrics permetia una detecció més acurada.

### 1.3.2.3. Assajos de detecció de dany en el DNA

Com s'ha descrit anteriorment, la DDR té un paper clau en la detecció i reparació dels DSBs. Els individus que presenten síndromes o alteracions genètiques relacionades amb els mecanismes de reparació del DNA presenten una pronunciada radiosensibilitat. Per tant, l'estudi d'aquests mecanismes és clau per poder identificar biomarcadors de radiosensibilitat (Goodarzi i Jeggo, 2012).

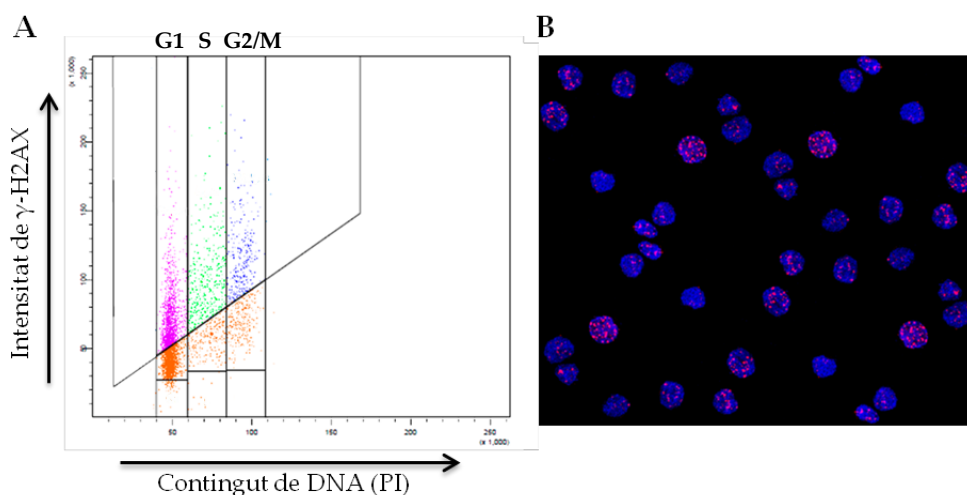
Com s'ha comentat en l'apartat 1.2.1., un dels primers esdeveniments que té lloc després la formació d'un DSB és la fosforilació de la histona H2AX en el residu Ser139 ( $\gamma$ -H2AX). Aquesta fosforilació afecta milers d'histones de les regions que flanquegen un DSB i poden ser detectades microscòpicament, amb anticossos fluorescents específics, com a petits *foci* (Rogakou *et al.*, 1999). El nombre de *foci* de  $\gamma$ -H2AX es correlaciona amb el nombre de DSBs radioinduits (Rothkamm i Löbrich, 2003). S'ha descrit que una major inducció de *foci* de  $\gamma$ -H2AX, una desaparició més lenta d'aquests amb el temps post-irradiació, així com la presència de *foci* residuals es podria relacionar amb radiosensibilitat (MacPhail *et al.*, 2003a; Olive i Banáth, 2004; Taneja *et al.*, 2004; Vasireddy *et al.*, 2010; Goodarzi i Jeggo, 2012; Djuzenova *et al.*, 2013; Maroschik *et al.*, 2014; van Oorschot *et al.*, 2016) (Figura 14). De fet la fosforilació de la histona H2AX es considera com un biomarcador d'exposició a radiació (Rothkamm i Horn, 2009) i s'ha proposat com un marcador predictiu de toxicitat del teixit normal en pacients tractats amb radioteràpia (Bourton *et al.*, 2011; Rothkamm *et al.*, 2015).



**Figura 14.** Cinètiques de reparació de DSBs avaluades mitjançant el recompte de *foci* de  $\gamma$ -H2AX en pacients amb defectes en gens implicats en la reparació NHEJ o en la DDR. Diagrames on es mostra (amb una línia de punts) el típic perfil de reparació associat amb una mutació severa (A) o amb una mutació dèbil (B) de gens implicats en la NHEJ, o amb una mutació en la via de senyalització d'ATM o en Artemis (C) comparat amb un control (línia continua). Modificada de Goodarzi i Jeggo (2012).

La histona  $\gamma$ -H2AX i altres proteïnes de la DDR, com per exemple ATM, 53BP1 i MDC1, es poden detectar amb tècniques d'immunodetecció, tant de microscòpia com de citometria de flux. Tot i que es pot fer el recompte manual de *foci* en microscopi, és una metodologia lenta i laboriosa, i pot ésser subjectiva i propensa a error (Böcker i Iliakis, 2006; Ivashkevich *et al.*, 2012), particularment a altes dosis. Per aquesta raó, s'han desenvolupat algorismes computacionals d'anàlisi d'imatges que permeten un recompte més ràpid i consistent d'aquests *foci*, així com l'anàlisi d'altres propietats, com la intensitat i àrea d'aquests, i l'àrea nuclear (Cai *et al.*, 2009; Vandersickel *et al.*, 2010; Ivashkevich *et al.*, 2011; Rasche *et al.*, 2016).

La citometria de flux mesura la intensitat de immunofluorescència o IF (de l'anglès *immunofluorescence*) total de  $\gamma$ -H2AX en milers de cèl·lules, i a més permet distingir en quina fase del cicle cel·lular es troben les cèl·lules analitzades (Tanaka *et al.*, 2007; Chappell *et al.*, 2010). Malgrat que les cèl·lules presents en les fases S i G2 del cicle cel·lular poden presentar *foci* produïts per la replicació del DNA (MacPhail *et al.*, 2003b; Schmid *et al.*, 2012), la citometria de flux es presenta com una eina d'especial interès per realitzar recomptes de *foci* d'histona en diferents fases del cicle cel·lular (Figura 15).



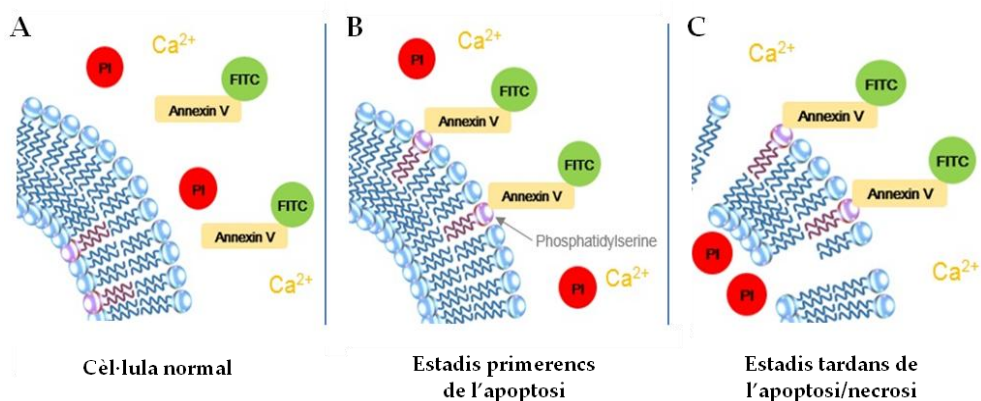
**Figura 15.** Quantificació de la fosforilació de la histona H2AX després de la irradiació a la dosi d'1 Gy avaluada per citometria de flux i per microscòpia. (A) Diagrama de punts (*dot plot*) representatiu de la citometria de flux on es pot visualitzar la intensitat d'IF de  $\gamma$ -H2AX en cèl·lules en diferents fases del cicle cel·lular (G1, S i G2/M). (B) Imatge microscòpica de *foci* de  $\gamma$ -H2AX en nuclis interfàsics.

#### 1.3.2.4. Assaig d'apoptosi

Els assajos que mesuren l'apoptosi també s'han utilitzat com una eina per determinar la radiosensibilitat (Health Protection Agency, 2013; Barnett *et al.*, 2015). No obstant, els resultats són a dia d'avui controvertits. Alguns estudis han trobat una clara relació entre l'apoptosi de limfòcits i la toxicitat del teixit normal

a la radioteràpia (Ozsahin *et al.*, 2005; Bordón *et al.*, 2011; Pinkawa *et al.*, 2016). En canvi, altres no han trobat cap associació (Barber *et al.*, 2000b; Chua *et al.*, 2014).

Un dels primers canvis que es produeixen en l'apoptosi és la translocació del fosfolípid fosfatidilserina de la monocapa interna a la monocapa externa de la membrana plasmàtica, translocació que es pot visualitzar utilitzant la proteïna annexina V conjugada amb una molècula fluorescent (van Engeland *et al.*, 1998). Per distingir les cèl·lules apoptòtiques de les necròtiques s'utilitza l'annexina V conjuntament amb iodur de propidi o PI (de l'anglès *propidium iodide*), un agent que tenyeix la cromatina només en el cas que la membrana plasmàtica estigui danyada, com és el cas de les cèl·lules necròtiques (Figura 16). L'anàlisi es pot fer tant amb citometria de flux com amb un microscopi de fluorescència. Per detectar apoptosi també es poden utilitzar altres metodologies com l'assaig TUNEL (de l'anglès *terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling*) que permet detectar la fragmentació del DNA per l'addició de nucleòtids fluorescents en els extrems 3'-OH del DNA.



**Figura 16.** Esquema del marcatge amb annexina V i PI en diferents estadis de la mort cel·lular. (A) Cèl·lula normal. (B) En els estadis primerencs de l'apoptosi l'annexina V s'uneix a la fosfatidilserina que s'ha translocat a la monocapa externa de la membrana plasmàtica. (C) En una etapa més tardana, la membrana plasmàtica es desestructura, permetent l'entrada del PI a l'interior de la cèl·lula. Modificada de [www.dojindo.eu.com](http://www.dojindo.eu.com).

### 1.3.2.5. Estudis basats en genòmica i transcriptòmica funcional

La genòmica i transcriptòmica funcional pot ajudar en la identificació de gens que poden estar implicats en la radiosensibilitat clínica. Els gens candidats estudiats solen estar relacionats amb: la detecció del dany en el DNA o en la seva reparació, control del cicle cel·lular, apoptosi, resposta antiinflamatòria i estrès oxidatiu, entre d'altres.

#### 1.3.2.5.1. Radiogenòmica

Actualment, la radiosensibilitat és considerada un tret complex que depèn de la interacció de varis gens involucrats en múltiples processos biològics. Des de finals dels anys 1990s es va considerar que la radiosensibilitat del teixit normal tenia una base genètica i actualment es creu que la toxicitat produïda per la radiació pot predir-se amb anàlisis genòmiques (Barnett *et al.*, 2015; Andreassen *et al.*, 2016). L'objectiu de la radiogenòmica és intentar establir un test predictiu que permeti la identificació de perfils genètics que puguin relacionar-se amb radiosensibilitat, per tal de poder oferir tractaments de radioteràpia optimitzats per a cada tipus de pacient (Scaife *et al.*, 2015). L'anàlisi de perfils genètics pot realitzar-se mitjançant el genotipatge de polimorfismes (majoritàriament SNPs, de l'anglès *single nucleotide polymorphisms*) en gens candidats, o l'estudi d'aquests polimorfismes en el genoma complet o GWAS (de l'anglès *genome-wide association study*).

En el primer es busquen associacions entre polimorfismes en gens candidats i el risc de desenvolupar complicacions després de la radioteràpia (Andreassen i Alsner, 2009). Els gens en que es busquen polimorfismes estan involucrats en la resposta a la radiació, específicament relacionats amb la resposta al dany en el DNA (per exemple *ATM*, *BRCA1/2*, *XRCC1* i *TP53*), resposta antiinflamatòria (per exemple *TGFB1*) i eliminació de radicals lliures (per exemple *SOD2*). Tot i



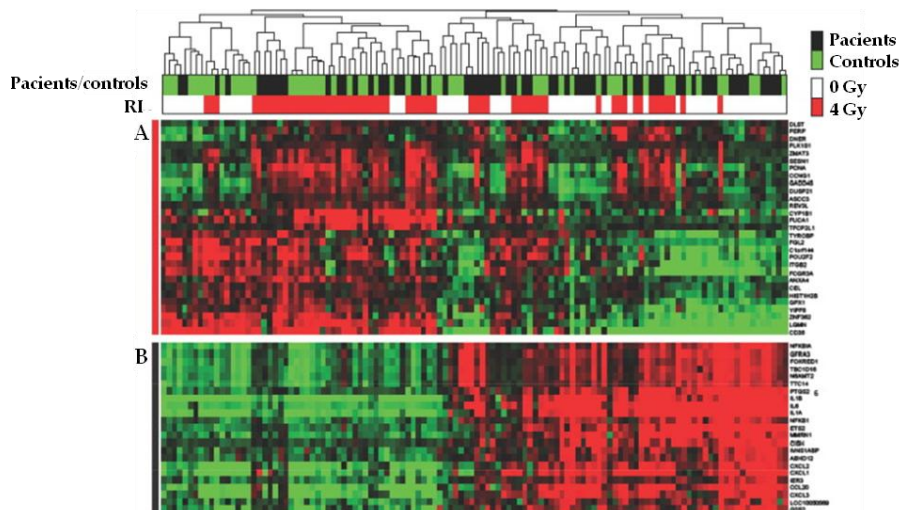
haver-se realitzat molts estudis amb gens candidats, la majoria d'aquests han estat inconsistents i els resultats rarament es poden associar amb toxicitat (Barnett *et al.*, 2012; Barnett *et al.*, 2015; Andreassen *et al.*, 2016).

Els estudis de GWAS representen una alternativa a l'estudi de gens candidats específics sense assumir a priori quins gens són importants (revisat per Manolio, 2010). Aquests estudis tenen l'avantatge que poden permetre la identificació de nous gens associats amb toxicitat. Un avenç important es va produir amb l'establiment d'un consorci de radiogenòmica a l'any 2010, l'objectiu del qual era crear sinergies entre diferents grups d'investigació per poder incrementar el nombre de pacients estudiats (West *et al.*, 2010). Alguns estudis han identificat un nou gen (*TANC1*) que podria relacionar-se amb el desenvolupament d'efectes secundaris tardans (Fachal *et al.*, 2014). També s'han identificat SNPs potencialment associats amb toxicitat dos anys després de la radioteràpia en pacients amb càncer (Barnett *et al.*, 2014).

#### ***1.3.2.5.2. Estudis d'expressió gènica***

Els mecanismes de regulació gènica en cèl·lules exposades a RI actuen a nivell transcripcional i a nivell posttranscripcional. La transcriptòmica funcional, amb concret l'anàlisi de perfils d'expressió gènica a nivell d'RNA missatger en individus que presenten diferent radiotoxicitat, s'ha descrit com una possible eina en la identificació de biomarcadors per predir reaccions adverses. Una de les metodologies més emprades han estat els *microarrays* d'expressió, que es basen en mètodes d'hibridació per mesurar canvis en l'expressió gènica en milers de gens simultàniament (Figura 17). Concretament, es tracta d'una hibridació competitiva entre el cDNA d'una mostra (marcat amb un fluorocrom) i el d'un control (marcat amb un altre fluorocrom) front a una sonda immobilitzada sobre un suport sòlid per cada punt del *microarray*. Mitjançant la

utilització de *microarrays*, alguns estudis han correlacionat la toxicitat després de la radioteràpia amb perfils d'expressió en limfòcits irradiats in vitro d'aquests pacients (Svensson *et al.*, 2006; Henríquez Hernández *et al.*, 2009; Mayer *et al.*, 2011). Altres autors han identificat perfils en línies cel·lulars limfoblàstoides o LCLs (de l'anglès *lymphoblastoid cell lines*) associats amb radiosensibilitat cel·lular (Amundson *et al.*, 2008; Smirnov *et al.*, 2012).



**Figura 17.** Resultats obtinguts d'un *microarray* amb els perfils d'expressió de 59 mostres de sang de pacients i de controls, irradiades in vitro a 4 Gy i no irradiades. (A) Panell on es mostra un clúster que conté els gens més significativament sobreexpressats en les mostres irradiades. (B) Panell on es mostra un clúster que conté els gens més significativament subexpressats en les mostres irradiades. Modificada de Finnon *et al.* (2012).

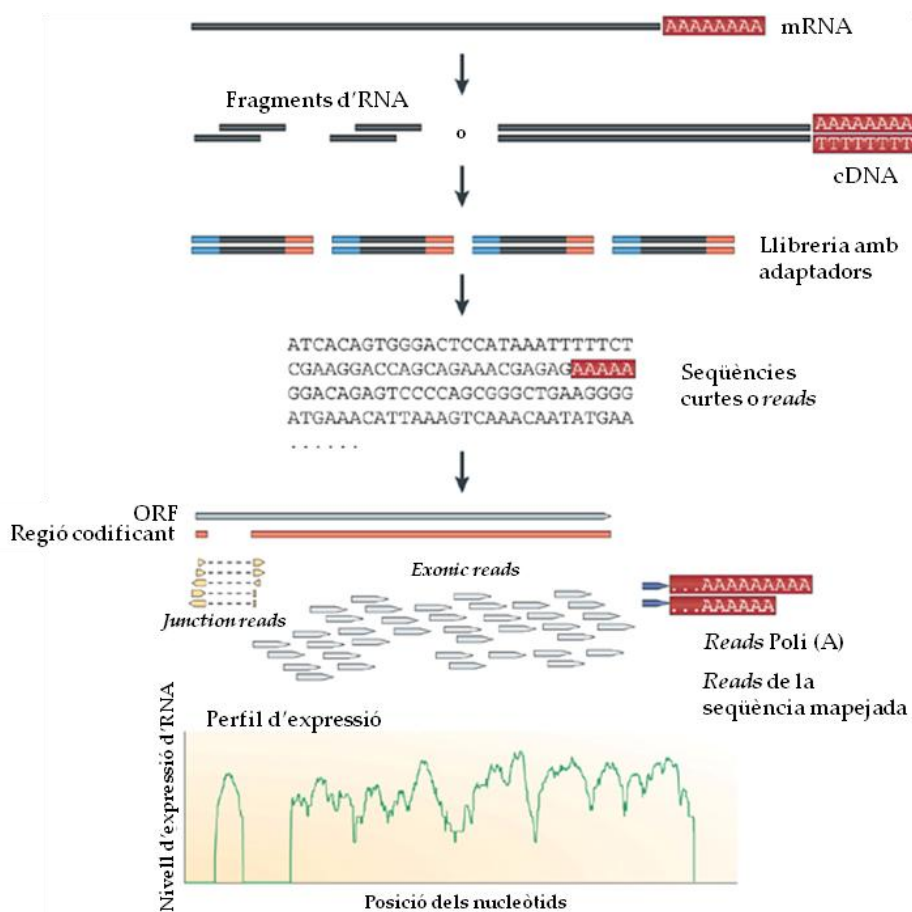
La introducció de la tecnologia de seqüenciació de segona generació o NGS (de l'anglès *next-generation sequencing*) representa una eina prometedora en la cerca de biomarcadors de radiosensibilitat (Tinhofer *et al.*, 2015), especialment l'anàlisi del transcriptoma a través de la seqüenciació massiva del cDNA, tecnologia coneguda com RNA-Seq (de l'anglès *RNA-sequencing analysis*). Aquesta tecnologia proporciona mesures més precises dels nivells dels transcrits i de les seves isoformes presents en una cèl·lula en comparació amb els *microarrays*

(Taula 1). També millora algunes de les limitacions dels *microarrays*, els quals presenten alts nivells de *background* i un rang dinàmic limitat. A més, comparar nivells d'expressió entre diferents experiments és sovint difícil i pot requerir mètodes de normalització complicats. No obstant, la tecnologia RNA-Seq permet determinar directament les seqüències de cDNA i quantificar-les més acuradament, i per tant l'error és menor (Wang *et al.*, 2009; Ozsolak i Milos, 2011).

**Taula 1.** Avantatges de la tecnologia RNA-Seq en comparació amb altres metodologies per estudiar el transcriptoma. Adaptada de Wang *et al.* (2009).

<b>Tecnologia</b>	<i>Microarray</i>	<b>Seqüenciació cDNA</b>	<b>RNA-Seq</b>
<b><i>Especificacions</i></b>			
Principi	Hibridació	Seqüenciació Sanger	Seqüenciació d'alt rendiment
Resolució	Fins a 100 pb	Una sola base	Una sola base
Rendiment	Alt	Baix	Alt
Fiabilitat de la seqüència genòmica	Sí	Baixa	En alguns casos
<i>Background</i>	Alt	Baix	Baix
<b><i>Aplicacions</i></b>			
Rang dinàmic per quantificar nivells d'expressió	Fins a pocs centenars de vegades	No	> 8,000 vegades
Habilitat per distingir diferents isoformes	Limitada	Sí	Sí
Habilitat per distingir expressió al·lèlica	Limitada	Sí	Sí
<b><i>Qüestions pràctiques</i></b>			
Quantitat d'RNA necessària	Alta	Alta	Baixa
Cost per seqüenciar transcriptomes de genomes grans	Alt	Alt	Relativament baix

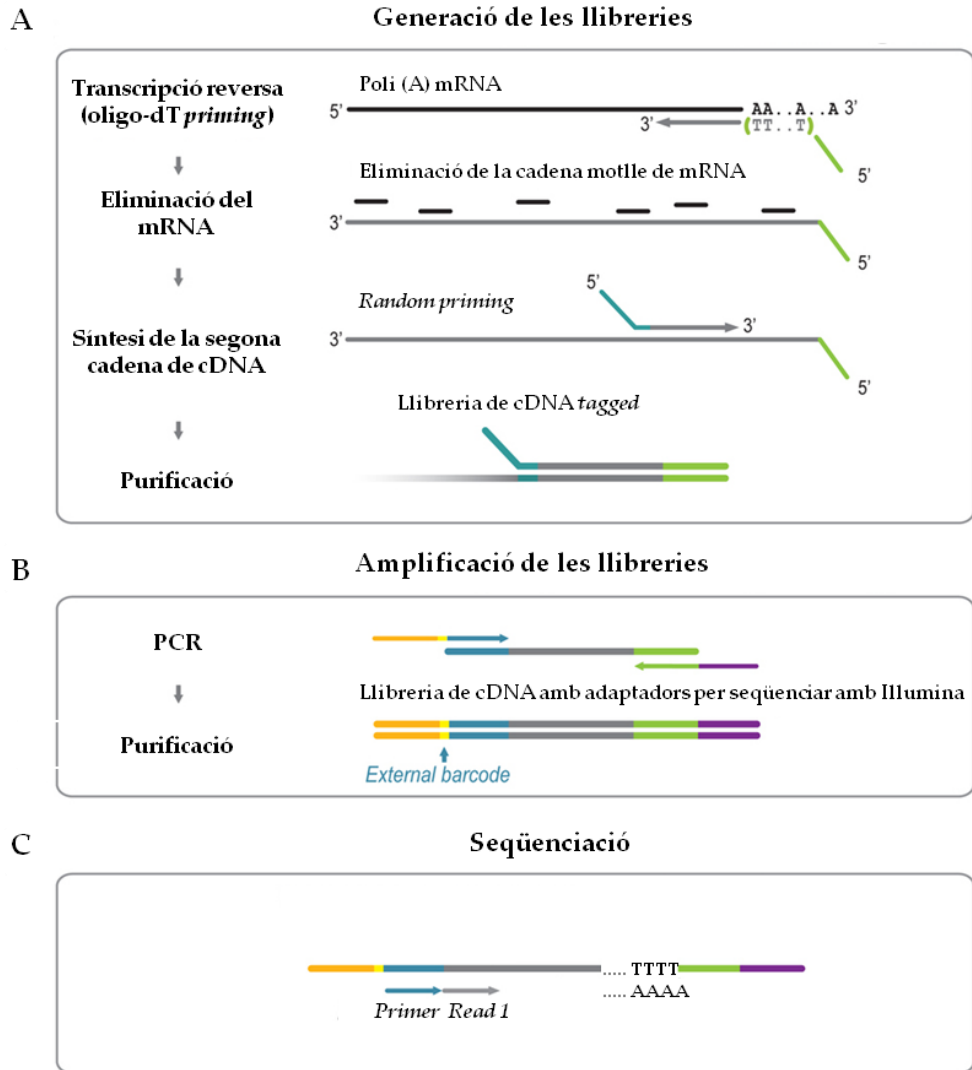
El primer pas de l'RNA-Seq és convertir el RNA en una llibreria de fragments de cDNA amb adaptadors lligats en els dos extrems (Figura 18). Si són RNAs petits (com microRNAs, siRNAs, etc) poden ser directament seqüenciats després de la unió dels adaptadors, en canvi, molècules més grans de RNA com el mRNA han de ser fragmentades en peces més petites (200-500 pb), abans de lligar els adaptadors, per ser compatibles amb la tecnologia de seqüenciació. Posteriorment, cada molècula és seqüenciada obtenint-se unes seqüències curtes anomenades *reads*. Aquests *reads* s'alineen contra un genoma de referència, es quantifiquen i es genera un perfil d'expressió per cada gen (Wang *et al.*, 2009).



**Figura 18.** Esquema d'un experiment d'RNA-Seq. Modificada de Wang *et al.* (2009).

Encara que l'RNA-Seq és una tècnica en desenvolupament i hi ha pocs estudis publicats sobre radiosensibilitat, els resultats són prometedors. S'han caracteritzat perfils d'expressió gènica en línies cel·lulars de càncer de pulmó i de pròstata, així com en fibroblasts procedents de pacients que van desenvolupar fibrosi després de la radioteràpia. Aquests estudis van permetre identificar potencials biomarcadors de radiosensibilitat i radioresistència que podrien servir per predir la resposta d'aquests tipus de càncer i de fibrosi (Yang *et al.*, 2013; Forrester *et al.*, 2014; Young *et al.*, 2014).

L'any 2014 es va publicar en la revista *Nature Methods* una nova metodologia per realitzar estudis d'expressió gènica anomenada QuantSeq i que es basa en la generació de llibreries de cDNA només a partir dels extrems propers a la cua 3' (poli A) del mRNA (Moll *et al.*, 2014) (Figura 19). Les llibreries de cDNA generades són compatibles amb plataformes com Illumina per poder realitzar posteriorment la seqüenciació. A més, només es genera un *read* per cada transcrit de mRNA. L'avantatge que això representa front a l'RNA-Seq convencional és una reducció significativa del cost d'un estudi d'expressió gènica, ja que en els estudis d'RNA-Seq total s'han de seqüenciar molts *reads* per cada transcrit. A més, amb la metodologia QuantSeq es pot fer una quantificació molt acurada dels valors d'expressió gènica ja que no es requereix una normalització dels *reads* basant-se en la longitud dels gens, que sí que s'ha de fer als estudis d'RNA-Seq, on el nombre de *reads* s'espera que sigui proporcional a la llargada d'un gen i per tant, gens més llargs generarien més *reads* i tindrien una expressió major en comparació amb gens més curts (Tarazona *et al.*, 2011). Així, amb la metodologia QuantSeq la quantificació de l'expressió dels gens pot fer-se directament fent el recompte del nombre de *reads* i associant-los a l'expressió d'un gen concret, estalviant recursos computacionals.



**Figura 19.** Esquema de la metodologia QuantSeq. (A) Generació de les lliberies. (B) Amplificació de les lliberies. (C) Seqüenciació *single-read*. Modificada de Moll *et al.* (2014).



---

## 2. OBJECTIUS

---





El principal objectiu d'aquesta tesi doctoral és l'estudi de la resposta de dues línies cel·lulars limfoblastoides amb diferent sensibilitat a les radiacions ionitzants mitjançant assajos cel·lulars i estudis d'expressió gènica.

Aquest objectiu general es concreta en els següents objectius parcials:

1. Avaluar la fosforilació de la histona H2AX amb diferents mètodes microscòpics i de citometria de flux 2 h després d'irradiar i identificar quina metodologia permet un recompte més ràpid dels *foci* d'histona.
2. Avaluar la inducció de *foci* de  $\gamma$ -H2AX per les radiacions ionitzants i la seva cinètica de desaparició en les dues línies cel·lulars mitjançant un sistema automàtic de recompte microscòpic.
3. Determinar l'eficiència de reparació de les dues línies cel·lulars, analitzant les alteracions cromosòmiques completes i incompletes mitjançant la tècnica de FISH amb sondes PNA pancentromèriques i pantelomèriques.
4. Avaluar la inducció de mort cel·lular per les radiacions ionitzants en les dues línies cel·lulars.
5. Determinar si hi ha diferències en els perfils d'expressió gènica de les dues línies cel·lulars a diferents temps postirradiació mitjançant la tecnologia QuantSeq.



---

# 3. RESULTATS

---



### **3.1. Comparison of methods to quantify histone H2AX phosphorylation and its usefulness for prediction of radiosensitivity**

**Borràs M, Armengol G, De Cabo M, Barquinero JF & Barrios L, 2015.  
*International Journal of Radiation Biology*, 91(12), pp.915–924.**



### **3.2. Differences in DNA repair capacity, cell death and transcriptional response after irradiation between a radiosensitive and a radioresistant cell line**





**TITLE:** Differences in DNA Repair Capacity, Cell Death and Transcriptional Response after Irradiation between a Radiosensitive and a Radioresistant Cell Line

**AUTHORS LIST AND AFFILIATIONS:** Mireia Borràs-Fresneda<sup>1</sup>, Joan-Francesc Barquinero<sup>2</sup>, Maria Gomolka<sup>3</sup>, Sabine Hornhardt<sup>3</sup>, Ute Rössler<sup>3</sup>, Gemma Armengol<sup>2\*</sup> and Leonardo Barrios<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Departament de Biologia Cel·lular, Fisiologia i Immunologia, Unitat de Biologia Cel·lular, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra, Catalonia, Spain

<sup>2</sup>Departament de Biologia Animal, Biologia Vegetal i Ecologia, Unitat d'Antropologia Biològica, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra, Catalonia, Spain

<sup>3</sup>Department Radiation Protection and Health, Federal Office for Radiation Protection, Neuherberg, Germany

\*Leonard.Barrios@uab.cat

\*Gemma.Armengol@uab.cat

\*these authors contributed equally to this work

## **ABSTRACT**

Normal tissue toxicity after radiotherapy shows variability between patients, indicating inter-individual differences in radiosensitivity. Genetic variation probably contributes to these differences. The aim of the present study was to determine if two cell lines, one radiosensitive (RS) and another radioresistant (RR), showed differences in DNA repair capacity and cell viability and, in turn, if this response could be characterised by a differential gene expression profile at different post-irradiation times. After irradiation, the RS cell line showed a slower rate of  $\gamma$ -H2AX foci disappearance, a higher frequency of incomplete chromosomal aberrations and reduced cell viability when compared with the RR cell line. Moreover, a greater and a prolonged transcriptional response after irradiation was induced in the RS cell line. Functional analysis showed that 24 h after irradiation genes involved in DNA damage response, negative regulation of the cell cycle and apoptosis were still differentially up-regulated in the RS cell line but not in the RR cell line. These data suggest that the RS cell line may be less efficient in DNA repair as well as in the cell-cycle control in comparison with the RR cell line. The results emphasise the importance to identify biomarkers of radiosensitivity for tailoring individualized radiotherapy protocols.

## **INTRODUCTION**

Radiotherapy is used to treat more than 50% of diagnosed cancers<sup>1,2</sup>. It is well known that, even when patients are treated with the same curative dose, normal tissue toxicity shows variability between patients, indicating inter-individual differences in the intrinsic radiosensitivity<sup>1,3-5</sup>. The mechanisms influencing intrinsic radiosensitivity still remain unclear and many factors may contribute to it, but it has been suggested that up to 80% of this variability could have a

genetic basis<sup>3,6-8</sup>. In this sense, a better knowledge of these factors should lead to the development of *in vitro* predictive assays to identify radiosensitive individuals and, as a result, to establish individualised radiation therapy protocols<sup>6</sup>.

Although several promising biomarkers of cellular radiosensitivity have been tested, there is not enough evidence of their utility in clinical practice<sup>9</sup>. Among them, DNA damage markers, specifically those related with DNA double-strand breaks (DSBs), have been analysed and a certain level of association between cellular radiosensitivity tested *in vitro* and normal tissue reactions after radiotherapy has been observed<sup>10-15</sup>. On this basis, increased chromosomal aberration yields in peripheral blood lymphocytes and cell lines have been linked to radiosensitivity following *in vitro* ionising radiation (IR)<sup>16,17</sup>. It has also been described that the number of  $\gamma$ -H2AX foci is correlated with the number of radio-induced DSBs and that differences observed among individuals in the repair kinetics of  $\gamma$ -H2AX are possibly related with differences in radiosensitivity<sup>18-20</sup>.

Radiosensitivity is currently considered an inherited polygenic trait, dependent on the interaction of many genes<sup>1</sup>. In this regard, genetic variation probably contributes to inter-individual differences in developing undesirable side effects after radiotherapy. The analysis of gene expression profiles in individuals with different radiation toxicity will probably help to identify relevant candidate genes to predict these adverse side effects. Up to now, the great extent of transcriptomic studies have been based on microarray hybridisation technologies to measure gene expression changes from thousands of genes simultaneously, trying to identify biomarkers of radiation response<sup>21,22</sup>. Previous studies have described several gene expression signatures after irradiation in lymphocytes from patients or lymphoblastoid cell lines (LCLs) with different

radiosensitivity<sup>23-25</sup>. The development of new high-throughput methods such as next-generation sequencing (NGS) technology, specifically using RNA sequencing analysis (RNA-seq)<sup>26,27</sup>, represents a promising tool to find biomarkers of radiation response.

Overall, most studies performed so far have tried to predict the radiation response using either cell-based assays or expression analysis but only few of them have used both approaches<sup>25,28</sup>. In a previous study, we observed differences in the levels of histone H2AX phosphorylation between a radiosensitive (RS) and a radioresistant (RR) cell line<sup>29</sup>. The aim of the present study was to determine if these differences could be related to DNA repair capacity or cell death and, in turn, if this response could be characterised by a differential gene expression profile at different post-irradiation times.

## RESULTS

**After irradiation, a slower rate of  $\gamma$ -H2AX foci disappearance, a higher frequency of incomplete chromosome elements and a reduced cell viability were observed in the RS cell line in comparison with the RR cell line**

After 1 and 2 Gy irradiation,  $\gamma$ -H2AX foci induction and kinetics of their disappearance with post-irradiation time were assessed (Fig. 1A-1C). At each analysis point, data sets from the two replicas were merged because no significant differences were observed. The maximum level of H2AX phosphorylation at both doses and for both cell lines was reached 30 min post-irradiation. The RS cell line showed significantly higher foci counts than the RR cell line for almost all the post-irradiation times tested ( $p < 0.01$ , Mann-Whitney test), except for 30 min after 1 Gy irradiation. To test if differences existed in the

rate of  $\gamma$ -H2AX disappearance with post-irradiation time between both cell lines, data were fitted to a one phase decay non-linear regression curve (Fig. 1B and 1C). The results clearly showed a prolonged half-life of  $\gamma$ -H2AX foci in the RS cell line in comparison with the RR cell line, 4.9 vs. 2.4 h at 1 Gy and 4.1 vs. 2.6 h at 2 Gy.

Using pancentromeric and pantelomeric fluorescent in situ hybridization (FISH) probes, chromosome aberrations were scored after 2 Gy of irradiation (Fig. 1D, Supplementary Table S1). As can be seen in Fig 1E, the frequency of incomplete chromosome elements (ICE), those without one or two telomeric signals, was higher in the RS cell line than in the RR cell line ( $p < 0.05$ , Mann-Whitney test). On the other hand, the frequency of complete chromosome elements (CCE) was higher for the RR cell line, but without statistical significance.

Results of cell viability after 2 Gy are presented in Fig. 1F. The results were plotted as the mean percentage of viable cells from two independent experiments. The percentage of viable cells after irradiation in the RS cell line was significantly lower than in the RR cell line, both at 4 and 24 h after irradiation ( $p < 0.001$ , z-test). A significant viability reduction between 4 and 24 h after irradiation was also observed in the RS ( $p < 0.01$ , z-test) and in the RR ( $p < 0.05$ , z-test) cell line.

### **QuantSeq analysis revealed a greater and a prolonged differential expression of genes after irradiation in the RS cell line in comparison with the RR cell line**

The expression of genes involved in radiation response was evaluated by QuantSeq methodology at different time points up to 14 days post-irradiation. The results obtained for both cell lines on irradiated versus sham-irradiated

samples at 4 and 24 h and 14 days after irradiation are available in Supplementary Datasets S1-S6.

The analysis showed differences between the RS and the RR cell line in the number of differentially expressed (DE) genes following 2 Gy irradiation (Supplementary Table S2). At 4 h after irradiation a greater transcriptional response was induced in the RS cell line (96 DE genes, 78 up-regulated and 18 down-regulated) when compared with the RR cell line (36 DE genes, 33 up-regulated and three down-regulated). At 24 h after irradiation, the same tendency was observed, the RS cell line still showed 58 DE genes (53 up-regulated and five down-regulated), whereas only seven genes were significantly up-regulated for the RR cell line. At 14 days after irradiation, there were no DE genes between the sham-irradiated samples and irradiated samples from both the RS and the RR cell line.

**Functional analysis showed that genes related with DNA damage response, negative regulation of cell cycle and apoptosis were still differentially up-regulated 24 h after irradiation in the RS cell line but not in the RR cell line**

Gene enrichment analysis using the ToppGene platform was performed. The set of differentially up-regulated genes for both cell lines 4 and 24 h after irradiation was enriched in pathways and biological processes known to be involved in radiation response, such as DNA damage response, cell cycle regulation and apoptosis (Tables 1-4).

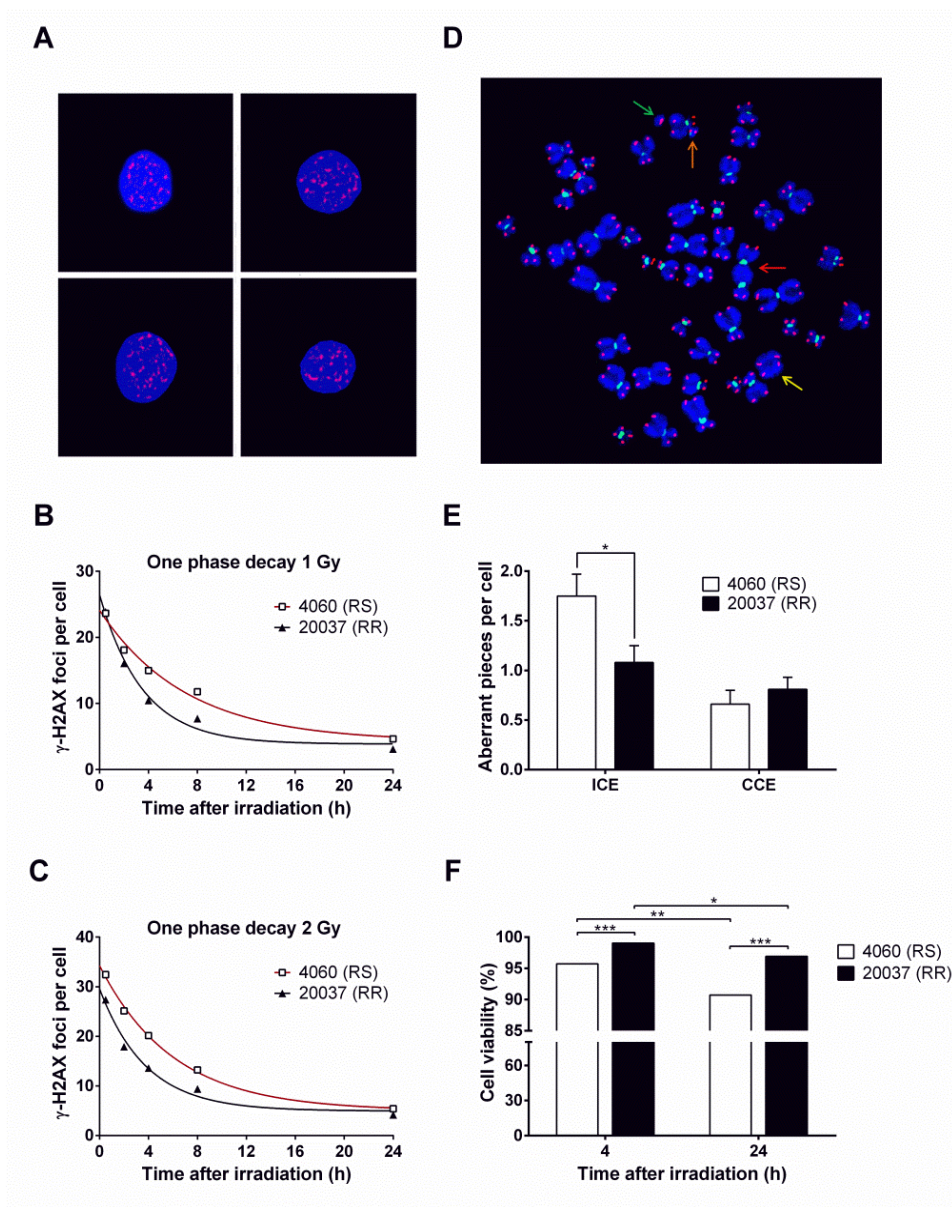
In the RS cell line 4 h after irradiation the most enriched pathways were “direct p53 effectors” and “DNA damage response” (Table 1). Up to 24 h after irradiation, the same pathways were still enriched. In relation to biological

processes at 4 h after irradiation, significant gene enrichment was found for “apoptotic process”, “cellular response to DNA damage stimulus” and “negative regulation of cell cycle” (Table 2). At 24 h after irradiation, the same biological processes were still enriched. For the down-regulated genes in the RS cell line, the only biological process enriched was “cell division” 4 h after irradiation (Table 2).

Regarding the differentially up-regulated genes of the RR cell line, the most enriched pathways were “direct p53 effectors” and “DNA damage response”, but only 4 h after irradiation (Table 3). In relation to biological processes, the most enriched one was “intrinsic apoptotic signaling pathway in response to DNA damage by p53 class mediator” at 4 h after irradiation (Table 4). For the down-regulated genes in the RR cell line, the only biological process enriched was “mitotic cell cycle process” but only 4 h after irradiation (Table 4).

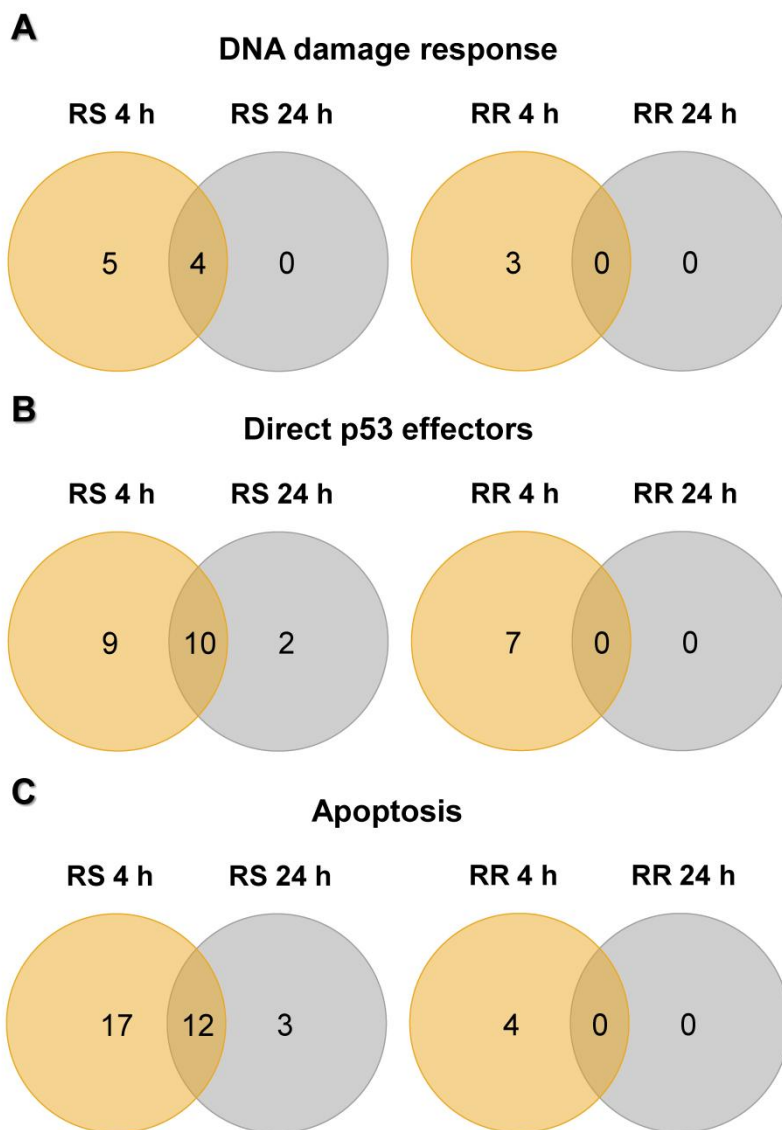
To identify differences in up-regulated genes between both cell lines at different times after irradiation, Venn diagram analysis were performed for “DNA damage response”, “direct p53 effectors” and apoptosis (Fig. 2). As can be seen, most of the genes up-regulated in the RS cell line 24 h after irradiation were already present 4 h after irradiation. In contrast, the RR cell line did not show any DE genes 24 h after irradiation for any of the categories considered.





**Fig. 1. Cell-based assays in the RS (4060) and the RR (20037) cell line after irradiation.** (A) MetaCyte images of  $\gamma$ -H2AX foci in the RS cell line 30 min after 2 Gy irradiation. (B and C) One phase decay curves of  $\gamma$ -H2AX foci disappearance after exposure to 1 Gy (B) and 2 Gy (C).  $\gamma$ -H2AX foci were scored in 800 cells for each particular experimental condition. (D) Metaphase image from the RS cell line analysed by pancentromeric and pantelomeric PNA-FISH. A dic(+/-) (red arrow), an ace(+/-) (yellow arrow), a chr(+/-) (orange arrow) and an ace(+/-) (green arrow) were

observed. (E) Frequencies of ICE and CCE analysed by FISH. FISH analysis was carried out 24 h after 2 Gy irradiation. One hundred metaphases were analysed for each particular condition. Data were plotted as frequencies  $\pm$  SE (error bars). Asterisk denotes significant differences ( $p < 0.05$ , Mann-Whitney test). (F) Cell viability of the RS and the RR cell line 4 and 24 h after 2 Gy irradiation. Results were normalised to sham-irradiated cells and are expressed as mean percentage of viable cells from two independent experiments. A minimum of 1000 cells were analysed for each particular experimental condition. Asterisks denote significant differences (\*,  $p < 0.05$ ; \*\*,  $p < 0.01$ ; \*\*\*,  $p < 0.001$ , z-test).



**Fig. 2.** Venn diagrams of differentially up-regulated genes in the RS (4060) and the RR (20037) cell line, grouped according to the pathway or the biological process affected, 4 and 24 h after 2 Gy irradiation. (A) Differentially up-regulated genes related to the pathway “DNA damage response”. (B) Differentially up-regulated genes related to the pathway “direct 53 effectors”. (C) Differentially up-regulated genes related to biological processes of apoptosis.

**Table 1. Pathway analysis of DE genes in the RS (4060) cell line 4 and 24 h after 2 Gy irradiation**

Pathway	P value <sup>a</sup>	Number of genes	Gene list
<b>Up-regulated</b>			
<b>4 h</b>			
direct p53 effectors	7.79E-21	19	<i>BBC3, C12orf5, CDKN1A, DDB2, EPHA2, FAS, FDXR, GADD45A, GDF15, LIF, MDM2, PLK3, PRKAB1, RPS27L, RRM2B, SESN1, TNFRSF10B, TNFRSF10D, TRIAP1</i>
DNA damage response	4.66E-09	9	<i>BBC3, CDKN1A, DDB2, FAS, GADD45A, MDM2, RRM2B, SESN1, TNFRSF10B</i>
<b>24 h</b>			
direct p53 effectors	1.21E-12	12	<i>C12orf5, CDKN1A, FDXR, LIF, MDM2, RPS27L, RRM2B, SESN1, TNFRSF10D, TP53I3, TRIAP1, ZNF385A</i>
DNA damage response	6.82E-03	4	<i>CDKN1A, MDM2, RRM2B, SESN1</i>
<b>Down-regulated</b>			
<b>4 h</b>			
PLK1 signaling events	1.31E-08	5	<i>AURKA, CCNB1, CDC20, KIF20A, PLK1</i>
regulation of mitotic cell cycle	1.37E-05	4	<i>AURKA, CCNB1, CDC20, PLK1</i>

<sup>a</sup> *p* values were corrected for multiple comparisons using the FDR (B&H).

Table 2. Enriched biological processes of DE genes in the RS (4060) cell line 4 and 24 h after 2 Gy irradiation

GO category	Category name	P value <sup>a</sup>	Number of genes	Gene list
<b>Up-regulated</b>				
<b>4 h</b>				
GO:0006915	apoptotic process	5.99E-07	29	<i>AEN, BBC3, BLOC1S2, C12orf5, CD70, CDKN1A, DRAM1, EDA2R, EPHA2, FAS, FHL2, FOSL1, GADD45A, GDF15, GLS2, MDM2, NOTCH1, NTN1, PHLDA3, PLK2, PLK3, PXT1, RPS27L, RRM2B, TNFRSF10B, TNFRSF10D, TNFSF4, TNFSF9, TRIAP1</i>
GO:0006974	cellular response to DNA damage stimulus	1.09E-05	17	<i>AEN, BBC3, C12orf5, CDKN1A, DDB2, E2F7, EPHA2, GADD45A, MDM2, PHLDA3, PLK3, POLH, RPS27L, RRM2B, SESN1, TRIAP1, XPC</i>
GO:0045786	negative regulation of cell cycle	2.47E-04	12	<i>CDKN1A, E2F7, GADD45A, LIF, MDM2, PLK2, PLK3, PRKAB1, RPS27L, SESN1, TRIAP1, XPC</i>
<b>24 h</b>				
GO:0006915	apoptotic process	1.16E-02	15	<i>ARHGEF3, C12orf5, CDKN1A, EDA2R, GLS2, MAP2K6, MDM2, PHLDA3, PXT1, RPS27L, RRM2B, TNFRSF10D, TNFSF4, TRIAP1, ZNF385A</i>
GO:0006974	cellular response to DNA damage stimulus	5.32E-04	12	<i>C12orf5, CDKN1A, E2F7, MAP2K6, MDM2, PHLDA3, RPS27L, RRM2B, SESN1, SPATA18, TRIAP1, ZNF385A</i>
GO:0045786	negative regulation of cell cycle	6.02E-03	8	<i>CDKN1A, E2F7, LIF, MAP2K6, MDM2, RPS27L, SESN1, TRIAP1</i>
<b>Down-regulated</b>				
<b>4 h</b>				
GO:0051301	cell division	1.02E-04	7	<i>AURKA, CCNB1, CCNF, CDC20, KIF20A, PLK1, PSRC1</i>

<sup>a</sup> *p* values were corrected for multiple comparisons using the FDR (B&H).

**Table 3. Pathway analysis of DE genes in the RR (20037) cell line 4 h after 2 Gy irradiation**

Pathway	P value <sup>a</sup>	Number of genes	Gene list
<b>Up-regulated</b>			
<b>4 h</b>			
direct p53 effectors	1.73E-06	7	<i>BBC3, CDKN1A, FDXR, GDF15, LIF, SESN1, ZNF385A</i>
DNA damage response	2.88E-02	3	<i>BBC3, CDKN1A, SESN1</i>

<sup>a</sup> *p* values were corrected for multiple comparisons using the FDR (B&H).

**Table 4. Enriched biological processes of DE genes in the RR (20037) cell line 4 h after 2 Gy irradiation**

GO category	Category name	P value <sup>a</sup>	Number of genes	Gene list
<b>Up-regulated</b>				
<i>4 h</i>				
GO:0042771	intrinsic apoptotic signaling pathway in response to DNA damage by p53 class mediator	1.47E-03	4	<i>BBC3, CDKN1A, PHLDA3, ZNF385A</i>
<b>Down-regulated</b>				
<i>4 h</i>				
GO:1903047	mitotic cell cycle process	4.32E-03	3	<i>CCNB1, GPSM2, NEK2</i>

<sup>a</sup> *p* values were corrected for multiple comparisons using the FDR (B&H).

## DISCUSSION

The tolerance of normal tissue is the limiting factor in the radiation dose applied for cancer treatments<sup>5,30</sup>. For this reason, efforts in this field have been focused on the development of assays that can predict the risk of developing acute normal tissue damage<sup>9,30,31</sup>. Understanding molecular mechanisms underlying radiation sensitivity will enable tailoring treatments to individual patients.

The differences in radiation sensitivity are often associated with a reduced ability to efficiently repair DSBs and/or activate the DNA damage response. For example, patients carrying mutations at *ATM* (Ataxia-Telangiectasia syndrome, A-T) or *BRCA1/2* are characterised by extreme radiosensitivity<sup>32-34</sup>. Variation in radiosensitivity can also be associated with differences in cell cycle regulation and apoptotic pathways<sup>8,35,36</sup>. In this sense, the two cell lines studied here are a good model given their previously reported different response to radiation<sup>29,37,38</sup>.

One of the initial steps in the DNA damage response is the phosphorylation of the histone H2AX. The RS cell line showed significantly higher foci counts and a slower rate of foci disappearance than the RR cell line. This is in agreement with studies on tumour cell lines, where a slower rate of  $\gamma$ -H2AX foci disappearance in RS cell lines has been described, when compared with RR tumour cell lines<sup>19,39</sup>. Moreover, a prolonged presence of  $\gamma$ -H2AX foci in cell lines with defective DSB repair after 3 Gy irradiation has been previously reported<sup>36</sup>.

The analysis of chromosome aberrations is a well established method to assess the damage produced by IR. In the present study, a significantly higher frequency of ICE in the RS cell line was observed in comparison with the RR cell line, indicating that more chromosome breaks failed to be rejoined in the RS cell line. It has been described that *ex vivo* irradiated lymphocytes from clinically



radiosensitive patients showed higher frequencies of exchange-type aberrations and deletions than the non-radiosensitive patients<sup>14</sup>.

Cell death assays have the potential to evaluate individual radiosensitivity<sup>1,40,41</sup>. In our study, a significantly greater reduction in cell viability after irradiation was observed in the RS cell line in comparison with the RR cell line, both at 4 and 24 h post-irradiation. However, the reduction in viability was not very important, being the maximum around 10% in the RS cell line 24 h after irradiation. Although it is believed that a single unrepaired chromosome break could be sufficient for the induction of cell death<sup>34</sup>, it is possible that 2 Gy is a dose insufficient to trigger high levels of apoptosis. In this sense, it has been described that the EBV immortalization can induce the expression of some anti-apoptotic EBV proteins<sup>42</sup>, although other authors have shown important levels of apoptosis after 5 Gy on LCLs<sup>43</sup>.

Regarding gene expression, from the 12,349 genes analysed, less than 100 genes for each analysis were found to be DE. Moreover, a significant enrichment was observed for pathways or biological processes related to the response to IR. This differential gene expression profiles clearly demonstrate the capability of the QuantSeq methodology to discriminate between irradiated and unirradiated samples, but also to determine the changes in gene expression in relation to the time after exposure and the differences in the response between the RS and the RR cell line.

The different number of DE genes between the RS and the RR cell line, 4 and 24 h after irradiation, indicates that the RS cell line was transcriptionally more active than the RR cell line in response to IR. Furthermore, many of the DE genes reported here are related to DNA damage and repair, regulation of cell cycle and apoptosis, processes known to be involved in radiation response<sup>22,23,28,44-48</sup>.

Analysis of differential gene expression profiles at 24 h after irradiation revealed that no genes related to DNA damage response, direct p53 effectors and apoptosis (Fig. 2) were up-regulated in the RR cell line, whereas four, 12 and 15 genes were still DE in the RS cell line. This suggests that the DNA repair machinery could be active for a prolonged time in the RS cell line, in agreement with the prolonged half-life of  $\gamma$ -H2AX foci in this cell line. Moreover, these results are concordant with the data obtained for cell death, where the RS cell line showed higher mortality than the RR cell line.

Other interesting up-regulated genes were those involved in “negative regulation of cell cycle”, a biological process only significantly enriched in the RS cell line 4 and 24 h after irradiation. Cell cycle arrest is an important event in the response to radiation because it provides time for DSB repair, but there are inherent limitations. The G1/S checkpoint is slowly activated, allowing cells to enter S phase in the presence of unrepaired DSBs and other DNA damages<sup>49</sup>. The G2/M checkpoint is specially restrictive for cells with unrejoined chromosome aberrations<sup>50</sup>, but does not completely impede that cells with DSBs reach mitosis, because they can be released before DSB repair is complete<sup>49,51</sup>. Moreover, it has been also described that cell cycle progression takes longer for cells exhibiting slow repair kinetics<sup>51</sup>, although this cannot be always interpreted as a higher efficiency in DNA repair. In this regard, it has been reported that irradiated lymphocytes from *BCRA1* mutated heterozygotes showed a higher G2 delay but also a significantly higher frequency of G2 chromatid aberrations than normal controls, indicating that more damaged cells were able to pass the G2/M transition<sup>52</sup>. According to our results, the RS cell line could not be fully effective in inducing cell cycle arrest 24 h after irradiation, because cells with more ICE than for the RR cell line, could progress to M phase.

The whole results obtained in the present work allow concluding that the two cell lines showed different response to IR, confirmed both by cell-based assays and differential gene expression analysis. The RS cell line may be less efficient in the DNA repair capacity (slow kinetics of foci disappearance and higher frequency of ICE) as well as in the cell-cycle control, in comparison with the RR cell line. These mechanisms together can be responsible for the reduced viability after irradiation observed in the RS cell line when compared with the RR cell line. Gene expression signatures corroborated these results, given the sustained expression of genes related with DNA damage response, negative regulation of cell cycle and apoptosis, which are still necessary up to 24 h after IR in the RS cell line, but not in the RR one.

## **METHODS**

The two cell lines used in the present study were generated by immortalisation of B-lymphocytes by Epstein-Barr-virus (EBV) infection of peripheral blood leukocytes obtained from lung cancer patients. The methods were carried out in "accordance" with approved guidelines and regulations at the Helmholtz Institution Munich and the Federal Office of Radiation Protection, Neuherberg. Informed consent was obtained from all subjects. The study and protocols were approved by the Ethical Committee of the *Bayerische Landesärztekammer*, Nr 99196, on January the 26th in the year 2000. Their radiosensitivity was previously tested<sup>37,38</sup>. According to this, one cell line (4060-200) was defined as RS and the other (20037-200) as RR.

These LCLs were grown in suspension, at 37°C in a 5% CO<sub>2</sub> atmosphere, in Roswell Park Memorial Institute 1640 (RPMI-1640) medium (Biowest, Barcelona, Spain) supplemented with 15% fetal bovine serum (Life Technologies, Madrid,

Spain), L-glutamine 2 mM (Biowest) and penicillin/streptomycin (100 U/mL and 100 µg/mL, respectively) (Biowest).

## **Irradiation**

The LCL cultures were irradiated in exponential growth phase at 1 and 2 Gy to study the kinetics of  $\gamma$ -H2AX foci and at 2 Gy for peptide nucleic acid (PNA) FISH analysis, cell death measurements and RNA-seq. Sham-irradiated control cultures were also used in all analyses. Samples were irradiated with a  $^{137}\text{Cs}$ -irradiator (IBL437C, CIS Biointernational, Gif-sur-Yvette, France), at a dose rate from 4.87 to 4.84 Gy/min due to decay of source.

## **Immunostaining and automated microscopic analysis of $\gamma$ -H2AX foci**

To assess the kinetics of  $\gamma$ -H2AX foci induction and disappearance following IR, cell cultures were maintained at 37°C after irradiation for 10 and 30 min and for 2, 4, 8 and 24 h. After that, cell cultures were incubated on ice until processing. Immunostaining and automated microscopic analysis of  $\gamma$ -H2AX foci were performed as previously described<sup>29</sup>. Two replicas of 400 cells were analysed for each particular experimental condition.

Normality of foci distribution was tested with Kolmogorov-Smirnov with Lilliefors correction. Because compliance with normal distribution was not observed, nonparametric tests were used. Wilcoxon matched-pairs signed rank test was performed to assess if medians of signed ranks of the two replicas of  $\gamma$ -H2AX kinetics were different. Mann-Whitney test was used to compare foci counts.

## **FISH with pancentromeric and pantelomeric PNA probes**

After irradiation, cell lines were cultured at 37°C for 24 h. Colcemid (Gibco, Life Technologies) was added 4 h before harvesting at a final concentration of 0.3 µg/mL. Harvesting was carried out by the standard hypotonic treatment (KCl 0.075 M at 37°C for 5 min) followed by fixation with Carnoy's solution (methanol:glacial acetic acid, 3:1, v/v).

FISH was performed according to a protocol previously described<sup>50</sup>. DAPI in Vectashield Mounting Medium (Vector Laboratories, Barcelona, Spain) was applied as counterstain. Slides were imaged with a Zeiss Axio Imager.Z2 microscope coupled to the Metafer 4 Slide Scanning System v3.10.2 (MetaSystems, Barcelona, Spain). Images were then analysed with the Isis software (MetaSystems).

To determine the percentage of first division mitoses, a parallel culture was carried out with the same conditions but adding bromodeoxyuridine (Sigma-Aldrich Química, Madrid, Spain) at a final concentration of 12 µg/mL following irradiation. The percentage of first division metaphases at 24 h post-irradiation was higher than 95% for both the RS and the RR cell line.

## **FISH scoring criteria**

For the FISH analyses only metaphases containing 46 centromeric signals and 92 telomeric signals were considered. Centromeric signals allowed detecting unequivocally dicentrics, rings and acentric fragments, and furthermore, telomeric signals allowed determining the completeness of each chromosome piece. Chromosomes lacking a telomeric signal at one or both ends were recorded as chr(+/-) or chr(-/-), respectively. The same criterion was applied for dicentric chromosomes [dic(+/-) and dic(-/-)] and acentric fragments [ace(+/-)].

Acentric fragments without telomeric signals were classified as interstitial deletions (ID) and centric ring chromosomes were classified as R. For comparisons, the aberrant chromosome pieces were grouped as CCE [dic(+/+), R and ace(+/+)], those with telomeric signals at both ends, or as ICE [chr(+/-), chr(-/-), dic(+/-), dic(-/-) and ace(+/-)], those without telomeric signals at one or both ends<sup>50</sup>. ID were not included in any category because of the difficulty to distinguish between an acentric fragment or an acentric ring when the ID is very small. One hundred metaphases were analysed for each particular experimental condition.

To compare the frequencies obtained in the FISH study between the RS and the RR cell line, Mann-Whitney test was applied. A z-test was used to compare if the difference between proportions of viable and total cells in the RS and the RR cell line were significant.

### **Cell death assay with Annexin V/PI**

To measure cell death after IR, the Annexin-V-FLUOS Staining Kit (Roche, Barcelona, Spain) was used following the manufacturer's instructions. The cell lines were cultured at 37°C for 4 and 24 h after irradiation. Viable, apoptotic and necrotic (or late apoptotic) cells were scored by eye with an epifluorescence microscope BX51 (Olympus, Barcelona, Spain) using a 50X Plan objective.

Two independent experiments were performed analysing a minimum of 1000 cells for each particular experimental condition. To evaluate the radiation-induced increase of cell death, the obtained values after IR were normalized to those from sham-irradiated cells.

## **RNA extraction**

To study the differential gene expression, irradiated (2 Gy) and sham-irradiated cell cultures of the RS and the RR cell line were incubated at 37°C for 4 and 24 h and 14 days. After that, total RNA extraction was carried out with the SPLIT RNA Extraction kit (Lexogen GmbH, Vienna, Austria) according to the manufacturer's instructions. RNA concentration and purity for each sample were verified with a Nanodrop ND-100 spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). The ratios of absorbance 260/280 nm and 260/230 nm were ~2 for all the samples, and RNA concentration was ~200 ng/μL per sample. RNA integrity was determined with Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). RNA Integrity Number (RIN) values close to 10 were obtained, indicative of high quality RNA samples. Pure RNA samples were stored at -80°C until cDNA libraries were prepared.

## **Library generation and sequencing**

QuantSeq technology has been used as alternative to microarrays and conventional RNA-seq, in order to measure gene expression. cDNA libraries for each sample were generated at Functional Genomics Core (IRB Barcelona, Barcelona, Spain) from 500 ng of total RNA using the Quantseq 3' mRNA-Seq Library Prep kit for Illumina (Lexogen) following the manufacturer's instructions<sup>53</sup>. QuantSeq generates highly strand-specific NGS libraries close to the 3' end of polyadenylated RNA. Briefly, the first cDNA strand is generated through reverse transcription initiated by oligodT priming. The synthesis of the second cDNA strand is performed by random priming, in a manner that DNA polymerase is efficiently stopped when reaching the next hybridised random primer, so only the fragment closest to the 3' end gets extended until the end and gets both adapter sequences necessary for PCR amplification.

During library amplification (12 cycles of PCR), standard external barcodes were ligated to allow for multiplex sequencing. After PCR amplification, the libraries were size-selected with Agencourt AMPure XP magnetic beads (Beckman Coulter, Brea, CA, USA). Libraries were quantified by QuBIT (Life Technologies) and their average size of ~250 bp was determined using a High Sensitivity DNA chip on an Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies).

Libraries were then sequenced (50 bp single read) by the NGS unit of Campus Science Support Facilities GmbH (CSF, Vienna, Austria) using an Illumina HiSeq2500 sequencer. Quality control analyses on the resulting bam sequencing files were performed using FastQC tool (Babraham Bioinformatics, Cambridgeshire, UK).

### **Sequence alignment**

Due to non-specific hybridisation of the random primer used to synthesise the second strand of cDNA, a trimming of the first nucleotides of the reads was performed before sequence alignment in order to improve the percentage of mapped reads (Parameters available in [www.lexogen.com/quantseq-data-analysis](http://www.lexogen.com/quantseq-data-analysis)). Most sequences were originated from the last exon and the 3' untranslated region (UTR). Sequence reads were aligned onto the human genome reference sequence (hg19) using the TopHat2 splice-junction mapper, version 2.1.0<sup>54</sup>.

### **Quantification of reads and differential expression analysis with edgeR**

As QuantSeq generates only one fragment per transcript, length normalization was not required and gene expression quantification was read-count based. Mapped reads were categorised with htseq-count (HTSeq version 0.6.1) directly



linking the number of reads mapped to a gene to its expression<sup>53,55</sup>. Default settings were applied with the exception of the overlap resolution mode, where the intersection-nonempty mode was used, since this mode counts also the reads with incomplete annotation.

The package edgeR version 3.10.2 was used to identify DE genes<sup>56</sup>. Following the procedures described in<sup>57</sup> and in the edgeR documentation (<https://bioconductor.org>), count files from htseq-count were loaded into R and normalised using the default method for edgeR (trimmed mean of M values, or TMM). To consider the multiple factors of our experimental design (two different cell lines, control and irradiated samples, different times of analysis and different replicas), a matrix was designed. Dispersion values were estimated using the Cox-Reid profile-adjusted likelihood method. Then, the generalised linear model likelihood ratio test was used to determine differential expression. Fold-changes were reported as the log (base 2) of normalized count abundance of the irradiated samples divided by count abundance for the sham-irradiated samples. P values reported for each gene were then corrected for multiple comparisons using Benjamini & Hochberg (B&H) false discovery rate (FDR)<sup>58</sup>.

## **Functional analysis**

To identify pathways and biological processes affected in response to IR, gene list enrichment analysis was performed using ToppGene suite (<https://toppgene.cchmc.org>)<sup>59</sup>. The resulting lists (applying a 0.05 FDR cut-off) of up-regulated and down-regulated genes from edgeR were then exported to the ToppFun application of the ToppGene platform.

Other platforms such as DAVID and PANTHER, as well as a Goseq package (version 1.20.0<sup>60</sup>) were used to perform functional analysis and very similar results were obtained (data not shown).

## REFERENCES

1. Barnett, G. C. *et al.* Incorporating Genetic Biomarkers into Predictive Models of Normal Tissue Toxicity. *Clin. Oncol.* **27**, 579–587 (2015).
2. Forker, L. J., Choudhury, A. & Kiltie, A. E. Biomarkers of Tumour Radiosensitivity and Predicting Benefit from Radiotherapy. *Clin. Oncol.* **27**, 561–569 (2015).
3. Turesson, I., Nyman, J., Holmberg, E. & Odén, A. Prognostic factors for acute and late skin reactions in radiotherapy patients. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **36**, 1065–1075 (1996).
4. Andreassen, C. N., Alsner, J. & Overgaard, J. Does variability in normal tissue reactions after radiotherapy have a genetic basis - Where and how to look for it? *Radiother. Oncol.* **64**, 131–140 (2002).
5. Barnett, G. C. *et al.* Normal tissue reactions to radiotherapy: towards tailoring treatment dose by genotype. *Nat. Rev. Cancer* **9**, 134–142 (2009).
6. Burnet, N. G., Johansen, J., Turesson, I., Nyman, J. & Peacock, J. H. Describing patients' normal tissue reactions: Concerning the possibility of individualising radiotherapy dose prescriptions based on potential predictive assays of normal tissue radiosensitivity. *Int. J. Cancer* **79**, 606–613 (1998).
7. Safwat, A., Bentzen, S. M., Turesson, I. & Hendry, J. H. Deterministic rather than stochastic factors explain most of the variation in the expression of skin telangiectasia after radiotherapy. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **52**, 198–204 (2002).
8. Hornhardt, S. *et al.* Genetic factors in individual radiation sensitivity. *DNA Repair* **16**, 54–65 (2014).
9. Chua, M. L. K. & Rothkamm, K. Biomarkers of radiation exposure: Can they predict normal tissue radiosensitivity? *Clin. Oncol.* **25**, 610–616 (2013).
10. Scott, D., Barber, J. B. P., Spreadborough, A. R., Burrill, W. & Roberts, S. A. Increased chromosomal radiosensitivity in breast cancer patients: a comparison of two assays. *Int. J. Radiat. Biol.* **75**, 1–10 (1999).
11. Hoeller, U. *et al.* Individual radiosensitivity measured with lymphocytes may be used to predict the risk of fibrosis after

- radiotherapy for breast cancer. *Radiother. Oncol.* **69**, 137–144 (2003).
12. Borgmann, K. *et al.* Individual Radiosensitivity Measured With Lymphocytes May Predict the Risk of Acute Reaction After Radiotherapy. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **71**, 256–264 (2008).
  13. Beaton, L. a *et al.* Chromosome damage and cell proliferation rates in in vitro irradiated whole blood as markers of late radiation toxicity after radiation therapy to the prostate. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **85**, 1346–1352 (2013).
  14. Chua, M. L. K. *et al.* Residual DNA and chromosomal damage in ex vivo irradiated blood lymphocytes correlated with late normal tissue response to breast radiotherapy. *Radiother. Oncol.* **99**, 362–366 (2011).
  15. Bourton, E. C., Plowman, P. N., Smith, D., Arlett, C. F. & Parris, C. N. Prolonged expression of the gamma-H2AX DNA repair biomarker correlates with excess acute and chronic toxicity from radiotherapy treatment. *Int. J. Cancer* **129**, 2928–2934 (2011).
  16. Terzoudi, G. I. *et al.* Increased G2 chromosomal radiosensitivity in cancer patients: the role of cdk1/cyclin-B activity level in the mechanisms involved. *Int. J. Radiat. Biol.* **76**, 607–615 (2000).
  17. Pantelias, G. E. & Terzoudi, G. I. A standardized G2-assay for the prediction of individual radiosensitivity. *Radiother. Oncol.* **101**, 28–34 (2011).
  18. Rothkamm, K. & Löbrich, M. Evidence for a lack of DNA double-strand break repair in human cells exposed to very low x-ray doses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **100**, 5057–5062 (2003).
  19. Olive, P. L. & Banáth, J. P. Phosphorylation of histone H2AX as a measure of radiosensitivity. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **58**, 331–335 (2004).
  20. Rube, C. E. *et al.* DNA double-strand break repair of blood lymphocytes and normal tissues analysed in a preclinical mouse model: implications for radiosensitivity testing. *Clin. Cancer Res.* **14**, 6546–6555 (2008).
  21. Amundson, S. A. *et al.* Human In vivo Radiation-Induced Biomarkers : Gene Expression Changes in Radiotherapy Patients. *Cancer Res.* **64**, 6368–6371 (2004).
  22. Sprung, C. N., Li, J., Hovan, D., McKay, M. J. & Forrester, H. B.

- Alternative transcript initiation and splicing as a response to DNA damage. *PLoS One* **6**, e25758 (2011).
23. Amundson, S. A. *et al.* Integrating global gene expression and radiation survival parameters across the 60 cell lines of the National Cancer Institute Anticancer Drug Screen. *Cancer Res.* **68**, 415–424 (2008).
  24. Mayer, C. *et al.* A radiation-induced gene expression signature as a tool to predict acute radiotherapy-induced adverse side effects. *Cancer Lett.* **302**, 20–28 (2011).
  25. Greve, B. *et al.* Evaluation of different biomarkers to predict individual radiosensitivity in an inter-laboratory comparison--lessons for future studies. *PLoS One* **7**, e47185 (2012).
  26. Cookson, W., Liang, L., Abecasis, G., Moffatt, M. & Lathrop, M. Mapping complex disease traits with global gene expression. *Nat. Rev. Genet.* **10**, 184–194 (2009).
  27. Ozsolak, F. & Milos, P. M. RNA sequencing: advances, challenges and opportunities. *Nat. Rev. Genet.* **12**, 87–98 (2011).
  28. Zschenker, O. *et al.* Lymphoblastoid cell lines differing in p53 status show clear differences in basal gene expression with minor changes after irradiation. *Radiother. Oncol.* **80**, 236–249 (2006).
  29. Borràs, M., Armengol, G., De Cabo, M., Barquinero, J.-F. & Barrios, L. Comparison of methods to quantify histone H2AX phosphorylation and its usefulness for prediction of radiosensitivity. *Int. J. Radiat. Biol.* **91**, 915–924 (2015).
  30. West, C. M. . M. *et al.* Lymphocyte radiosensitivity is a significant prognostic factor for morbidity in carcinoma of the cervix. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **51**, 10–15 (2001).
  31. Andreassen, C. N. & Alsner, J. Genetic variants and normal tissue toxicity after radiotherapy: A systematic review. *Radiother. Oncol.* **92**, 299–309 (2009).
  32. Taylor, A. *et al.* Ataxia-telangiectasia, a human mutation with abnormal radiation sensitivity. **258**, 427–429 (1975).
  33. Leong, T. *et al.* Mutation analysis of BRCA1 and BRCA2 cancer predisposition genes in radiation hypersensitive cancer patients. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **48**, 959–965 (2000).

34. Jeggo, P. & Lavin, M. F. Cellular radiosensitivity: how much better do we understand it? *Int. J. Radiat. Biol.* **85**, 1061–1081 (2009).
35. Snyder, A. R. & Morgan, W. F. Gene expression profiling after irradiation: Clues to understanding acute and persistent responses? *Cancer Metastasis Rev.* **23**, 259–268 (2004).
36. Goodarzi, A. A. & Jeggo, P. A. Irradiation induced foci (IRIF) as a biomarker for radiosensitivity. *Mutat. Res.* **736**, 39–47 (2012).
37. Guertler, A. *et al.* The WST survival assay: An easy and reliable method to screen radiation-sensitive individuals. *Radiat. Prot. Dosimetry* **143**, 487–490 (2011).
38. Maroschik, B. *et al.* Radiation-induced alterations of histone post-translational modification levels in lymphoblastoid cell lines. *Radiat. Oncol.* **9**, 15 (2014).
39. Taneja, N. *et al.* Histone H2AX phosphorylation as a predictor of radiosensitivity and target for radiotherapy. *J. Biol. Chem.* **279**, 2273–2280 (2004).
40. Shi, Y. Q. *et al.* High levels of delayed radiation-induced apoptosis observed in lymphoblastoid cell lines from ataxia-telangiectasia patients. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys* **49**, 555–559 (2001).
41. Severin, E. *et al.* Evidence for predictive validity of blood assays to evaluate individual radiosensitivity. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **64**, 242–250 (2006).
42. Hardwick, J. M. & Bellows, D. S. Viral versus cellular BCL-2 proteins. *Cell Death Differ.* **10**, S68–S76 (2003).
43. Lin, R., Sun, Y., Li, C., Xie, C. & Wang, S. Identification of Differentially Expressed Genes in Human Lymphoblastoid Cells Exposed to Irradiation and Suppression of Radiation-Induced Apoptosis with Antisense Oligonucleotides against Caspase-4. *Oligonucleotides* **17**, 314–326 (2007).
44. Jen, K. & Cheung, V. G. Transcriptional Response of Lymphoblastoid Cells to Ionizing Radiation. *Genome Res.* **13**, 2092–2100 (2003).
45. Kabacik, S. *et al.* Gene expression following ionising radiation: identification of biomarkers for dose estimation and prediction of individual response. *Int. J. Radiat. Biol.* **87**, 115–129 (2011).

46. Budworth, H. *et al.* DNA Repair and Cell Cycle Biomarkers of Radiation Exposure and Inflammation Stress in Human Blood. *PLoS One* **7**, e48619 (2012).
47. Smirnov, D. A. *et al.* Genetic variation in radiation-induced cell death. *Genome Res.* **22**, 332–339 (2012).
48. Nosel, I., Vaurijoux, A., Barquinero, J. F. & Gruel, G. Characterization of gene expression profiles at low and very low doses of ionizing radiation. *DNA Repair* **12**, 508–517 (2013).
49. Deckbar, D., Jeggo, P. A. & Löbrich, M. Understanding the limitations of radiation-induced cell cycle checkpoints. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **46**, 271–283 (2011).
50. Rodríguez, P. *et al.* Cells bearing chromosome aberrations lacking one telomere are selectively blocked at the G2/M checkpoint. *Mutat. Res. - Fundam. Mol. Mech. Mutagen.* **670**, 53–58 (2009).
51. Löbrich, M. & Jeggo, P. A. The impact of a negligent G2/M checkpoint on genomic instability and cancer induction. *Nat. Rev. Cancer* **7**, 861–870 (2007).
52. Febrer, E. *et al.* Mitotic delay in lymphocytes from BRCA1 heterozygotes unable to reduce the radiation-induced chromosomal damage. *DNA Repair* **7**, 1907–1911 (2008).
53. Moll, P., Ante, M., Seitz, A. & Reda, T. QuantSeq 3' mRNA sequencing for RNA quantification. *Nat. Methods* **11** (2014). Available from: [www.nature.com/nmeth/journal/v11/n12/full/nmeth.f.376.html](http://www.nature.com/nmeth/journal/v11/n12/full/nmeth.f.376.html)
54. Kim, D. *et al.* TopHat2: accurate alignment of transcriptomes in the presence of insertions, deletions and gene fusions. *Genome Biol.* **14**, R36 (2013).
55. Anders, S., Pyl, P. T. & Huber, W. HTSeq - a Python framework to work with high-throughput sequencing data. *Bioinformatics* **31**, 166–169 (2014).
56. Robinson, M. D., McCarthy, D. J. & Smyth, G. K. edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics* **26**, 139–140 (2010).
57. Anders, S. *et al.* Count-based differential expression analysis of RNA sequencing data using R and Bioconductor. *Nat. Protoc.* **8**, 1765–1786 (2013).

58. Benjamini, Y. & Hochberg, Y. Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. *Journal of the Royal Statistical Society Series B* **57**, 289–300 (1995).
59. Chen, J., Bardes, E. E., Aronow, B. J. & Jegga, A. G. ToppGene Suite for gene list enrichment analysis and candidate gene prioritization. *Nucleic Acids Res.* **37**, W305–W311 (2009).
60. Young, M. D., Wakefield, M. J., Smyth, G. K. & Oshlack, A. Gene ontology analysis for RNA-seq: accounting for selection bias. *Genome Biol.* **11**, R14 (2010).

## **ACKNOWLEDGMENTS**

We wish to thank the Functional Genomics Core Facility of IRB Barcelona (Spain), particularly Annie Rodolosse; as well as the NGS unit of the Vienna Biocenter Core Facilities (Austria) for the library preparation and sequencing. We would also want to thank Raquel Egea for data analysis support. This work received financial support from the *Consejo de Seguridad Nuclear*. M.B.F., L.B., G.A. and J.F.B. belong to a consolidated research group of the *Generalitat de Catalunya* (2014 SGR 354). M.B.F. is supported by the *Universitat Autònoma de Barcelona* PhD programme fellowship.

## **AUTHOR CONTRIBUTIONS STATEMENT**

M.B.F., L.B., G.A. and J.F.B. conceived and designed the experiments, M.B.F. conducted the experiments, M.B.F., L.B. and G.A. analysed the results, M.G., S.H. and U.R. contributed reagents/materials/analysis tools. All authors wrote and reviewed the manuscript.

## **ADDITIONAL INFORMATION**

The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript. The authors report no conflicts of

interest. The authors alone are responsible for the content and writing of the paper.

## SUPPLEMENTARY INFORMATION

**Supplementary Table S1. Chromosome analysis by FISH with pancentromeric and pantelomeric probes 24 h after 2 Gy irradiation**

	Cell line	
	4060 (RS)	20037 (RR)
<i>Incomplete chromosome elements</i>		
<i>(ICE)</i>		
chr (+/-)	69	45
chr (-/-)	11	8
ace (+/-)	95	55
dic (+/-)	0	0
dic (-/-)	0	0
<b>Total ICE (frequency ± SE)</b>	<b>175 (1.75 ± 0.22)*</b>	<b>108 (1.08 ± 0.17)</b>
<i>Complete chromosome elements</i>		
<i>(CCE)</i>		
dic (+/+)	30	39
tri (+/+)	2	0
R	1	0
ace (+/+)	33	42
<b>Total CCE (frequency ± SE)</b>	<b>66 (0.66 ± 0.14)</b>	<b>81 (0.81 ± 0.12)</b>
<i>Interstitial deletions (frequency ± SE)</i>		
	14 (0.14 ± 0.04)	7 (0.07 ± 0.03)

\* $p < 0.05$ , significant differences obtained with Mann-Whitney test.



**Supplementary Table S2. Differentially up- and down-regulated genes after 4 and 24 h and 14 days after 2 Gy irradiation**

	Post-irradiation time	DE genes <sup>a</sup>	Up-regulated genes	Down-regulated genes
<b>4060 (RS)</b>	4 h	96	78	18
	24 h	58	53	5
	14 days	0	0	0
<b>20037 (RR)</b>	4 h	36	33	3
	24 h	7	7	0
	14 days	0	0	0

<sup>a</sup>After applying a 0.05 FDR cut-off.

## SUPPLEMENTARY DATASETS

The following datasets are available under request.

**Supplementary Dataset S1. Complete differential expression results for the RS cell line 4 h after 2 Gy irradiation.** Genes are ordered by their FDR values.

**Supplementary Dataset S2. Complete differential expression results for the RR cell line 4 h after 2 Gy irradiation.** Genes are ordered by their FDR values.

**Supplementary Dataset S3. Complete differential expression results for the RS cell line 24 h after 2 Gy irradiation.** Genes are ordered by their FDR values.

**Supplementary Dataset S4. Complete differential expression results for the RR cell line 24 h after 2 Gy irradiation.** Genes are ordered by their FDR values.

**Supplementary Dataset S5. Complete differential expression results for the RS cell line 14 days after 2 Gy irradiation.** Genes are ordered by their FDR values.

**Supplementary Dataset S6. Complete differential expression results for the RR cell line 14 days after 2 Gy irradiation.** Genes are ordered by their FDR values.



---

# 4. DISCUSSIÓ

---



La tolerància del teixit normal és el factor limitant de la dosi aplicada en els tractaments de radioteràpia (Burnet *et al.*, 1996; Barnett *et al.*, 2015). Aquesta tolerància mostra variabilitat entre pacients, sent aproximadament un 5% dels pacients que reben radioteràpia els que mostren toxicitat elevada o efectes secundaris en el teixit normal (Chua i Rothkamm, 2013). Per aquesta raó, s'han dedicat molts esforços en trobar un assaig predictiu d'aquesta toxicitat per poder establir tractaments de càncer individualitzats per a cada tipus de pacient (Burnet *et al.*, 1998; Barnett *et al.*, 2015). Per aconseguir aquest propòsit, és important aprofundir en el coneixement dels mecanismes moleculars que determinen la radiosensibilitat. En aquest estudi s'ha avaluat la resposta a les RI en dues LCLs amb diferent radiosensibilitat.

#### **4.1. Utilització de les LCLs com a model per avaluar la radiosensibilitat in vitro**

L'obtenció de forma repetida de cèl·lules normals d'un mateix individu és una limitació en la recerca biomèdica. En pacients amb radiosensibilitat, aconseguir cèl·lules de forma repetida és encara més difícil a causa de la baixa freqüència que representen aquests individus en la població, de la seva mort o perquè no es realitza el seguiment d'aquests pacients després de la radioteràpia (Strasser *et al.*, 2007; Hussain i Mulherkar, 2012). Per això, bona part de la recerca en aquest camp s'ha realitzat utilitzant LCLs provinents de limfòcits B immortalitzats amb el virus d'Epstein-Barr (Neitzel, 1986). La seva utilització com a substituïts dels limfòcits de sang perifèrica ha accelerat el procés de les investigacions biològiques, ja que representen una font constant de material per a una gran varietat d'assajos, evitant així la necessitat de remostreig (Hussain i Mulherkar, 2012). Les LCLs són relativament fàcils d'obtenir i de mantenir, poden créixer de manera indefinida i s'ha vist que exhibeixen una taxa mínima de mutació

somàtica en cultiu continu (Mohyuddin *et al.*, 2004; Sie *et al.*, 2009). A més, les LCLs tenen una ràtio cost-benefici molt favorable en comparació amb els models animals, degut a que presenten, per exemple, un creixement accelerat i mínims requeriments nutricionals. De fet, s'han utilitzat per avaluar, la inducció de dany en el DNA i la capacitat de reparació, la supervivència cel·lular i l'apoptosi, i també per analitzar els canvis d'expressió gènica després de l'exposició a RI (Jen i Cheung, 2003; Sprung *et al.*, 2005; Zschenker *et al.*, 2006; Lin *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2007; Vasireddy *et al.*, 2010; Guertler *et al.*, 2011; Sprung *et al.*, 2011; Smirnov *et al.*, 2012; Maroschik *et al.*, 2014).

Tanmateix, altres estudis han descrit que l'ús de les LCLs com a substituïts dels limfòcits presenta limitacions. Shi *et al.* (2001) i Greve *et al.* (2009) van descriure que les LCLs no reflectien les mateixes propietats que els corresponents limfòcits primaris en quan a mort cel·lular induïda per radiació. Altres autors van observar diferències en la capacitat de reparació dels DSBs entre LCLs i limfòcits dels mateixos individus (Baeyens *et al.*, 2004; Trenz *et al.*, 2005; Zijno *et al.*, 2010). Strasser *et al.* (2007), Mayer *et al.* (2011) i Greve *et al.* (2012) van mostrar que no existia una clara correlació en la resposta cel·lular després d'irradiar entre LCLs i els limfòcits primaris dels quals provenien. En l'establiment de les LCLs, els limfòcits pateixen una transformació que pot alterar la biologia de la cèl·lula, i a més, l'expressió latent d'algunes proteïnes virals podria també alterar algunes funcions cel·lulars, com la capacitat de patir apoptosi (Cuconati i White, 2002). No obstant, algunes de les diferències observades entre LCLs i limfòcits podrien no ser degudes a la immortalització sinó a canvis metabòlics en els limfòcits quan es cultiven i s'estimulen a proliferar, i a que les condicions fisicoquímiques de la sang són diferents a les del medi de cultiu (Hussain i Mulherkar, 2012). Per últim, cal tenir present que les cèl·lules poden presentar diferent radiosensibilitat en funció de la fase del cicle cel·lular en que es trobin. Les LCLs creixen de

manera asincrònica i per tant hi ha cèl·lules en qualsevol fase del cicle cel·lular, mentre que els limfòcits sense estimular es troben només en la fase G0.

Les dues línies cel·lulars utilitzades en el present treball, una línia RS i una altra RR, van ser cedides per la Oficina Federal de Protecció Radiològica d'Alemanya (BfS) on s'havien caracteritzat prèviament (Guertler *et al.*, 2011; Maroschik *et al.*, 2014). En l'estudi de Guertler *et al.* (2011) es va mesurar la supervivència cel·lular després d'una irradiació a 10 Gy en un total de 120 LCLs procedents de pacients amb càncer de pulmó. Cinc d'aquestes línies (entre elles la línia RS), van exhibir un fenotip radiosensible similar al d'una línia cel·lular ATM deficient, utilitzada com a control de radiosensibilitat. La línia RS va presentar unes taxes de supervivència després de la irradiació a 10 Gy del 40 i del 25% a les 24 i 48 h, respectivament. En canvi, les taxes de supervivència de la línia RR van ser d'un 80% i un 70%, respectivament. En l'estudi de Maroschik *et al.* (2014) es va observar que la línia RS presentava, 24 h després d'una irradiació a 10 Gy, un nombre de *foci* de  $\gamma$ -H2AX residuals major que la línia RR. Degut a que aquestes dues línies van presentar diferent sensibilitat a les RI, es considera que són un bon model per aprofundir en l'estudi de les bases moleculars que poden determinar la diferent resposta front a la radiació.

#### **4.2. Resposta de dues LCLs amb diferent sensibilitat mitjançant assajos cel·lulars i d'expressió gènica després de l'exposició a RI**

A la taula 2 es poden veure resumits els resultats obtinguts amb les dues línies cel·lulars.



Taula 2. Resultats obtinguts per les línies cel·lulars 4060 RS i 20037 RR.

Tècnica	Dosi i temps postirradiació	Resultats
<i>Immunofluorescència (microscòpia)</i>	1 Gy; 2 h	Mitjana de <i>foci</i> de $\gamma$ -H2AX superior en la línia RS
	1 i 2 Gy; 10 min-24 h	Mitjana de <i>foci</i> de $\gamma$ -H2AX superior en la línia RS a gairebé tots els temps postirradiació Taxa de desaparició de <i>foci</i> més lenta en la línia RS
<i>Immunofluorescència (citometria de flux)</i>	1 i 4 Gy; 2 h	Major intensitat d'IF de $\gamma$ -H2AX en la línia RS
<i>PNA FISH</i>	2 Gy; 24 h	Freqüència d'ICE significativament superior en la línia RS
		Freqüència de CCE sense diferències significatives entre les dues línies
<i>Annexina V/PI</i>	2 Gy; 4 i 24 h	Major mort cel·lular en la línia RS
<i>Seqüenciació extrems 3' RNA missatger</i>	2 Gy; 4 h	Expressió diferencial de gens relacionats amb dany en el DNA, regulació del cicle cel·lular i apoptosi en ambdues línies, però el nombre de gens diferencialment expressats va ser superior en la línia RS
	2 Gy; 24 h	Manteniment de l'expressió diferencial de gens relacionats amb dany en el DNA, regulació negativa del cicle cel·lular i apoptosi en la línia RS. La línia RR ja no presentava expressió diferencial en aquestes categories

Les diferències en radiosensibilitat es troben sovint associades amb deficiències en l'activació de la DDR i/o en la reparació dels DSBs (Jeggio i Lavin, 2009). En aquest context, el marcatge de la histona  $\gamma$ -H2AX s'ha proposat com una eina molt útil en la monitorització dels DSBs (Löbrich *et al.*, 2010) ja que existeix una

correlació entre el nombre de DSBs radioinduits i el nombre de *foci* de  $\gamma$ -H2AX (Rothkamm i Löbrich, 2003). Per això, s'ha descrit que la fosforilació d'aquesta histona pot ser un potencial biomarcador de radiosensibilitat (Ivashkevich *et al.*, 2012; Rothkamm *et al.*, 2015).

La metodologia considerada més sensible per a la detecció dels DSBs després d'una irradiació (dosis inferiors a 2 Gy) és el recompte microscòpic de *foci* de  $\gamma$ -H2AX en els nuclis cel·lulars (Sak i Stuschke, 2010). Aquest recompte es pot dur a terme de forma manual, semiautomàtica o automàtica. Com que el recompte manual es considera una alternativa lenta, subjectiva i propensa a error (Ivashkevich *et al.*, 2012), s'han desenvolupat diferents algoritmes computacionals d'anàlisi d'imatges que permeten fer un recompte més ràpid i objectiu d'aquests *foci* (Cai *et al.*, 2009; Vandersickel *et al.*, 2010; Valente *et al.*, 2011; Rasche *et al.*, 2016).

Un dels principals problemes de l'anàlisi microscòpica és el solapament dels *foci*, que pot portar a subestimar el seu nombre real, principalment a dosis  $\geq 1$  Gy (Böcker i Iliakis, 2006; Sak i Stuschke, 2010). Tot i que alguns autors han estat treballant amb algoritmes addicionals per tal de superar aquest problema (Ivashkevich *et al.*, 2011), la citometria de flux s'ha descrit com un mètode complementari que permet mesurar la intensitat d'IF de  $\gamma$ -H2AX en dosis superiors a 2 Gy (Sak i Stuschke, 2010), permetent a més, l'anàlisi d'una gran quantitat de cèl·lules i també saber en quina fase del cicle cel·lular es troben (Huang *et al.*, 2004; Tanaka *et al.*, 2007).

Respecte als estudis publicats fins al moment on es relacionen els *foci* de  $\gamma$ -H2AX i la radiosensibilitat, es poden classificar, a grans trets, en tres categories segons el que s'avalua: 1) la inducció i/o la formació dels *foci*; 2) la ràtio o la taxa de desaparició d'aquests; 3) la presència de *foci* residuals. Estudis amb pacients RS o amb línies cel·lulars procedents d'aquests van reportar majors recomptes de *foci*

30 min postirradiació en comparació amb els controls (Vasireddy *et al.*, 2010; Djuzenova *et al.*, 2013). Altres estudis van observar que el nombre de *foci*/cèl·lula 2 i 2.5 h després de la irradiació era superior tant en una soca de ratolí RS com en línies cel·lulars RS en comparació amb una soca de ratolí RR o línies cel·lulars RR (Taneja *et al.*, 2004; Rube *et al.*, 2008; Vandersickel *et al.*, 2010). A més, Taneja *et al.* (2004) i Rube *et al.* (2008) van observar que aquestes diferències es mantien fins les 24 o 48 h després de la irradiació, respectivament. En base a aquests resultats i el fet que gairebé tots els DSBs es consideren reparats 2 h després de l'exposició a radiació, en el present estudi es va considerar que l'avaluació de la fosforilació de la histona  $\gamma$ -H2AX 2 h postirradiació permetria detectar diferències quant a radiosensibilitat en les dues línies cel·lulars d'estudi, tal i com es va demostrar en la primera part del treball.

Un punt a comentar dels resultats d'aquesta primera part del treball és l'anàlisi de la distribució de *foci* de  $\gamma$ -H2AX per cèl·lula en les quatre metodologies microscòpiques. Els resultats van posar de manifest que la distribució de *foci* no s'ajustava a una distribució de Poisson en 18 de les 20 distribucions estudiades. Tot i que alguns autors han descrit que a baixes dosis (200 mGy i inferiors) la distribució de *foci*/cèl·lula segueix una Poisson (Rothkamm i Löbrich, 2003; Rothkamm *et al.*, 2007), la majoria dels autors que han fet estudis a dosis més altes no mostren la distribució de *foci* i els que la mostren han de fer ajustos a altres distribucions o bé a distribucions de Poisson modificades (Kato *et al.*, 2007; Rube *et al.*, 2008; Martin *et al.*, 2013). En un estudi de Rothkamm *et al.* (2013), on es va irradiar a una dosi alta (2 Gy) i on es feien els recomptes de *foci* de forma automàtica utilitzant el mateix sistema automàtic del present estudi, també es va observar que la distribució de *foci* era sobredispersa. Per tant, tot i que a dosis baixes la distribució de *foci* podria seguir una Poisson, sembla ser que a dosis de  $\geq 1$  Gy les distribucions no s'hi ajustarien.

A partir dels resultats obtinguts en el primer treball es pot concloure que les metodologies emprades per quantificar la fosforilació de la histona H2AX van donar resultats reproduïbles i van permetre distingir dues línies cel·lulars amb diferent radiosensibilitat. En concret, la línia cel·lular RS mostrava amb totes les metodologies recomptes de *foci* més elevats o un major increment d'intensitat d'IF que la línia cel·lular RR després de la irradiació.

El següent pas en l'estudi va ser l'avaluació de la taxa de desaparició dels *foci* de  $\gamma$ -H2AX en les dues línies cel·lulars. Donat que a la primera part de l'estudi ja s'havia validat i posat a punt el sistema automàtic MetaCyte, i que a més era considerablement més ràpid que altres metodologies microscòpiques, en aquesta segona part es va utilitzar únicament aquesta metodologia. La línia RS va mostrar recomptes de *foci* significativament majors que la línia RR en gairebé tots els temps postirradiació analitzats, així com una taxa de desaparició més lenta (calculada com a vida mitjana dels *foci*). Taxes o ràtios de desaparició més lentes ja havien estat descrites en línies RS comparades amb línies RR (MacPhail *et al.*, 2003a; Olive i Banáth, 2004; Taneja *et al.*, 2004; Vasireddy *et al.*, 2010; Goodarzi i Jeggo, 2012), així com en limfòcits de pacients RS en comparació amb pacients RR (van Oorschot *et al.*, 2016). Per això, la taxa de desaparició dels *foci* de  $\gamma$ -H2AX després d'exposició a radiació representa un mètode sensible per monitoritzar la reparació dels DSBs i s'ha proposat com un possible biomarcador de radiosensibilitat.

Aquesta taxa de desaparició més lenta dels *foci* podria relacionar-se amb una menor eficiència de reparació dels DSBs en la línia RS? En el present estudi, utilitzant el marcatge centròmeric i telòmeric per FISH es va mostrar que 24 h després de la irradiació, la freqüència d'ICE era significativament superior en la línia RS, indicant que aquesta presentava més trencaments cromosòmics aparentment no reparats. Löbrich i Jeggo (2007) van descriure que la progressió

del cicle cel·lular era més lenta per aquelles cèl·lules que mostraven una cinètica de reparació lenta; no obstant, un alentiment en el cicle cel·lular no sempre està relacionat amb una major eficiència de reparació del DNA. En aquest sentit, Febrer *et al.* (2008) van descriure que limfòcits irradiats procedents d'heterozigots per mutacions en *BRCA1* mostraven un major retard en la fase G2 del cicle cel·lular, però també una freqüència significativament més gran d'alteracions tipus cromàtide i un nombre significativament major de cèl·lules amb alteracions en comparació amb els respectius controls, indicant que tot i presentar un major alentiment en G2, cèl·lules amb molts danys eren capaces de progressar de G2 a M.

S'ha de tenir present que els *checkpoints per se* presenten limitacions inherents (Deckbar *et al.*, 2011). El *checkpoint G1/S* s'activa lentament després d'una irradiació, el que permet que cèl·lules amb DSBs puguin progressar a S. El *checkpoint G2/M* s'activa més ràpidament però només ho fa per sobre d'uns llindars concrets de DSBs. Així aquest *checkpoint* no impedeix completament la formació de cèl·lules mitòtiques amb DSBs, bé perquè algunes cèl·lules escapen d'aquest bloqueig i bé perquè són alliberades abans que finalitzi la reparació (Löbrich i Jeggo, 2007; Deckbar *et al.*, 2011). A més, s'ha descrit que existeixen diferències en quant a l'eficàcia d'iniciar i mantenir l'aturada del cicle cel·lular entre diferents individus i que això pot relacionar-se amb variacions genètiques front a la resposta a RI (Health Protection Agency, 2013).

Després d'una exposició a RI, quan els danys en el DNA són nombrosos, es poden activar vies apoptòtiques. No obstant, diferències en la inducció d'apoptosi es poden associar amb diferències en radiosensibilitat (Jeggo i Lavin, 2009; Health Protection Agency, 2013). En el nostre estudi, malgrat que la línia RS presentava una major mortalitat després de 2 Gy en comparació amb la línia RR, aquesta no va ser molt pronunciada, atribuint-se a que aquesta dosi podria

no ser suficient per induir de forma massiva processos de mort cel·lular. Estudis previs realitzats per altres autors amb LCLs no van aconseguir detectar mort cel·lular amb l'assaig d'annexina V/PI a dosis fins a 2 Gy (Greve *et al.*, 2009). En canvi, altres autors utilitzant el mateix assaig però amb una dosi de 5 Gy van obtenir nivells importants d'apoptosi (Lin *et al.*, 2007). Tampoc es pot descartar la presència, en aquestes línies immortalitzades, de proteïnes antiapoptòtiques d'origen viral que podrien interferir en aquest procés (Cuconati i White, 2002; Hardwick i Bellows, 2003).

Per tal de determinar si les diferències observades en les dues línies cel·lulars en resposta a RI estaven relacionades amb diferències en la seva resposta transcripcional, es van fer estudis d'expressió gènica diferencial a diferents temps postirradiació. Fins al moment, la majoria d'estudis d'expressió realitzats per cercar biomarcadors d'exposició a RI s'han realitzat amb tècniques de *microarrays*. El desenvolupament més recent de la tecnologia d'RNA-Seq permet una anàlisi més acurada de perfils d'expressió gènica i sembla ser una eina prometedora per a l'estudi de la radiosensibilitat (Young *et al.*, 2014; Tinhofer *et al.*, 2015). En el present estudi s'ha aplicat la metodologia QuantSeq per tal de determinar els perfils d'expressió gènica diferencial en les dues línies cel·lulars d'estudi.

Els resultats obtinguts en el present estudi van revelar un enriquiment en l'expressió de gens implicats principalment en vies o processos biològics relacionats amb resposta al dany en el DNA, regulació negativa del cicle cel·lular i apoptosi. Altres estudis ja havien mostrat que l'exposició a RI modificava l'expressió de gens relacionats amb aquestes vies o processos (Jen i Cheung, 2003; Amundson *et al.*, 2008; Kabacik *et al.*, 2011; Sprung *et al.*, 2011; Budworth *et al.*, 2012; Smirnov *et al.*, 2012). Cal destacar que la metodologia QuantSeq va permetre diferenciar les dues línies cel·lulars en funció dels perfils d'expressió

gènica després de la irradiació. A més, aquesta metodologia és molt acurada ja que en comparació amb els *microarrays* mostra un *background* molt baix, la qual cosa es posa de manifest pel baix nombre de gens diferencialment expressats (< 100 gens per cada línia cel·lular/condició). Això en part és degut a que les seqüències de cDNA poden ser mapejades amb regions úniques del genoma de forma més inequívoca.

En comparació a la línia RR, la línia RS va mostrar una major i prolongada expressió diferencial de gens relacionats amb l'efecte de les RI, tant 4 com 24 h després d'irradiar. Això podria indicar que la línia RS era transcripcionalment més activa que la línia RR en resposta a RI. S'ha descrit que la regulació de l'expressió gènica implica modificacions epigenètiques, com per exemple l'acetilació de les histones, la metilació del DNA i el silenciament gènic via miRNAs (micro RNAs d'interferència). Diversos estudis destaquen la importància d'aquestes modificacions en la regulació de la radiosensibilitat en línies cel·lulars humanes (Chaudhry *et al.*, 2010; Chaudhry i Omaruddin, 2012; Kim *et al.*, 2015; Liu *et al.*, 2015). Seria interessant avaluar aquests mecanismes de regulació epigenètica en futurs estudis.

En relació a l'anàlisi funcional, una important diferència a destacar entre les dues línies cel·lulars va ser que 24 h després d'irradiar, la línia RR no presentava gens diferencialment sobreexpressats relacionats amb resposta al dany en el DNA, efectors de p53 i apoptosi, mentre que la línia RS encara en sobreexpressava. Entre els gens que encara es sobreexpressaven en la línia RS 24 h després d'irradiar, hi havia els gens *RRM2B*, *CDKN1A* i *MDM2*, els quals es coneix que participen en vies o processos biològics relacionats amb resposta al dany en el DNA, efectors de p53 i apoptosi. El gen *RRM2B* té una expressió dependent de p53 i participa en la regulació del cicle cel·lular i en la reparació del DNA (Cho *et al.*, 2014). Altres autors ja havien reportat la seva expressió en

limfòcits i en LCLs després d'exposició a RI (Kabacik *et al.*, 2011; Sprung *et al.*, 2011). L'expressió de *CDKN1A* (proteïna p21) també és p53 dependent i té un paper clau en la regulació negativa del cicle cel·lular, concretament en el bloqueig de la progressió del cicle cel·lular quan hi ha dany en el DNA, tant en G1 com en G2/M (Ando *et al.*, 2001; Taylor i Stark, 2001). Per altra banda, MDM2 és un regulador negatiu de p53 (Meek, 2004). Tot i que alguns autors havien descrit que la inducció de MDM2 pot donar-se hores després que p53 indueixi l'expressió del regulador negatiu de cicle p21, altres van mostrar que la seva inducció pot donar-se simultàniament a la de p21; per tant, sembla que aquesta proteïna té un paper crític en la modulació de la resposta a radiació (Geyer *et al.*, 2000; Perry, 2004).

Entre els gens que encara es sobreexpressaven en la línia RS a les 24 h després de la irradiació, n'hi ha que tenen un paper en la inhibició del cicle cel·lular. Un exemple és el gen *SESN1*, l'expressió del qual és dependent de p53 i s'ha relacionat amb l'exposició a RI (Zschenker *et al.*, 2006; Rashi-Elkeles *et al.*, 2011; Smirnov *et al.*, 2012). També s'ha vist que la proteïna E2F7 exerceix un paper en la repressió del cicle cel·lular via p53 (Carvajal *et al.*, 2012), així com MAP2K6, cinasa que en resposta a estrès pot estar implicada en diversos processos, com l'aturada en la progressió del cicle cel·lular (Wang *et al.*, 2000).

Vint-i-quatre hores després de la irradiació, la línia RS encara presentava una expressió diferencial d'alguns gens relacionats amb apoptosi, com *FDXR*, *PHLDA3* i *TP53I3* (Amundson *et al.*, 2008; Rashi-Elkeles *et al.*, 2011; Budworth *et al.*, 2012). Aquests resultats concorden amb la major mortalitat cel·lular observada en la línia RS en comparació amb la línia RR 24 h després d'irradiar.

Podria ser que l'expressió de gens relacionats amb un possible alentiment i/o una aturada prolongada de la progressió del cicle en la línia RS estigués relacionada amb la inducció d'apoptosi. De fet, Ortolan i Menck (2013) van



observar que després d'irradiar amb llum ultraviolada fibroblasts deficients en la reparació, es produïa un bloqueig en la transició G1/S del cicle cel·lular i una posterior inducció d'apoptosi, tot i l'expressió d'alts nivells de MDM2. Estudis que intenten radiosensibilitzar cèl·lules tumorals han utilitzat diferents estratègies per induir l'aturada del cicle cel·lular en G1 o en G2/M, de manera que això provocava majors nivells d'apoptosi i s'associava amb un increment en la radiosensibilitat cel·lular (Liu *et al.*, 2013; Kriegs *et al.*, 2015). Seong *et al.* (2016) van observar que la combinació de la irradiació amb una substància anomenada cordicepina, coneguda per induir l'aturada del cicle cel·lular en G2, incrementava els nivells de p21, prolongant l'aturada del cicle cel·lular en G2/M i induint apoptosi via p53 en línies cel·lulars de càncer de cèrvix. Aquestes dades concorden amb el que s'ha observat en el present estudi en la línia RS, que ha mostrat una sobreexpressió prolongada de gens relacionats amb l'alentiment i/o bloqueig del cicle cel·lular i amb l'apoptosi.

Per contra, a les 24 h postirradiació la línia RS ja no subexpressava diferencialment gens importants per la mitosi, com *AURKA*, *KIF20A* i *PLK1*, que sí es trobaven subexpressats 4 h després d'irradiar. A més, es va observar la sobreexpressió diferencial de gens que afavoreixen la progressió del cicle cel·lular, com per exemple *MDM2* o *TRIAP1* (repressor de p21) (Andrysik *et al.*, 2013). Això concordaria amb els estudis de FISH, on es va veure que les cèl·lules danyades podien arribar a la fase M.

En conclusió, els resultats obtinguts demostren que les dues línies cel·lulars tenen diferent resposta a les RI, confirmat tant per assajos cel·lulars com per l'anàlisi d'expressió gènica diferencial. La línia RS sembla ser menys eficient en la reparació del DNA, donat que presenta una cinètica de desaparició de *foci* més lenta i una major freqüència d'ICE, en comparació amb la línia RR. Això podria ser la causa d'un alentiment i/o aturada prolongada de la progressió del cicle

cel·lular així com de la menor viabilitat observada en aquesta línia cel·lular després d'irradiar. Els perfils d'expressió gènica corroboren aquests resultats, donada l'expressió sostinguda de gens relacionats amb resposta al dany en el DNA, regulació negativa del cicle cel·lular i apoptosi, els quals encara es troben diferencialment sobreexpressats en la línia RS 24 h postirradiació, però no en la línia RR.

La importància d'aquest estudi radica en la utilització d'assajos cel·lulars combinats amb una metodologia de NGS per avaluar diferències en radiosensibilitat en un model cel·lular. Malgrat tot, els resultats obtinguts s'han de considerar preliminars per la limitació que representa haver treballat amb dues línies cel·lulars. La metodologia emprada i els resultats obtinguts podrien servir com a model per determinar quins factors estan relacionats amb la radiosensibilitat del teixit normal en pacients de càncer.



---

# 5. CONCLUSIONS

---



1. Les metodologies emprades per quantificar la fosforilació de la histona H2AX van donar resultats reproduïbles i van permetre diferenciar dues línies cel·lulars de diferent radiosensibilitat. En concret, 2 h després de la irradiació, la línia RS va mostrar recomptes de *foci* més elevats amb totes les metodologies microscòpiques emprades, així com un major increment de la intensitat d'IF amb citometria de flux en comparació amb la línia RR.
2. La posada a punt del sistema automàtic de captura i recompte MetaCyte va permetre l'utilització d'una eina considerablement més ràpida que les altres metodologies microscòpiques.
3. La línia RS va mostrar recomptes de *foci* de  $\gamma$ -H2AX significativament majors que la línia RR en gairebé tots els temps postirradiació analitzats (fins a 24 h), així com una taxa de desaparició d'aquests més lenta. Així mateix, la freqüència d'ICE va ser significativament superior en la línia RS en comparació amb la línia RR 24 h després de la irradiació, indicant que aquesta presentava més trencaments cromosòmics aparentment no reparats. Aquestes dades indiquen una menor eficiència de la línia RS en la reparació del dany radioinduit en el DNA .
4. La línia RS va mostrar una major mortalitat cel·lular en comparació amb la línia RR després d'irradiar.
5. La metodologia QuantSeq va ser útil i acurada per diferenciar perfils d'expressió gènica de les dues línies cel·lulars després de ser irradiades. Els resultats obtinguts en les dues línies cel·lulars van revelar un enriquiment en l'expressió de gens de vies o processos biològics relacionats amb resposta al dany en el DNA, regulació negativa del

cicle cel·lular i apoptosi.

6. Després d'irradiar, la línia RS va presentar una major i prolongada expressió diferencial de gens, en comparació amb la línia RR. Vint-i-quatre hores després d'irradiar la línia RR no presentava gens diferencialment sobreexpressats relacionats amb resposta al dany en el DNA, efectors de p53 i apoptosi, mentre que la línia RS encara en sobreexpressava.
7. Els resultats obtinguts demostren que les dues línies cel·lulars tenen diferent resposta a les RI, confirmat tant per assajos cel·lulars com per l'anàlisi d'expressió gènica diferencial.

---

## 6. BIBLIOGRAFIA

---





**A**

- Amundson SA, Do KT, Vinikoor LC, Lee RA, Koch-Paiz CA *et al.*, 2008. Integrating Global Gene Expression and Radiation Survival Parameters across the 60 Cell Lines of the National Cancer Institute Anticancer Drug Screen. *Cancer Research*, 68(2), pp.415–424.
- Ando T, Kawabe T, Ohara H, Ducommun B, Itoh M *et al.*, 2001. Involvement of the Interaction between p21 and Proliferating Cell Nuclear Antigen for the Maintenance of G2/M Arrest after DNA Damage. *The Journal of Biological Chemistry*, 276(46), pp.42971–42977.
- Andreassen CN, Alsner J & Overgaard J, 2002. Does variability in normal tissue reactions after radiotherapy have a genetic basis - where and how to look for it? *Radiotherapy and Oncology*, 64(2), pp.131–140.
- Andreassen CN & Alsner J, 2009. Genetic variants and normal tissue toxicity after radiotherapy: A systematic review. *Radiotherapy and Oncology*, 92(3), pp.299–309.
- Andreassen CN, Schack LM, Laursen LV, Alsner J, 2016. Radiogenomics – current status, challenges and future directions. *Cancer Letters*, pp.1–10.
- Andrysik Z, Kim J, Tan AC, Espinosa JM, 2013. A Genetic Screen Identifies TCF3/E2A and TRIAP1 as Pathway-Specific Regulators of the Cellular Response to p53 Activation. *Cell Reports*, 3(5), pp.1346–1354.
- Arlett CF & Harcourt SA, 1980. Survey of Radiosensitivity in a Variety of Human Cell Strains. *Cancer Research*, 40(3), pp.926–932.

**B**

- Baeyens A, Thierens H, Vandebulcke K, De Ridder L, Vral A, 2004. The use of EBV-transformed cell lines of breast cancer patients to measure chromosomal radiosensitivity. *Mutagenesis*, 19(4), pp.285–290.
- Barber JBP, Burrill W, Spreadborough AR, Levine Ed, Warren C *et al.*, 2000a. Relationship between in vitro chromosomal radiosensitivity of peripheral blood lymphocytes and the expression of normal tissue damage following radiotherapy for breast cancer. *Radiotherapy and Oncology*, 55(2), pp.179–186.

- Barber JB, West CM, Kiltie AE, Roberts SA, Scott D, 2000b. Detection of individual differences in radiation-induced apoptosis of peripheral blood lymphocytes in normal individuals, ataxia telangiectasia homozygotes and heterozygotes, and breast cancer patients after radiotherapy. *Radiation Research*, 153, pp.570–578.
- Barnett GC, West CM, Dunning AM, Elliott RM, Coles CE *et al.*, 2009. Normal tissue reactions to radiotherapy: towards tailoring treatment dose by genotype. *Nature Reviews Cancer*, 9(2), pp.134–142.
- Barnett GC, Elliott RM, Alsner J, Andreassen CN, Abdelhay O *et al.*, 2012. Individual patient data meta-analysis shows no association between the SNP rs1800469 in TGFB and late radiotherapy toxicity. *Radiotherapy and Oncology*, 105(3), pp.289–295.
- Barnett GC, Thompson D, Fachal L, Kerns S, Talbot C *et al.*, 2014. A genome wide association study (GWAS) providing evidence of an association between common genetic variants and late radiotherapy toxicity. *Radiotherapy and Oncology*, 111(2), pp.178–185.
- Barnett GC, Kerns SL, Noble DJ, Dunning AM, West CML *et al.*, 2015. Incorporating Genetic Biomarkers into Predictive Models of Normal Tissue Toxicity. *Clinical Oncology*, 27(10), pp.579–587.
- Beaton LA, Ferrarotto C, Marro L, Samiee S, Malone S *et al.*, 2013a. Chromosome Damage and Cell Proliferation Rates in In Vitro Irradiated Whole Blood as Markers of Late Radiation Toxicity After Radiation Therapy to the Prostate. *International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics*, 85(5), pp.1346–1352.
- Beaton LA, Marro L, Samiee S, Malone S, Grimes S *et al.*, 2013b. Investigating chromosome damage using fluorescent in situ hybridization to identify biomarkers of radiosensitivity in prostate cancer patients. *International Journal of Radiation Biology*, 89(12), pp.1087–1093.
- Böcker W & Iliakis G, 2006. Computational Methods for Analysis of Foci: Validation for Radiation-Induced gamma-H2AX Foci in Human Cells. *Radiation Research*, 165(1), pp.113–124.

- Bonner WM, Redon CE, Dickey JS, Nakamura AJ, Sedelnikova OA *et al.*, 2008. Gamma-H2AX and cancer. *Nature Reviews Cancer*, 8(12), pp.957–967.
- Bordón E, Henríquez-Hernández LA, Lara PC, Pinar B, Rodríguez-Gallego C *et al.*, 2011. Role of CD4 and CD8 T-lymphocytes, B-lymphocytes and Natural Killer cells in the prediction of radiation-induced late toxicity in cervical cancer patients. *International Journal of Radiation Biology*, 87(4), pp.424–431.
- Bourton EC, Plowman PN, Smith D, Arlett CF, Parris CN, 2011. Prolonged expression of the gamma-H2AX DNA repair biomarker correlates with excess acute and chronic toxicity from radiotherapy treatment. *International Journal of Cancer*, 129(12), pp.2928–2934.
- Bouwman P & Jonkers J, 2012. The effects of deregulated DNA damage signalling on cancer chemotherapy response and resistance. *Nature Reviews Cancer*, 12(9), pp.587–598.
- Brandsma I & Gent DC, 2012. Pathway choice in DNA double strand break repair: observations of a balancing act. *Genome Integrity*, 3(1), p.9.
- Budworth H, Snijders AM, Marchetti F, Mannion B, Bhatnagar S *et al.*, 2012. DNA Repair and Cell Cycle Biomarkers of Radiation Exposure and Inflammation Stress in Human Blood. *PLoS One*, 7(11), p.e48619.
- Burnet NG, Wurm R, Nyman J, Peacock JH, 1996. Normal Tissue Radiosensitivity - How Important Is It? *Clinical Oncology*, 8(1), pp.25–34.
- Burnet NG, Johansen J, Turesson I, Nyman J, Peacock JH, 1998. Describing patients' normal tissue reactions: Concerning the possibility of individualising radiotherapy dose prescriptions based on potential predictive assays of normal tissue radiosensitivity. *International Journal of Cancer*, 79(6), pp.606–613.

## C

- Cai Z, Vallis KA & Reilly RM, 2009. Computational analysis of the number, area and density of gamma-H2AX foci in breast cancer cells exposed to (111)In-DTPA-hEGF or gamma-rays using Image-J software. *International Journal of Radiation Biology*, 85(3), pp.262–271.

- Cain K, Bratton SB, Langlais C, Walker G, Brown DG *et al.*, 2000. Apaf-1 Oligomerizes into Biologically Active approximately 700-kDa and inactive approximately 1.4-MDa Apoptosome Complexes. *The Journal of Biological Chemistry*, 275(9), pp.6067–6070.
- Carvajal LA, Hamard PJ, Tonnessen C, Manfredi JJ, 2012. E2F7, a novel target, is up-regulated by p53 and mediates DNA damage-dependent transcriptional repression. *Genes & Development*, 26(14), pp.1533–1545.
- Chapman JR, Taylor MRG & Boulton SJ, 2012. Playing the End Game: DNA Double-Strand Break Repair Pathway Choice. *Molecular Cell*, 47(4), pp.497–510.
- Chappell LJ, Whalen MK, Gurai S, Ponomarev A, Cucinotta FA *et al.*, 2010. Analysis of Flow Cytometry DNA Damage Response Protein Activation Kinetics after Exposure to X rays and High-Energy Iron Nuclei. *Radiation Research*, 174(6), pp.691–702.
- Chaudhry MA, Kreger B & Omaruddin RA, 2010. Transcriptional modulation of micro-RNA in human cells differing in radiation sensitivity. *International Journal of Radiation Biology*, 86(7), pp.569–583.
- Chaudhry MA & Omaruddin RA, 2012. Differential DNA Methylation Alterations in Radiation-Sensitive and -Resistant Cells. *DNA and Cell Biology*, 31(6), pp.908–916.
- Cho EC, Kuo ML, Liu X, Yang L, Hsieh YC *et al.*, 2014. Tumor suppressor FOXO3 regulates ribonucleotide reductase subunit RRM2B and impacts on survival of cancer patients. *Oncotarget*, 5(13), pp.4834–4844.
- Chua MLK, Somaiah N, A'Hern R, Davies S, Gothard L *et al.*, 2011. Residual DNA and chromosomal damage in ex vivo irradiated blood lymphocytes correlated with late normal tissue response to breast radiotherapy. *Radiotherapy and Oncology*, 99(3), pp.362–366.
- Chua MLK & Rothkamm K, 2013. Biomarkers of Radiation Exposure: Can They Predict Normal Tissue Radiosensitivity? *Clinical Oncology*, 25(10), pp.610–616.
- Chua MLK, Horn S, Somaiah N, Davies S, Gothard L *et al.*, 2014. DNA double-strand break repair and induction of apoptosis in ex vivo irradiated blood

lymphocytes in relation to late normal tissue reactions following breast radiotherapy. *Radiation and Environmental Biophysics*, 53(2), pp.355–364.

Ciccia A & Elledge SJ, 2010. The DNA Damage Response: Making It Safe to Play with Knives. *Molecular Cell*, 40(2), pp.179–204.

Cuconati A & White E, 2002. Viral homologs of Bcl-2: role of apoptosis in the regulation of virus infection. *Genes & Development*, 16(19), pp.2465–2478.

## D

Deckbar D, Jeggo PA & Löbrich M, 2011. Understanding the limitations of radiation-induced cell cycle checkpoints. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 46(4), pp.271–283.

Di Giorgio M, Sardi, M, Busto E, Vallerga MB, Taja MR *et al.*, 2004. Assessment of Individual Radiosensitivity in Human Lymphocytes using Micronucleus and Microgel Electrophoresis “Comet” Assays. 11th International Congress on the International Radiation Protection Association, pp.53–60.

Dizdaroglu M, Nackerdien Z, Chao BC, Gajewski E, Rao G, 1991. Chemical nature of in vivo DNA base damage in hydrogen peroxide-treated mammalian cells. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 285(2), pp.388–390.

Djuzenova CS, Mühl B, Fehn M, Oppitz U, Müller B *et al.*, 2006. Radiosensitivity in breast cancer assessed by the Comet and micronucleus assays. *British Journal of Cancer*, 94(8), pp.1194–1203.

Djuzenova CS, Elsner I, Katzer A, Worschech E, Distel LV *et al.*, 2013. Radiosensitivity in breast cancer assessed by the histone gamma-H2AX and 53BP1 foci. *Radiation Oncology*, 8, p.98.

Doyle A & Griffiths JB, 1998. *Cell and Tissue Culture: Laboratory Procedures in Biotechnology*. Ed. John Wiley & Sons, Chichester.

Dueva R & Iliakis G, 2013. Alternative pathways of non-homologous end joining (NHEJ) in genomic instability and cancer. *Translational Cancer Research*, 2(3), pp.163–177.

## E

El-Awady RA, Mahmoud M, Saleh EM, El-Baky HA, Lotayef M *et al.*, 2005. No correlation between radiosensitivity or double-strand break repair capacity of normal fibroblasts and acute normal tissue reaction after radiotherapy of breast cancer patients. *International Journal of Radiation Biology*, 81(7), pp.501–508.

## F

Fachal L, Gómez-Caamaño A, Barnett GC, Peleteiro P, Carballo AM *et al.*, 2014. A three-stage genome-wide association study identifies a susceptibility locus for late radiotherapy toxicity at 2q24.1. *Nature Genetics*, 46(8), pp.891–894.

Febrer E, Mestres M, Caballín MR, Barrios L, Ribas M *et al.*, 2008. Mitotic delay in lymphocytes from BRCA1 heterozygotes unable to reduce the radiation-induced chromosomal damage. *DNA Repair*, 7(11), pp.1907–1911.

Fenech M & Morley AA, 1985. Measurement of micronuclei in lymphocytes. *Mutation Research*, 147(1-2), pp.29–36.

Finnon P, Kabacik S, MacKay A, Raffy C, A'Hern R *et al.*, 2012. Correlation of in vitro lymphocyte radiosensitivity and gene expression with late normal tissue reactions following curative radiotherapy for breast cancer. *Radiotherapy and Oncology*, 105(3), pp.329–336.

Forrester HB, Li J, Leong T, McKay MJ, Sprung CN, 2014. Identification of a radiation sensitivity gene expression profile in primary fibroblasts derived from patients who developed radiotherapy-induced fibrosis. *Radiotherapy and Oncology*, 111(2), pp.186–193.

Frush DP & Slovis TL, 2013. Radiation Bioeffects, Risks, and Radiation Protection in Medical Imaging in Children. A: Coley BD, Caffey's Pediatric Diagnostic Imaging. Twelfth Edition, ed. Elsevier Saunders, Philadelphia. Chapter 1, pp.3–11.

---

## G

- Geara FB, Peters LJ, Ang KK, Wike JL, Brock WA, 1993. Prospective comparison of in vitro normal cell radiosensitivity and normal tissue reactions in radiotherapy patients. *International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics*, 27(5), pp.1173–1179.
- Geyer RK, Nagasawa H, Little JB, Maki CG, 2000. Role and Regulation of p53 during an Ultraviolet Radiation-induced G1 Cell Cycle Arrest. *Cell Growth & Differentiation*, 11(3), pp.149–156.
- Girard PM, Foray N, Stumm M, Waugh A, Riballo E *et al.*, 2000. Radiosensitivity in Nijmegen Breakage Syndrome Cells Is Attributable to a Repair Defect and not Cell Cycle Checkpoint Defects. *Cancer Research*, 60(17), pp.4881–4888.
- Goodarzi AA & Jeggo PA, 2012. Irradiation induced foci (IRIF) as a biomarker for radiosensitivity. *Mutation Research*, 736(1-2), pp.39–47.
- Greve B, Dreffke K, Rickinger A, Könemann S, Fritz E *et al.*, 2009. Multicentric investigation of ionising radiation-induced cell death as a predictive parameter of individual radiosensitivity. *Apoptosis*, 14(2), pp.226–235.
- Greve B, Bölling T, Amler S, Rössler U, Gomolka M *et al.*, 2012. Evaluation of Different Biomarkers to Predict Individual Radiosensitivity in an Inter-Laboratory Comparison-Lessons for Future Studies. *PloS One*, 7(10), p.e47185.
- Guertler A, Kraemer A, Roessler U, Hornhardt S, Kulka U *et al.*, 2011. The WST survival assay: An easy and reliable method to screen radiation-sensitive individuals. *Radiation Protection Dosimetry*, 143(2-4), pp.487–490.

## H

- Hall EJ & Giaccia AJ, 2006. *Radiobiology for the Radiologist*. Sixth Edition, ed. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia.
- Hall JS, Iype R, Senra J, Taylor J, Armenoult L *et al.*, 2014. Investigation of Radiosensitivity Gene Signatures in Cancer Cell Lines. *PloS One*, 9(1), p.e86329.



- Hardwick JM & Bellows DS, 2003. Viral versus cellular BCL-2 proteins. *Cell Death & Differentiation*, 10(Suppl 1), pp.S68–S76.
- Health Protection Agency, 2013. Human Radiosensitivity: report of the Independent Advisory Group on Ionising Radiation. Disponible des de: [https://www.gov.uk/government/uploads/system/uploads/attachment\\_data/file/333058/RCE21\\_v2\\_for\\_website.pdf](https://www.gov.uk/government/uploads/system/uploads/attachment_data/file/333058/RCE21_v2_for_website.pdf).
- Henríquez Hernández LA, Lara PC, Pinar B, Bordón E, Rodríguez Gallego C *et al.*, 2009. Constitutive gene expression profile segregates toxicity in locally advanced breast cancer patients treated with high-dose hyperfractionated radical radiotherapy. *Radiation Oncology*, 4, p.17.
- Hoeller U, Borgmann K, Bonacker M, Kuhlmeier A, Bajrovic A *et al.*, 2003. Individual radiosensitivity measured with lymphocytes may be used to predict the risk of fibrosis after radiotherapy for breast cancer. *Radiotherapy and Oncology*, 69(2), pp.137–144.
- Hornhardt S, Rößler U, Sauter W, Rosenberger A, Illig T *et al.*, 2014. Genetic factors in individual radiation sensitivity. *DNA Repair*, 16, pp.54–65.
- Huang X, Okafuji M, Traganos F, Luther E, Holden E *et al.*, 2004. Assessment of Histone H2AX Phosphorylation Induced by DNA Topoisomerase I and II Inhibitors Topotecan and Mitoxantrone and by the DNA Cross-Linking Agent Cisplatin. *Cytometry Part A*, 58(2), pp.99–110.
- Huertas P, 2010. DNA resection in eukaryotes: deciding how to fix the break. *Nature Structural & Molecular Biology*, 17(1), pp.11–16.
- Hussain T & Mulherkar R, 2012. Lymphoblastoid Cell lines: a Continuous in Vitro Source of Cells to Study Carcinogen Sensitivity and DNA Repair. *International Journal of Molecular and Cellular Medicine*, 1(2), pp.75–87.

## I

- International Atomic Energy Agency (IAEA), 2011. Cytogenetic dosimetry: applications in preparedness for and response to radiation emergencies. Vienna.

Ivashkevich AN, Martin OA, Smith AJ, Redon CE, Bonner WM *et al.*, 2011. Gamma-H2AX foci as a measure of DNA damage: A computational approach to automatic analysis. *Mutation Research*, 711(1-2), pp.49–60.

Ivashkevich AN, Redon CE, Nakamura AJ, Martin RF, Martin OA, 2012. Use of the gamma-H2AX assay to monitor DNA damage and repair in translational cancer research. *Cancer Letters*, 327(1-2), pp.123–133.

## J

Jeggo P & Lavin MF, 2009. Cellular radiosensitivity: How much better do we understand it? *International Journal of Radiation Biology*, 85(12), pp.1061–1081.

Jen KY & Cheung VG, 2003. Transcriptional Response of Lymphoblastoid Cells to Ionizing Radiation. *Genome Research*, 13(9), pp.2092–2100.

## K

Kabacik S, Mackay A, Tamber N, Manning G, Finnon P *et al.*, 2011. Gene expression following ionising radiation: Identification of biomarkers for dose estimation and prediction of individual response. *International Journal of Radiation Biology*, 87(2), pp.115–129.

Kato TA, Wilson PF, Nagasawa H, Fitzek MM, Weil MM *et al.*, 2007. A defect in DNA double strand break processing in cells from unaffected parents of retinoblastoma patients and other apparently normal humans. *DNA Repair*, 6(6), pp.818–829.

Kiltie AE, Orton CJ, Ryan AJ, Roberts SA, Marples B *et al.*, 1997. A correlation between residual DNA double-strand breaks and clonogenic measurements of radiosensitivity in fibroblasts from preradiotherapy cervix cancer patients. *International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics*, 39(5), pp.1137–1144.

Kim JS, Kim SY, Lee M, Kim SH, Kim SM *et al.*, 2015. Radioresistance in a human laryngeal squamous cell carcinoma cell line is associated with DNA methylation changes and topoisomerase II  $\alpha$ . *Cancer Biology & Therapy*, 16(4), pp.1–9.

Kriegs M, Gurtner K, Can Y, Brammer I, Rieckmann T *et al.*, 2015. Radiosensitization of NSCLC cells by EGFR inhibition is the result of an enhanced p53-dependent G1 arrest. *Radiotherapy and Oncology*, 115(1), pp.120–127.

## L

Lansdorp PM, Verwoerd NP, van de Rijke FM, Dragowska V, Little MT *et al.*, 1996. Heterogeneity in telomere length of human chromosomes. *Human Molecular Genetics*, 5(5), pp.685–691.

Lehnert S, 2008. Biomolecular Action of Ionizing Radiation. Ed. Taylor & Francis Group, New York.

Li X & Heyer WD, 2008. Homologous recombination in DNA repair and DNA damage tolerance. *Cell Research*, 18(1), pp.99–113.

Lieber MR, 2010. The Mechanism of Double-Strand DNA Break Repair by the Nonhomologous DNA End-Joining Pathway. *Annual Review of Biochemistry*, 79, pp.181–211.

Lin R, Sun Y, Li C, Xie C, Wang S, 2007. Identification of Differentially Expressed Genes in Human Lymphoblastoid Cells Exposed to Irradiation and Suppression of Radiation-Induced Apoptosis with Antisense Oligonucleotides against Caspase-4. *Oligonucleotides*, 17(3), pp.314–326.

Little JB, Nove J, Strong LC, Nichols WW, 1988. Survival of human diploid skin fibroblasts from normal individuals after X-irradiation. *International Journal of Radiation Biology*, 54(6), pp.899–910.

Liu X, Sun C, Jin X, Li P, Ye F *et al.*, 2013. Genistein Enhances the Radiosensitivity of Breast Cancer Cells via G2/M Cell Cycle Arrest and Apoptosis. *Molecules*, 18(11), pp.13200–13217.

Liu S, Pan X, Yang Q, Wen L, Jiang Y *et al.*, 2015. MicroRNA-18a enhances the radiosensitivity of cervical cancer cells by promoting radiation-induced apoptosis. *Oncology Reports*, 33(6), pp.2853–2862.

Löbrich M & Jeggo PA, 2007. The impact of a negligent G2/M checkpoint on genomic instability and cancer induction. *Nature Reviews Cancer*, 7(11), pp.861–869.

Löbrich M, Shibata A, Beucher A, Fisher A, Ensminger M *et al.*, 2010. Gamma-H2AX foci analysis for monitoring DNA double-strand break repair. *Cell Cycle*, 9(4), pp.662–669.

## M

MacPhail SH, Banáth JP, Yu Y, Chu E, Lambur H *et al.*, 2003a. Expression of phosphorylated histone H2AX in cultured cell lines following exposure to X-rays. *International Journal of Radiation Biology*, 79(5), pp.351–358.

MacPhail SH, Banáth JP, Yu Y, Chu E, Olive PL, 2003b. Cell Cycle-Dependent Expression of Phosphorylated Histone H2AX: Reduced Expression in Unirradiated but not X-Irradiated G1-Phase Cells. *Radiation Research*, 159(6), pp.759–767.

Mahaney BL, Meek K & Lees-miller SP, 2009. Repair of ionizing radiation-induced DNA double-strand breaks by non-homologous end-joining. *Biochemical Journal*, 417(3), pp.639–650.

Maier P, Hartmann L, Wenz F, Herskind C, 2016. Cellular Pathways in Response to Ionizing Radiation and Their Targetability for Tumor Radiosensitization. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(1), p.102.

Manolio TA, 2010. Genomewide Association Studies and Assessment of the Risk of Disease. *The New England Journal of Medicine*, 363(2), pp.166–176.

Maroschik B, Gürtler A, Krämer A, Rößler U, Gomolka M *et al.*, 2014. Radiation-induced alterations of histone post-translational modification levels in lymphoblastoid cell lines. *Radiation Oncology*, 9, p.15.

Martin OA, Ivashkevich A, Choo S, Woodbine L, Jeggo PA *et al.*, 2013. Statistical analysis of kinetics, distribution and co-localisation of DNA repair foci in irradiated cells: cell cycle effect and implications for prediction of radiosensitivity. *DNA Repair*, 12(10), pp.844–855.

Mayer C, Popanda O, Greve B, Fritz E, Illig T *et al.*, 2011. A radiation-induced gene expression signature as a tool to predict acute radiotherapy-induced adverse side effects. *Cancer Letters*, 302(1), pp.20–28.

Meek DW, 2004. The p53 response to DNA damage. *DNA Repair*, 3(8-9), pp.1049–1056.

Mohyuddin A, Ayub Q, Siddiqi S, Carvalho-Silva DR, Mazhar K *et al.*, 2004. Genetic instability in EBV-transformed lymphoblastoid cell lines. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1670(1), pp.81–83.

Moll P, Ante M, Seitz A, Reda T, 2014. QuantSeq 3' mRNA sequencing for RNA quantification. *Nature Methods*, 11, p.25. Disponible des de: <http://www.nature.com/nmeth/journal/v11/n12/full/nmeth.f.376.html>.

## N

Nachtrab U, Oppitz U, Flentje M, Stopper H, 1998. Radiation-induced micronucleus formation in human skin fibroblasts of patients showing severe and normal tissue damage after radiotherapy. *International Journal of Radiation Biology*, 73(3), pp.279–287.

Natarajan AT, 1984. Origin and significance of chromosomal alterations. A: Obe G, Mutations in Man. Ed. Springer-Verlag, Berlín. pp.156–176.

Neitzel H, 1986. A routine method for the establishment of permanent growing lymphoblastoid cell lines. *Human Genetics*, 73(4), pp.320–326.

## O

Olive PL & Banáth JP, 2004. Phosphorylation of histone H2AX as a measure of radiosensitivity. *International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics*, 58(2), pp.331–335.

Ortolan TG & Menck CFM, 2013. UVB-Induced Cell Death Signaling Is Associated with G1-S Progression and Transcription Inhibition in Primary Human Fibroblasts. *PLoS One*, 8(10), p.e76936.

Ozsahin M, Crompton NE, Gourgou S, Kramar A, Li L *et al.*, 2005. CD4 and CD8 T-lymphocyte Apoptosis Can Predict Radiation-Induced Late Toxicity: A Prospective Study in 399 patients. *Clinical Cancer Research*, 11(20), pp.7426–7433.

Ozsolak F & Milos PM, 2011. RNA sequencing: advances, challenges and opportunities. *Nature Reviews Genetics*, 12(2), pp.87–98.

**P**

- Pajic J, Rakic B, Rovcanin B, Jovicic D, Novakovic I *et al.*, 2015. Inter-individual variability in the response of human peripheral blood lymphocytes to ionizing radiation: comparison of the dicentric and micronucleus assays. *Radiation and Environmental Biophysics*, 54(3), pp.317–325.
- Pantelias GE & Terzoudi GI, 2011. A standardized G2-assay for the prediction of individual radiosensitivity. *Radiotherapy and Oncology*, 101(1), pp.28–34.
- Peacock J, Ashton A, Bliss J, Bush C, Eady J *et al.*, 2000. Cellular radiosensitivity and complication risk after curative radiotherapy. *Radiotherapy and Oncology*, 55(2), pp.173–178.
- Perry ME, 2004. Mdm2 in the Response to Radiation. *Molecular Cancer Research*, 2(1), pp.9–19.
- Pinkawa M, Brzozowska K, Kriehuber R, Eble MJ, Schmitz S, 2016. Prediction of radiation-induced toxicity by in vitro radiosensitivity of lymphocytes in prostate cancer patients. *Future Oncology*, 12(5), pp.617–624.
- Price BD & D'Andrea AD, 2013. Chromatin Remodeling at DNA Double-Strand Breaks. *Cell*, 152(6), pp.1344–1354.

**R**

- Rasche L, Heiserich L, Behrens JR, Lenz K, Pfuhl C *et al.*, 2016. Analysis of Lymphocytic DNA Damage in Early Multiple Sclerosis by Automated Gamma-H2AX and 53BP1 Foci Detection: A Case Control Study. *PloS One*, 11(1), p.e0147968.
- Rashi-Elkeles S, Elkon R, Shavit S, Lerenthal Y, Linhart C *et al.*, 2011. Transcriptional modulation induced by ionizing radiation: p53 remains a central player. *Molecular Oncology*, 5(4), pp.336–348.
- Rodríguez P, Barquinero JF, Duran A, Caballín MR, Ribas M *et al.*, 2009. Cells bearing chromosome aberrations lacking one telomere are selectively blocked at the G2/M checkpoint. *Mutation Research*, 670(1-2), pp.53–58.

- Rogakou EP, Pilch DR, Orr AH, Ivanova VS, Bonner WM, 1998. DNA Double-stranded Breaks Induce Histone H2AX Phosphorylation on Serine 139. *The Journal of Biological Chemistry*, 273(10), pp.5858–5868.
- Rogakou EP, Boon C, Redon C, Bonner WM, 1999. Megabase Chromatin Domains Involved in DNA Double-Strand Breaks In Vivo. *The Journal of Cell Biology*, 146(5), pp.905–915.
- Rogakou EP, Nieves-Neira W, Boon C, Pommier Y, Bonner WM, 2000. Initiation of DNA Fragmentation during Apoptosis Induces Phosphorylation of H2AX Histone at Serine 139. *The Journal of Biological Chemistry*, 275(13), pp.9390–9395.
- Rothkamm K & Löbrich M, 2003. Evidence for a lack of DNA double-strand break repair in human cells exposed to very low X-ray doses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America (PNAS)*, 100(9), pp.5057–5062.
- Rothkamm K, Balroop S, Shekhdar J, Fernie P, Goh V, 2007. Leukocyte DNA Damage after Multi-Detector Row CT: A Quantitative Biomarker of Low-Level Radiation Exposure. *Radiology*, 242(1), pp.244–251.
- Rothkamm K & Horn S, 2009. Gamma-H2AX as protein biomarker for radiation exposure. *Annali dell'Istituto Superiore di Sanità*, 45(3), pp.265–271.
- Rothkamm K, Barnard S, Ainsbury EA, Al-Hafidh J, Barquinero JF *et al.*, 2013. Manual versus automated gamma-H2AX foci analysis across five European laboratories: Can this assay be used for rapid biodosimetry in a large scale radiation accident? *Mutation Research*, 756(1-2), pp.170–173.
- Rothkamm K, Barnard S, Moquet J, Ellender M, Rana Z *et al.*, 2015. DNA Damage Foci: Meaning and Significance. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 56(6), pp.491–504.
- Rübe CE, Grudzenski S, Kühne M, Dong X, Rief N *et al.*, 2008. DNA Double-Strand Break Repair of Blood Lymphocytes and Normal Tissues Analysed in a Preclinical Mouse Model: Implications for Radiosensitivity Testing. *Clinical Cancer Research*, 14(20), pp.6546–6555.

Rzeszowska-Wolny J, Przybyszewski WM & Widel M, 2009. Ionizing radiation-induced bystander effects, potential targets for modulation of radiotherapy. *European Journal of Pharmacology*, 625(1-3), pp.156–164.

## S

Safwat A, Bentzen SM, Turesson I, Hendry JH, 2002. Deterministic rather than stochastic factors explain most of the variation in the expression of skin telangiectasia after radiotherapy. *International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics*, 52(1), pp.198–204.

Sak A & Stuschke M, 2010. Use of gamma-H2AX and Other Biomarkers of Double-Strand Breaks During Radiotherapy. *Seminars in Radiation Oncology*, 20(4), pp.223–231.

Sanford KK, Parshad R, Gantt R, Tarone RE, Jones GM *et al.*, 1989. Factors affecting and significance of G2 chromatin radiosensitivity in predisposition to cancer. *International Journal of Radiation Biology*, 55(6), pp.963–981.

Savage JRK & Simpson P, 1994. On the scoring of FISH-“painted” chromosome-type exchange aberrations. *Mutation Research*, 307(1), pp.345–353.

Scaife JE, Barnett GC, Noble DJ, Jena R, Thomas SJ *et al.*, 2015. Exploiting biological and physical determinants of radiotherapy toxicity to individualize treatment. *The British Journal of Radiology*, 88(1051), p.20150172.

Schmid TE, Zlobinskaya O & Multhoff G, 2012. Differences in Phosphorylated Histone H2AX Foci Formation and Removal of Cells Exposed to Low and High Linear Energy Transfer Radiation. *Current Genomics*, 13(6), pp.418–425.

Scott D, Barber JBP, Levine EL, Burrill W, Roberts SA, 1998. Radiation-induced micronucleus induction in lymphocytes identifies a high frequency of radiosensitive cases among breast cancer patients: a test for predisposition? *British Journal of Cancer*, 77(4), pp.614–620.

Seong DB, Hong S, Muthusami S, Kim WD, Yu JR *et al.*, 2016. Cordycepin increases radiosensitivity in cervical cancer cells by overriding or prolonging radiation-induced G2/M arrest. *European Journal of Pharmacology*, 771, pp.77–83.



- Shi YQ, Li L, Sanal O, Tezcan I, Emery GC *et al.*, 2001. High levels of delayed radiation-induced apoptosis observed in lymphoblastoid cell lines from ataxia-telangiectasia patients. *International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics*, 49(2), pp.555–559.
- Sie L, Loong S & Tan EK, 2009. Utility of lymphoblastoid cell lines. *Journal of Neuroscience Research*, 87(9), pp.1953–1959.
- Slonina D, Klimek M, Szpytma T, Gasinska A, 2000. Comparison of the radiosensitivity of normal-tissue cells with normal-tissue reactions after radiotherapy. *International Journal of Radiation Biology*, 76(9), pp.1255–1264.
- Smirnov DA, Brady L, Halasa K, Morley M, Solomon S *et al.*, 2012. Genetic variation in radiation-induced cell death. *Genome Research*, 22(2), pp.332–339.
- Solier S & Pommier Y, 2009. The apoptotic ring: A novel entity with phosphorylated histones H2AX and H2B and activated DNA damage response kinases. *Cell Cycle*, 8(12), pp.1853–1859.
- Solier S & Pommier Y, 2014. The nuclear gamma-H2AX apoptotic ring: implications for cancers and autoimmune diseases. *Cellular and Molecular Life Sciences (CMLS)*, 71(12), pp.2289–2297.
- Sprung CN, Chao M, Leong T, McKay MJ, 2005. Chromosomal Radiosensitivity in Two Cell Lineages Derived from Clinically Radiosensitive Cancer Patients. *Clinical Cancer Research*, 11(17), pp.6352–6358.
- Sprung CN, Li J, Hovan D, McKay MJ, Forrester HB, 2011. Alternative Transcript Initiation and Splicing as a Response to DNA Damage. *PLoS One*, 6(10), p.e25758.
- Srivastava M & Raghavan SC, 2015. DNA Double-Strand Break Repair Inhibitors as Cancer Therapeutics. *Chemistry & Biology*, 22(1), pp.17–29.
- Strasser H, Grabenbauer GG, Sprung CN, Sauer R, Distel LV, 2007. DNA Double-Strand Break Induction and Repair in Irradiated Lymphoblastoid, Fibroblast Cell Lines and White Blood Cells from ATM, NBS and Radiosensitive Patients. *Strahlentherapie und Onkologie*, 183(8), pp.447–453.

Sulli G, Di Micco R & d'Adda di Fagagna F, 2012. Crosstalk between chromatin state and DNA damage response in cellular senescence and cancer. *Nature Reviews Cancer*, 12(10), pp.709–720.

Svensson JP, Stalpers LJ, Esveldt-van Lange RE, Franken NA, Haveman J *et al.*, 2006. Analysis of Gene Expression Using Gene Sets Discriminates Cancer Patients with and without Late Radiation Toxicity. *PLoS Medicine*, 3(10), p.e422.

## T

Tanaka T, Huang X, Halicka HD, Zhao H, Traganos F *et al.*, 2007. Cytometry of ATM activation and Histone H2AX Phosphorylation to Estimate Extent of DNA Damage Induced by Exogenous Agents. *Cytometry Part A*, 71(9), pp.648–661.

Taneja N, Davis M, Choy JS, Beckett MA, Singh R *et al.*, 2004. Histone H2AX Phosphorylation as a predictor of Radiosensitivity and Target for Radiotherapy. *The Journal of Biological Chemistry*, 279(3), pp.2273–2280.

Tarazona S, García-Alcalde F, Dopazo J, Ferrer A, Conesa A, 2011. Differential expression in RNA-seq: A matter of depth. *Genome Research*, 21(12), pp.2213–2223.

Taylor A, Harnden DG, Arlett CF, Harcourt SA, Lehmann AR *et al.*, 1975. Ataxia telangiectasia: a human mutation with abnormal radiation sensitivity. *Nature*, 258(5534), pp.427–429.

Taylor WR & Stark GR, 2001. Regulation of the G2/M transition by p53. *Oncogene*, 20(15), pp.1803–1815.

Teoule R & Cadet J, 1978. Radiation-induced degradation of the base component in DNA and related substances-final products. *Molecular Biology, Biochemistry and Biophysics*, 27, pp.171–203.

Tinhofer I, Niehr F, Konschak R, Liebs S, Munz M *et al.*, 2015. Next-generation sequencing: hype and hope for development of personalized radiation therapy? *Radiation Oncology*, 10, p.183.

Trenz K, Schütz P & Speit G, 2005. Radiosensitivity of lymphoblastoid cell lines with a heterozygous BRCA1 mutation is not detected by the comet assay and pulsed field gel electrophoresis. *Mutagenesis*, 20(2), pp.131–137.

Tubiana M, Dutreix J & Wambersie A, 1990. Introduction to Radiobiology. Ed. Taylor & Francis, Londres, Nova York, Philadelphia.

Turesson I, Nyman J, Holmberg E, Odén A, 1996. Prognostic factors for acute and late skin reactions in radiotherapy patients. *International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics*, 36(5), pp.1065–1075.

## V

Valente M, Voisin P, Laloï P, Roy L, Roch-Lefèvre S, 2011. Automated gamma-H2AX focus scoring method for human lymphocytes after ionizing radiation exposure. *Radiation Measurements*, 46(9), pp.871–876.

Vandersickel V, Depuydt J, Van Bockstaele B, Perletti G, Philippe J *et al.*, 2010. Early Increase of Radiation-induced Gamma-H2AX Foci in a Human Ku70/80 Knockdown Cell Line Characterized by an Enhanced Radiosensitivity. *Journal of Radiation Research*, 51(6), pp.633–641.

van Engeland M, Nieland LJ, Ramaekers FC, Schutte B, Reutelingsperger CP, 1998. Annexin V-affinity assay: a review on an apoptosis detection system based on phosphatidylserine exposure. *Cytometry*, 31(1), pp.1–9.

van Oorschot B, Hovingh S, Dekker A, Stalpers LJ, Franken NA, 2016. Predicting Radiosensitivity with Gamma-H2AX Foci Assay after Single High-Dose-Rate and Pulsed Dose-Rate Ionizing Irradiation. *Radiation Research*, 185(2), pp.190–198.

Vasireddy RS, Sprung CN, Cempaka NL, Chao M, McKay MJ, 2010. H2AX phosphorylation screen of cells from radiosensitive cancer patients reveals a novel DNA double-strand break repair cellular phenotype. *British Journal of Cancer*, 102(10), pp.1511–1518.

## W

- Wang X, McGowan CH, Zhao M, He L, Downey JS *et al.*, 2000. Involvement of the MKK6-p38gamma Cascade in Gamma-Radiation-Induced Cell Cycle Arrest. *Molecular and Cellular Biology*, 20(13), pp.4543–4552.
- Wang Z, Gerstein M & Snyder M, 2009. RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. *Nature Reviews Genetics*, 10(1), pp.57–63.
- Waselenko JK, MacVittie TJ, Blakely WF, Pesik N, Wiley AL *et al.*, 2004. Medical Management of the Acute Radiation Syndrome: Recommendations of the Strategic National Stockpile Radiation Working Group. *Annals of Internal Medicine*, 140(12), pp.1037–1051.
- Weemaes CM, Hustinx TW, Scheres JM, van Munster PJ, Bakkeren JA *et al.*, 1981. A new chromosomal instability disorder: the Nijmegen breakage syndrome. *Acta Paediatrica Scandinavica*, 70(4), pp.557–564.
- Werbrouck J, Duprez F, De Neve W, Thierens H, 2011. Lack of a correlation between gamma-H2AX foci kinetics in lymphocytes and the severity of acute normal tissue reactions during IMRT treatment for head and neck cancer. *International Journal of Radiation Biology*, 87(1), pp.46–56.
- West CM, Elyan SA, Berry P, Cowan R, Scott D, 1995. A comparison of the radiosensitivity of lymphocytes from normal donors, cancer patients, individuals with ataxia-telangiectasia (A-T) and A-T heterozygotes. *International Journal of Radiation Biology*, 68(2), pp.197–203.
- West AG & van Attikum H, 2006. Chromatin at the crossroads. Meeting on signalling to chromatin epigenetics. *EMBO Reports*, 7(12), pp.1206–1210.
- West C, Rosenstein BS, Alsner J, Azria D, Barnett G *et al.*, 2010. Establishment of a Radiogenomics Consortium. *International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics*, 76(5), pp.1295–1296.
- Widel M, Jedrus S, Lukaszczyk B, Raczek-Zwierzycka K, Swierniak A, 2003. Radiation-Induced Micronucleus Frequency in Peripheral Blood Lymphocytes is Correlated with Normal Tissue Damage in Patients with Cervical Carcinoma Undergoing Radiotherapy. *Radiation Research*, 159(6), pp.713–721.

Woods WG, Byrne TD & Kim TH, 1988. Sensitivity of Cultured Cells to Gamma Radiation in a Patient Exhibiting Marked in Vivo Radiation Sensitivity. *Cancer*, 62(11), pp.2341–2345.

## Y

Yang HJ, Kim N, Seong KM, Youn H, Youn B, 2013. Investigation of Radiation-induced Transcriptome Profile of Radioresistant Non-small Cell Lung Cancer A549 Cells Using RNA-seq. *PLoS One*, 8(3), p.e59319.

Young A, Berry R, Holloway AF, Blackburn NB, Dickinson JL *et al.*, 2014. RNA-seq profiling of a radiation resistant and radiation sensitive prostate cancer cell line highlights opposing regulation of DNA repair and targets for radiosensitization. *BMC Cancer*, 14, p.808.

## Z

Zhang JH & Xu M, 2000. DNA fragmentation in apoptosis. *Cell Research*, 10(3), pp.205–211.

Zhang Y, Lim CU, Zhou J, Liber HH, 2007. The effects of NBS1 knockdown by small interfering RNA on the ionizing radiation-induced apoptosis in human lymphoblastoid cells with different p53 status. *Toxicology Letters*, 171(1-2), pp.50–59.

Zijno A, Porcedda P, Saini F, Allione A, Garofalo B *et al.*, 2010. Unsuitability of lymphoblastoid cell lines as surrogate of cryopreserved isolated lymphocytes for the analysis of DNA double-strand break repair activity. *Mutation Research*, 684(1-2), pp.98–105.

Zschenker O, Borgmann K, Streichert T, Meier I, Wrona A *et al.*, 2006. Lymphoblastoid cell lines differing in p53 status show clear differences in basal gene expression with minor changes after irradiation. *Radiotherapy and Oncology*, 80(2), pp.236–249.



