

Universitat Autònoma de Barcelona  
Tesi Doctoral

Efecte de les mamografies  
sobre les cèl·lules epitelials  
mamàries humanes



Laia Hernández García





Universitat Autònoma de Barcelona

# **Efecte de les mamografies sobre les cèl·lules epitelials mamàries humanes**

Memòria presentada per:

**Laia Hernández Garcia**

Per optar al grau de:  
**Doctora en Biologia Cel·lular**

Tesi sota la direcció de:

**Dra. Anna Genescà Garrigosa**  
**Dra. Laura Tusell Padrós**

al Departament de Biologia Cel·lular,  
Fisiologia Animal i Immunologia  
Facultat de Biociències  
Universitat Autònoma de Barcelona

Laia Hernández Garcia

Dra. Anna Genescà Garrigosa

Dra Laura Tusell Padrós

Universitat Autònoma de Barcelona  
Cerdanyola del Vallès



# Índex

## INTRODUCCIÓ

<b>1. Efectes de la radiació ionitzant.....</b>	<b>3</b>
<b>2. Resposta al dany al DNA: DDR (DNA Damage Response).....</b>	<b>5</b>
2.1 Detecció del DSB i amplificació del senyal.....	6
2.2 Control del cicle cel·lular.....	8
El punt de control G1/S.....	9
El punt de control G2/M.....	11
La sensibilitat dels diferents punts de control del cicle.....	11
2.3 Vies de reparació del DSB.....	12
Les vies de reparació NHEJ i MMEJ.....	14
La via de reparació HR.....	15
L'elecció de la via de reparació.....	16
2.4 Senescència i Apoptosi.....	18
Senescència.....	18
Apoptosi.....	19
Què determina que les cèl·lules facin apoptosi o senescència?.....	20
<b>3. DDR i radiosensibilitat.....</b>	<b>21</b>
3.1 Concepte de radiosensibilitat.....	21
3.2 Avaluació del dany en el DNA i la resposta de la cèl·lula.....	23
Avaluació del dany a nivell cromosòmic.....	23
Seguiment de les proteïnes de la DDR mitjançant tècniques d'immunodetecció.....	25
<b>4. Exposició a baixes dosis de radiació.....</b>	<b>28</b>
<b>5. L'edat com a factor modulador de la sensibilitat a la radiació.....</b>	<b>32</b>
5.1 Diversos estudis epidemiològics mostren un increment de la radiosensibilitat amb l'edat en la població adulta.....	33
5.2 Bases de la biologia dels telòmers i la telomerasa.....	35
Senescència replicativa i edat.....	38
<b>6. Mamografies i radioprotecció.....</b>	<b>40</b>
6.1 Qualitat de la radiació emesa pel mamògraf.....	41
6.2 Característiques del cultiu de les cèl·lules epitelials mamàries humanes.....	43

## RESULTATS

1. Treball 1: *“Increased Mammogram-Induced DNA Damage in Mammary Epithelial Cells Aged In Vitro”* ..... 51
2. Treball 2: *“Highly Sensitive Automated Method for DNA Damage Assessment: Gamma-H2AX Foci Counting and Cell Cycle Sorting”* ..... 61

## ANNEX DE RESULTATS

1. Estudi de les diferències en la resposta al dany entre donants d'edats diferents DDR i radiosensibilitat..... 81
2. Treball 3: *“Aging and radiation sensitivity: different games, same players.”* ..... 89

## DISCUSSIÓ GENERAL

1. Baixes dosis de radiació.....115
2. Alentiment de la resposta al dany en el DNA en les cèl·lules envellides *in vitro*.....117
3. Descartant la contribució de la disfunció telomèrica en l'alentiment de la DDR de les cèl·lules envellides.....119
4. Mesurant les diferències interindividuals de radiosensibilitat causades per l'edat.....121
5. Possibles causes de l'alentiment de la DDR amb l'envelliment i qüestions per resoldre.....122

CONCLUSIONS.....129

BIBLIOGRAFIA.....133



# Introducció

*“If you can’t explain it simply,  
you don’t understand it well  
enough.”*

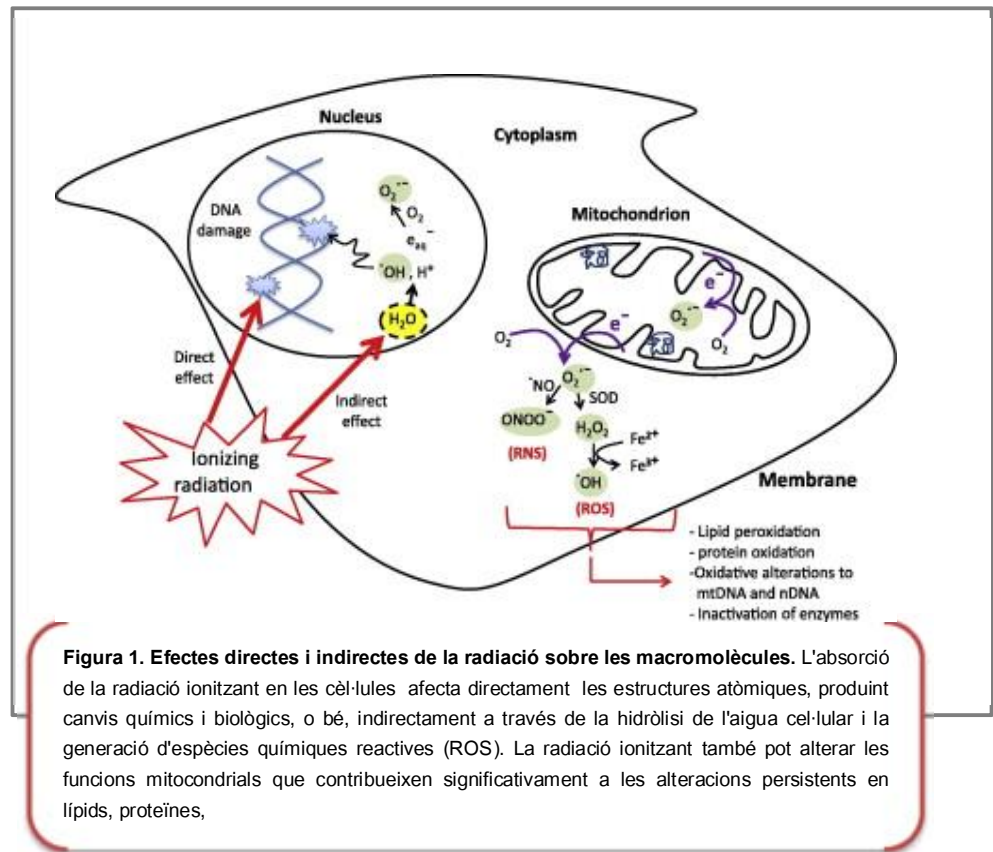
*Albert Einstein*





## 1. Efectes de la radiació ionitzant

La **radiació ionitzant** (RI) està formada per fotons o partícules que quan interactuen amb la matèria tenen prou energia per induir ionitzacions en els àtoms que la componen. Trobem dos tipus de radiació ionitzant, les ones electromagnètiques (fotons), desproveïdes de massa i càrrega, com els raigs X i  $\gamma$ , i les radiacions corpusculars (partícules) que tenen massa i, algunes, càrrega, com les partícules  $\alpha$ , els neutrons i les radiacions  $\beta$ . El dany a les biomolècules pot ser induït de manera directa o indirecta (**Figura 1**). Diem que l'acció transcorre de manera **directa** quan la radiació ionitzant provoca el trencament o la modificació en alguns dels seus enllaços. Per altra banda, l'acció és **indirecta** quan la radiació interacciona amb alguna molècula del medi, generalment d'aigua, provocant la formació de **radicals lliures**, essent aquests els que interaccionaran amb les biomolècules provocant-hi lesions.



Donat que en la cèl·lula hi ha més aigua que qualsevol altre component, la probabilitat que les radiacions actuïn de manera indirecta és major que de manera directa. Així doncs, la hidròlisi de l'aigua ( $H_2O$ ), deguda a la radiació absorbida, produeix una parella de ions ( $H_2O^+ + e^-$ ).

L'electró alliberat és capturat per una altra molècula d'aigua formant un nou ió ( $\text{H}_2\text{O}^\cdot$ ). Aquests dos ions ( $\text{H}_2\text{O}^\cdot$  i  $\text{H}_2\text{O}^+$ ) són força inestables i tendeixen a dissociar-se formant una parella de ions ( $\text{H}^+$  i  $\text{OH}^\cdot$ ) inofensius per la cèl·lula, i dos radicals lliures ( $\text{OH}^\cdot$  i  $\text{H}^\cdot$ ) extremadament reactius i nocius. La unió de dos radicals lliures dóna lloc a la formació d'una substància tòxica, com el peròxid d'hidrogen ( $\text{OH}^\cdot + \text{OH}^\cdot \rightarrow \text{H}_2\text{O}_2$ ). Aquests radicals lliures també poden reaccionar amb altres macromolècules biològiques; un radical lliure  $\text{H}^\cdot$  pot reaccionar amb una molècula biològica ( $\text{RH}$ ) alliberant hidrogen i un altre radical lliure ( $\text{RH} + \text{H}^\cdot \rightarrow \text{R}^\cdot + \text{H}_2$ ). El conjunt d'aquestes molècules formades per radicals lliures amb una alta capacitat oxidativa se'ls coneix com *Reactive Oxygen Species* (ROS). Les ROS també poden tenir un origen de tipus endogen fruit de la respiració oxidativa que té lloc en els mitocondris. Així doncs, sigui de manera directa o indirecta les radiacions poden tenir diversos efectes a nivell cel·lular en funció de quina molècula sigui afectada. Les molècules afectades amb major rellevància són els lípids, les proteïnes i el DNA.

La peroxidació dels lípids és un dels primers efectes que pateixen les cèl·lules després de la irradiació. Entenem com a peroxidació lipídica la formació de radicals de lípids, un reordenament dels enllaços insaturats en els lípids que comporta l'eventual destrucció dels lípids de membrana, produint una varietat de productes de degradació, incloent alcohols, cetones, aldehids, alcans i èters. La conseqüència més directa de la peroxidació dels lípids és un canvi en la fluïdesa de la membrana. Les proteïnes també queden greument danyades degut als radicals reactius o a la ionització directa. A conseqüència d'aquest dany pot tenir lloc una pèrdua de l'activitat enzimàtica i la formació d'agregats proteics que, en cas d'afectar proteïnes estructurals, n'alterarien l'arquitectura cel·lular i la funció. Però de fet, la molècula que quan és afectada té una major repercussió en la cèl·lula és la de DNA. Els principals efectes biològics observats després de l'exposició a radiació provenen del dany provocat en aquest àcid nucleic.

Quan la radiació ionitzant afecta el DNA, es poden generar diferents tipus de lesions: **(a)** trencaments de cadena senzilla de DNA o SSBs (*single strand breaks*), **(b)** trencaments de doble

cadena en el DNA o DSBs (*double strand breaks*), (c) unions creuades de cadenes de DNA (*DNA crosslinks*) i finalment, (d) danys de base o BD (*base damage*). La proporció de cada tipus de lesió variarà en funció del tipus de radiació ionitzant (raig  $\gamma$  i X, partícules  $\alpha$  i  $\beta$  i neutrons) i el valor de transferència lineal d'energia o LET (*linear energy transfer*) d'aquesta. Les radiacions de baixa LET, com els raigs X i els raigs  $\gamma$ , dipositen poca densitat d'energia al llarg de la seva trajectòria, induint majoritàriament, danys de base i SSBs. En canvi, les radiacions d'alta LET, com les partícules  $\alpha$  i  $\beta$  o els neutrons, produeixen molts esdeveniments ionitzants al llarg de la seva trajectòria i, tot i que ho fan de manera lineal, generen cúmuls o clústers d'energia dipositada, induint l'aparició d'un major nombre de DSBs. La complexitat del dany causat per les radiacions d'alta energia i la dificultat de reparar-lo, fan que la seva efectivitat biològica relativa o RBE (*Relative Biological Effectiveness*) sigui major. Es postula que les diferències en la RBE entre els diferents tipus de radiació rau en el nombre i la distribució de DSBs radio-induïts (Franken et al., 2011). Aquest no és un fet gens sorprenent, ja que els trencaments de cadena doble són considerats el tipus de lesió més perillosa que pot patir el DNA. Els DSBs són potencialment letals ja que suposen la disrupció simultània de les dues cadenes de DNA, causant sovint una pèrdua d'informació genètica. De fet, un sol trencament de cadena doble és capaç de provocar la mort de la cèl·lula o l'inici d'un procés carcinogènic si no és reparat o és reparat de manera equívoca (Mills, Ferguson, & Alt, 2003). Per tant, és important que la cèl·lula tingui un bon sistema antioxidant i la capacitat de reparar les lesions induïdes de manera correcta i eficient.

## **2. Resposta al dany al DNA: DDR (DNA Damage Response)**

El DNA està constantment sota l'atac d'agents endògens i de tipus ambiental. Donada la importància de la seva conservació, les cèl·lules han desenvolupat mecanismes de defensa per combatre aquestes amenaces. Aquests mecanismes permeten detectar el dany en el DNA, en senyalitzen la seva presència i el reparen de manera coordinada (Jackson & Bartek, 2010). El conjunt de vies que formen aquest sistema s'anomenen de resposta al dany en el DNA o DDR (*DNA damage response*). Quan en una cèl·lula es detecta una lesió, per facilitar el procés de

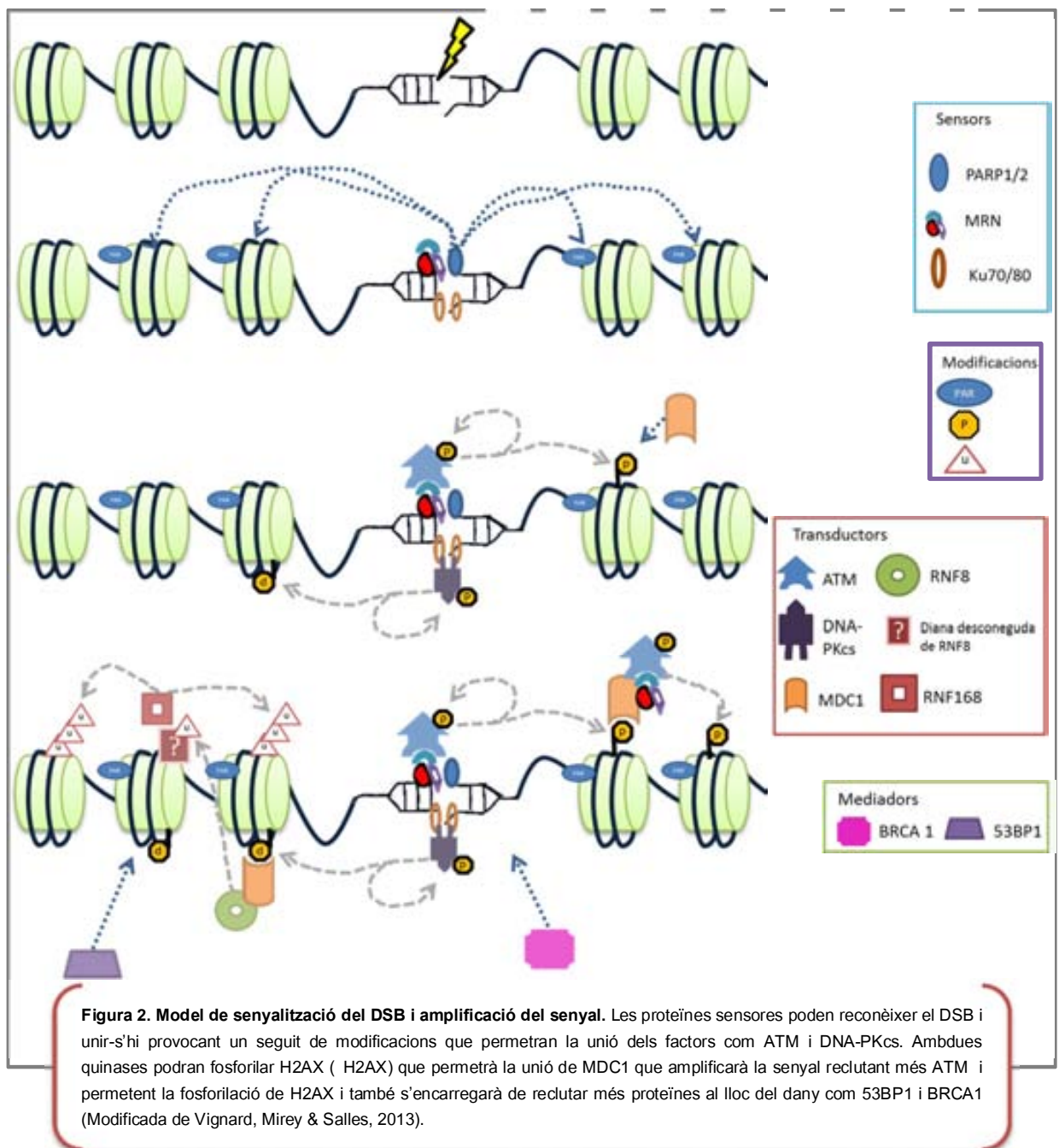
reparació del DNA, el cicle cel·lular queda aturat i s'indueixen programes transcripcionals específics per activar la DDR. Els trencaments de cadena doble poden ser reparats mitjançant dues vies: la via de reparació homòloga (**HR**, de l'anglès *Homologous Recombination*), la via de reparació no homòloga o de reunió no homòloga d'extremes (**NHEJ**, de l'anglès *Non Homologous End Joining*). Una vegada han actuat aquestes vies de reparació, la cèl·lula pot reprendre la proliferació si la lesió ha estat reparada o, en cas contrari, pot evitar tornar a entrar en el cicle cel·lular. Aquesta última opció comportarà la inducció de senescència o de la mort cel·lular per apoptosi. Quan les vies de reparació del DNA no funcionen correctament, el dany no reparat es pot convertir en una font d'inestabilitat genòmica que pot desembocar en la transformació maligna de la cèl·lula.

## 2.1 Detecció del DSB i amplificació del senyal

Els DSBs són les lesions radio-induïdes més perilloses, per això la seva detecció i posterior reparació són essencials per a la supervivència de la cèl·lula. Algunes de les proteïnes de la DDR són responsables de detectar el DSB i amplificar el senyal del dany per generar una resposta efectiva i poder reparar la lesió. Les proteïnes capaces de detectar el DSB s'anomenen **sensors** del dany. Entre aquestes proteïnes trobem **PARP1** (poly(ADP-ribose), que s'uneix al DSB i s'encarrega de modificar la cromatina que l'envolta afegint dominis PAR. Procés anomenat de parilació, que és una modificació proteica de curta durada, que contribueix a la reorganització de la cromatina i al reclutament de més complexes de reparació. El complex **MRN** format per les proteïnes **MRE11** (*Meiotic Recombination 11*), **RAD50** (*Receptor AssociateD protein 50*) i **NBS1** (*Nijmegen Breakage Syndrome 1*) i l'heterodímer **Ku70/80** (**Ku**) també interaccionen de manera directa amb el DSB. Les proteïnes quinases **ATM** (*Ataxia Telangiectasia Mutated*) i **DNA-PKcs** (*DNA-dependent Protein Kinase, catalytic subunit*) pertanyents a la família de les PIKKs (*Phosphatidylinositol 3 Kinase-related Kinases*) són reclutades al lloc del dany mitjançant MRN i Ku respectivament. L'autofosforilació d'ambdues quinases les condueix a l'activació i a la subsegüent fosforilació de la histona H2AX que, un cop fosforilada a la serina 139, s'anomena  $\gamma$ **H2AX**. El canvi

conformacional de la histona H2AX, una vegada fosforilada, facilita la unió de MDC1 (*Mediator of DNA Damage Checkpoint 1*) al DSB. MDC1, factor transductor del senyal, s'encarregarà de reclutar més MRN i per tant, més ATM, que continuarà fosforilant H2AX al llarg de 1-2 megabases al voltant de la lesió, formant una plataforma que permetrà el posterior reclutament de proteïnes implicades en la senyalització, el control del cicle i la reparació del DNA.

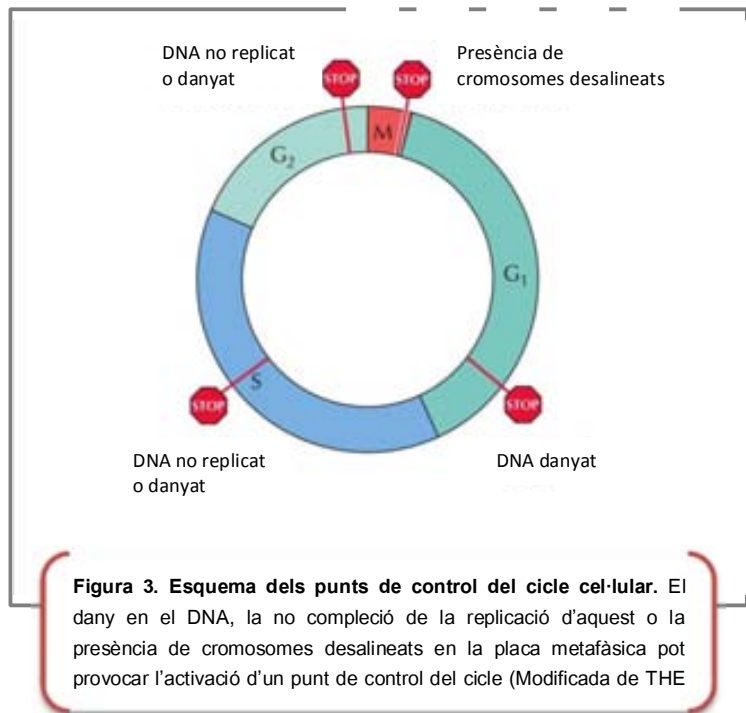
L'acumulació de les proteïnes en el lloc de trencament dóna lloc a la formació de foci visibles



al microscopi després de la detecció del marcatge fluorescent de les proteïnes que els formen. A aquests foci se'ls anomena **IRIF** (*Ionizing Radiation Induced Foci*). El reclutament de proteïnes transductores com **53BP1** (*p53 Binding Protein 1*) i **BRCA1** (*Breast Cancer 1*) en els IRIF, impulsat per  $\gamma$ H2AX i la unió de MDC1, també depèn de la participació de les E3-ubiquitin lligases RNF8 i RNF168 (**Figura 2**). **RNF8** (*Ring Finger Protein 8*), unida a MDC1, permet la ubiquitinització de les histones del subtipus H2A mitjançant RNF168 fet que permet la unió de 53BP1 en el lloc del dany (M. Huen, Grant, Manke, Minn, & Yu, 2007; Kolas, Chapman, & Nakada, 2007; Mailand et al., 2007; Zimmermann & de Lange, 2013). De fet, un knockdown de RNF8 inhibeix l'arribada de 53BP1 i BRCA1 al DSB (M. S. Y. Huen, Sy, & Chen, 2010; Mailand et al., 2007). Tota aquesta senyalització i el reclutament de diverses proteïnes en el lloc del dany condueix a la fosforilació d'una sèrie de substrats que activaran els punts de control del cicle cel·lular, induït així l'aturada temporal del cicle per donar a la cèl·lula temps per la reparació.

## 2.2 Control del cicle cel·lular

La resposta al dany al DNA inclou els processos de reparació del dany com els que permeten aquesta reparació, com l'aturada del cicle cel·lular. Per a que tingui lloc la reparació cal una aturada del cicle cel·lular. El cicle cel·lular consta de quatre fases: la **fase G1**, la fase de replicació o **fase S**, la **fase G2** i la **fase de mitosi** o **M**. Les transicions d'una fase a una altra són regulades per les ciclines i les quinases dependents de ciclines o



**Cdks** (de l'anglès *Cyclin-dependent kinases*). La concentració de les diferents ciclines presenta

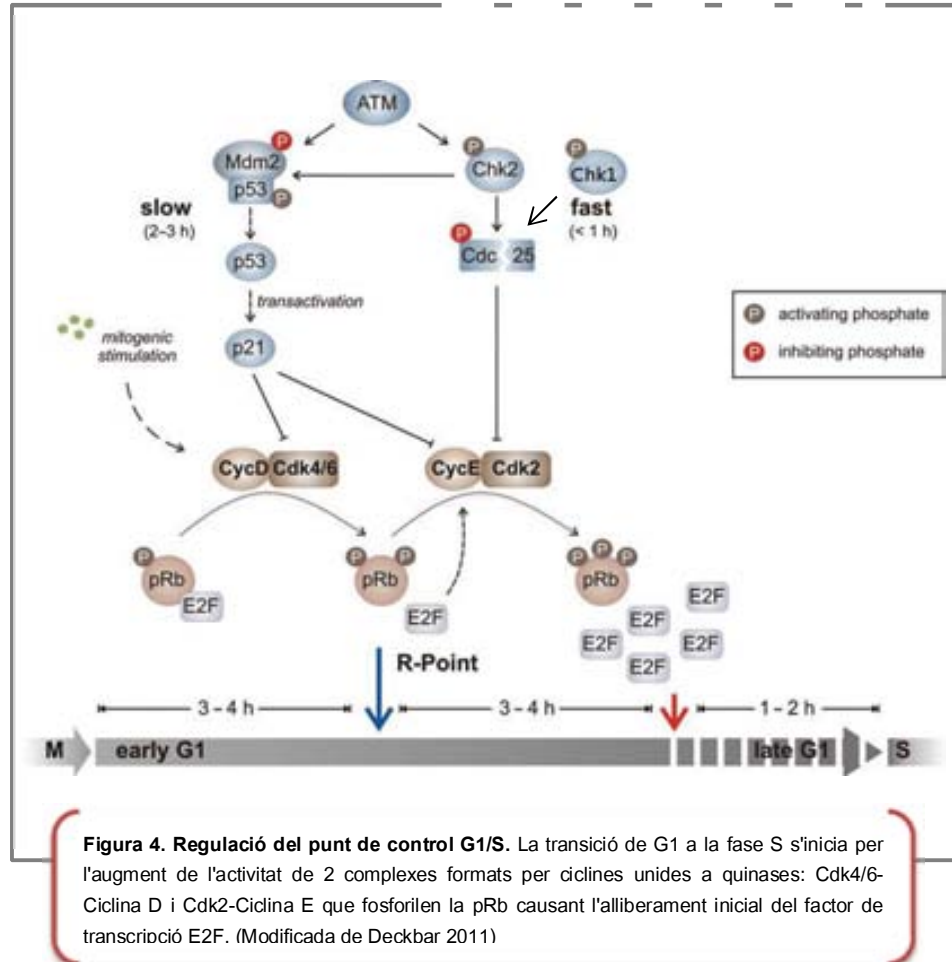
importants variacions al llarg del cicle cel·lular en resposta a diversos factors. Les ciclines exerceixen una funció reguladora en la transició de les diferents fases del cicle cel·lular mitjançant la unió i l'activació de les diferents Cdks, les quals tenen la capacitat de fosforilar un ampli conjunt de substrats. Quan hi ha lesions en el DNA, és essencial que aquestes es reparin abans que la cèl·lula repliqui o segregui el seu material genètic per tal d'evitar que les lesions es fixin com a mutacions permanents en les cèl·lules filles. Per això les cèl·lules han acabat desenvolupant sistemes capaços de regular la progressió del cicle cel·lular en presència de dany en el DNA. Després de la inducció d'una lesió en el DNA, en particular de la formació d'un DSB, la cèl·lula deixa de progressar pel cicle per donar temps a que tingui lloc la reparació d'aquest. Les mateixes proteïnes de la DDR, com ara ATM, s'encarreguen provocar l'aturada del cicle cel·lular. La inducció d'aquesta aturada té lloc en 3 punts del cicle que han estat anomenats punts de control o *checkpoints* (**Figura 3**). El balanç entre l'activació i la inactivació de les CDKs determinarà si les cèl·lules avancen de G1 a S (punt de control G1/S), iniciant així la síntesi del DNA, o si avancen de G2 a M, permetent la mitosi. El tercer punt de control, anomenat intra-S, té lloc en la mateixa fase S i s'encarrega d'aturar la replicació en presència de DSBs. Aquest punt de control té dos components que inclouen la inhibició de les forquetes de replicació que estan actives i la inhibició de l'activació de noves forquetes. A continuació s'explicarà amb més detall el funcionament dels punts de control G1/S i G2/M, que són els més ben estudiats pel què fa a la seva inducció quan hi ha dany en el DNA.

### *El punt de control G1/S*

La progressió de la cèl·lula de G1 a S es duu a terme mitjançant 2 complexos formats per ciclines unides a quinases: Cdk4/6-Ciclina D i Cdk2-Ciclina E. Concretament, l'entrada en la fase S té lloc gràcies a la fosforilació de Rb per part de Cdk4/6-Ciclina D i Cdk2-Ciclina E de manera seqüencial. Aquesta fosforilació provoca l'alliberament de E2F, que és un factor regulador de la transcripció, permetent la transcripció dels gens necessaris per a la replicació

del DNA. L'activació de Cdk2-Ciclina E té lloc gràcies a la fosfatasa Cdc25A (*Cell division cycle 25*).

Davant la presència de dany en el DNA, el cicle cel·lular s'atura en el punt de control G1/S a través de l'activació de dos mecanismes. El primer és un mecanisme ràpid que causa la inhibició de la Cdk2 (que forma part d'un dels complexos que fosforilen Rb) per part de les proteïnes Chk1 i Chk2, a



través de la inhibició de la fosfatasa Cdc25 (**Figura 4**). El segon mecanisme d'aturada a G1/S és més conegut. En aquest cas, ATM activa p21, un inhibidor de Cdk, via p53 (Deckbar, Jeggo, & Löbrich, 2011). Aquest procés requereix l'activació de la transcripció del gen de p21 i, per aquest motiu, només inhibeix l'entrada a S passades unes hores de l'exposició a radiació. Tot i que retardat, aquest procés té un paper molt rellevant en el manteniment de l'estabilitat genòmica. De fet, la pèrdua de p53 és una característica molt freqüent en la tumorigènesi.



### *El punt de control G2/M*

El punt de control G2/M modula l'entrada de la cèl·lula en mitosi. Aquesta entrada està

regulada per l'activitat del complex Cdk1-Ciclina B, qui a la vegada és activat per la forma no fosforilada de la fosfatasa

Cdc25A (Figura 5). Com passava en el punt de control G1/S,

ATM/ATR, proteïnes activades en resposta al DNA,

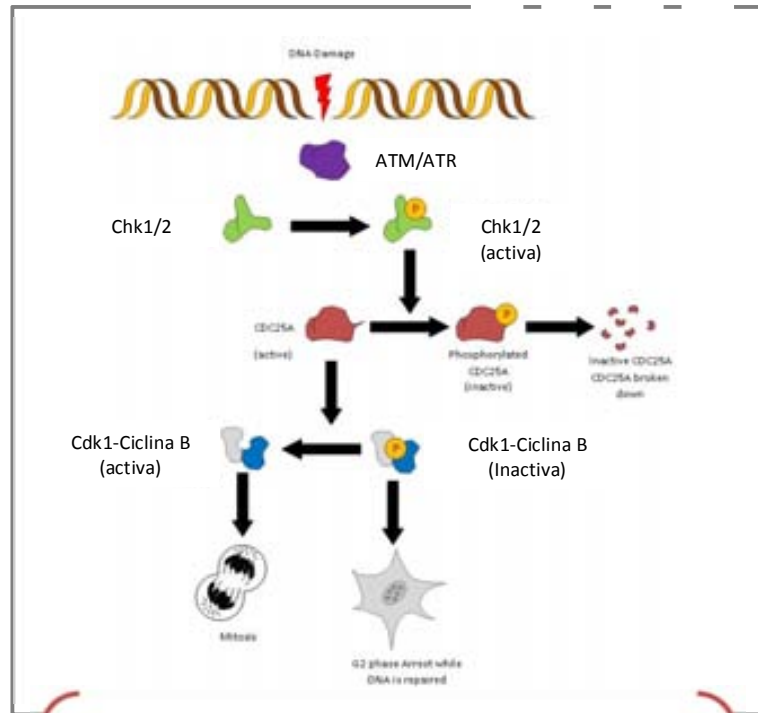
s'encarreguen d'inhibir el complex Cdk1-Ciclina B a través d'una cascada de fosforilacions.

De manera seqüencial, ATM,

fosforila les quinases Chk1 i Chk2, que alhora fosforilen la fosfatasa Cdc25A.

Cdc25A, un cop fosforilada, roman inactiva,

incapaç d'activar el complex Cdk1-Ciclina B i inhibint l'entrada de la cèl·lula a mitosi.



**Figura 5. Esquema simplificat de l'activació del punt de control G2/M.** ATM fosforila i activa la quinasa Chk2, mentre que ATR activa Chk1. Ambdues quinases, Chk1 i Chk2, fosforilen i inactiven les Cdc25 fosfatasas. La inactivació d'aquestes fa que la desfosforilació de la Cdk1, necessària per l'entrada de la cèl·lula en mitosi, no tingui lloc i que per tant, s'aturi el cicle cel·lular en aquest punt.

### *La sensibilitat dels diferents punts de control del cicle*

L'aturada de les cèl·lules en qualsevol dels punts de control pot tenir com a objectiu donar a

les cèl·lules més temps per a poder reparar, evitar la replicació o segregació de les molècules de DNA danyades i, en últim terme, conduir a la senescència o a l'apoptosi. El correcte

funcionament dels punts de control del cicle cel·lular és doncs essencial per mantenir l'estabilitat genòmica i prevenir la carcinogènesi (Krempler, Deckbar, Jeggo, & Löbrich, 2007).

De fet, les cèl·lules mancades d'aquests punts de control presenten inestabilitat genòmica. No obstant això, hi ha estudis que indiquen que no tots els punts de control establerts al llarg del

cicle cel·lular presenten la mateixa sensibilitat. Aquestes diferències s'observen sobretot quan la inducció de dany és limitada, per exemple quan les cèl·lules s'exposen a baixes dosis de radiació.

Estudis realitzats en fibroblasts humans exposats a baixes dosis de radiació ionitzant indiquen que les cèl·lules entren en mitosi tot i tenir DSBs sense reparar (Krempler et al., 2007). Mitjançant l'estudi de les cinètiques d'entrada a mitosi i del nombre de foci radio-induïts després de rebre diferents dosis de radiació es va observar l'existència d'un llindar mínim de 15-20 trencaments de doble cadena per sota del qual no s'activaria el punt de control G2/M (Deckbar et al., 2011; Krempler et al., 2007). Per tant, davant de la inducció de dany per sota del llindar esmentat, la falta d'activació dels punts de control podria provocar la persistència dels trencaments cromosòmics i les possibles reorganitzacions incorrectes entre cromosomes. La fallida del punt de control G2/M també ha estat associada amb la hipersensibilitat a les baixes dosis de radiació (Krueger SA, Collins SJ, Joiner MC & Wilson GD, 2007; Wykes et al., 2006). Fins i tot s'ha descrit que un factor important en les diferències interindividuals de sensibilitat a la radiació podria raure en la capacitat d'activar aquest punt de control. El punt G1/S té un llindar d'activació molt més baix, ja que després de 100mGy ja s'observa un alentiment en l'entrada a S, tot i així, la seva eficàcia també sembla estar limitada (Deckbar et al., 2011). Alguns polimorfismes en p53 podrien tenir un impacte en l'eficàcia d'aquest punt. En resum, variacions en la capacitat d'iniciar i mantenir l'aturada del cicle cel·lular entre individus podria causar variabilitat en la resposta a la radiació ionitzant i al dany radio-induït.

### 2.3 Vies de reparació del DSB

Entre les vies responsables de la reparació dels DSBs en podem destacar dues: la **via de reparació homòloga (HR)**, la

via de reparació no homòloga o de **reunió no homòloga d'extrems**

(NHEJ). Com els seus noms indiquen, la via NHEJ uneix

els dos extrems trencats sense necessitat

d'homologia, mentre que HR restaura de manera acurada

la seqüència genòmica dels extrems trencats de DNA

mitjançant la utilització de la cromàtide germana com a

motlle per a la reparació (Lieber, 2008; San Filippo,

Sung, & Klein, 2008)). Recentment s'ha descrit una tercera via de reparació anomenada **via de reunió d'extrems mitjançant microhomologia (MMEJ)** que es basa en la hibridació entre

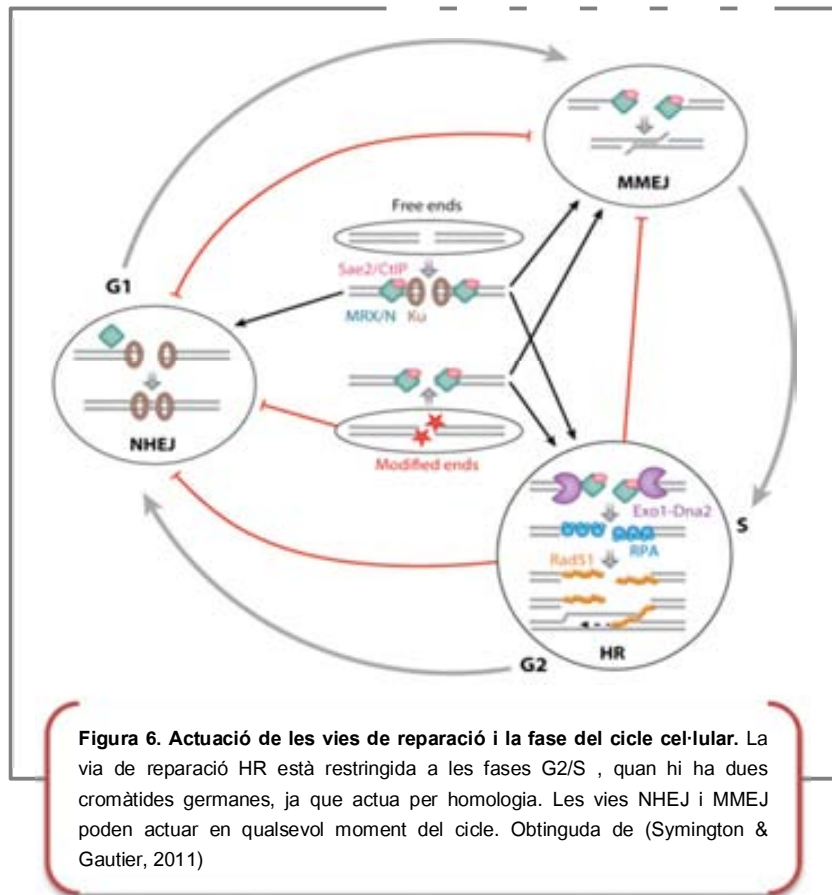
petites seqüències homòlogues (de 1 a 4 nucleòtids) per alinear els extrems trencats abans de

relligar-los (Ciccia & Elledge, 2010). L'elecció d'una via o una altra per part de la cèl·lula depèn en gran mesura de l'estructura dels extrems trencats de DNA i de la fase del

cicle cel·lular. Les vies NHEJ i MMEJ són actives durant tot el cicle cel·lular. La via HR requereix

utilitzar la cromàtide germana com a patró i per tant, només actuarà durant les fases en que la cromatina està replicada, és a dir, en les fases S i G2 (**Figura 6**). L'elecció de la via també ve

determinada pel tipus de trencament i sobretot pel processament que aquest pateix,



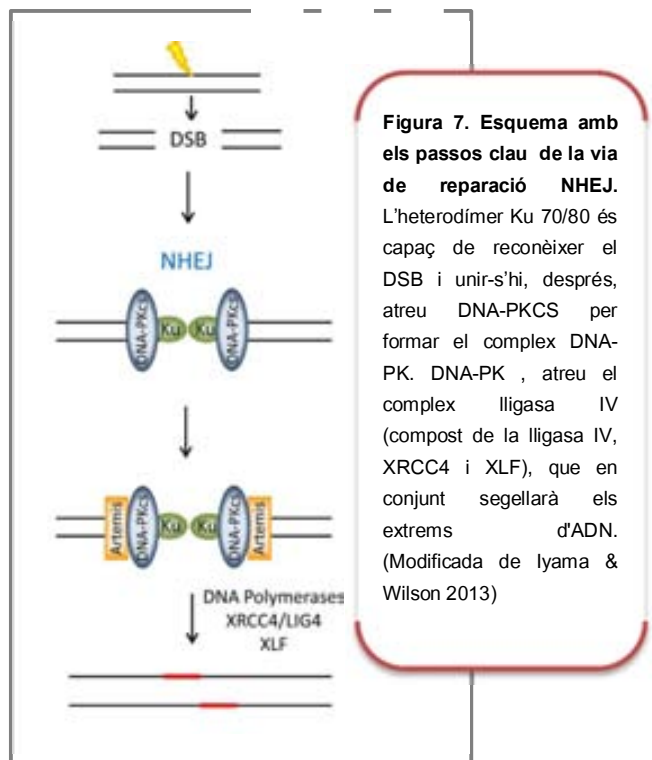
**Figura 6. Actuació de les vies de reparació i la fase del cicle cel·lular.** La via de reparació HR està restringida a les fases G2/S, quan hi ha dues cromàtides germanes, ja que actua per homologia. Les vies NHEJ i MMEJ poden actuar en qualsevol moment del cicle. Obtinguda de (Symington & Gautier, 2011)

concretament, si té lloc una reseció 5'-3' extensa en el DSB. Aquesta reseció, com veurem a continuació amb més detall, deixa llargs extrems 3' de cadena simple que impedeixen la unió correcta de les proteïnes principals de la via NHEJ, afavorint així l'elecció de HR (Symington & Gautier, 2011).

### Les vies de reparació NHEJ i MMEJ

La via NHEJ és el mecanisme principal de reparació de DSBs en eucariotes superiors i té lloc en tres fases diferenciades: la detecció del DSB, el processament dels extrems cromosòmics trencats (en cas que sigui necessari) i la resolució de trencament. Com que aquesta via no utilitza cap cromàtide germana com a patró es considera que es propensa a introduir errors en el moment de la reparació.

La NHEJ comença amb la unió de l'heterodímer Ku70/80 (Ku) en els dos extrems del DSB, això provoca el seu alineament i n'impedeix la digestió nucleolítica (Lieber, 2010; Walker, Corpina, & Goldberg, 2001). Ku interacciona amb moltes proteïnes entre elles DNA-PKcs, membre de la família de les PIKKs, i la XRCC4-DNA lligasa IV (Figura 7). La unió de Ku amb el DNA permet el reclutament de DNA-PKcs en ambdós extrems. A més, una translocació interna de Ku deixa l'espai

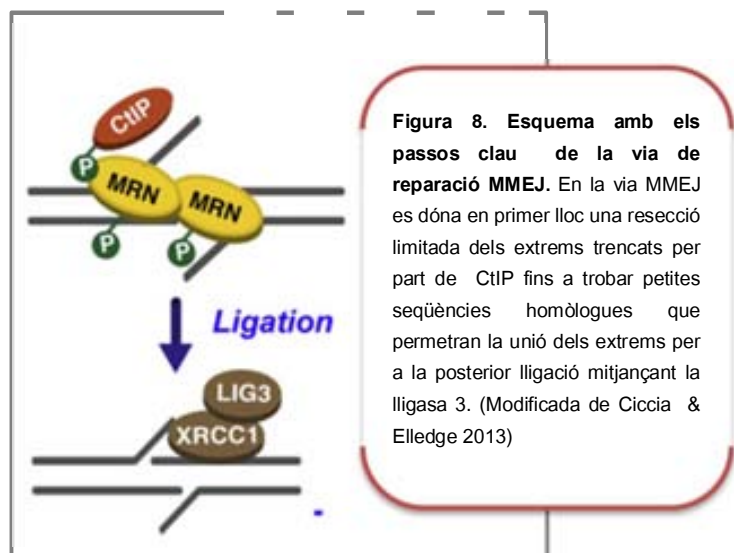


**Figura 7. Esquema amb els passos clau de la via de reparació NHEJ.** L'heterodímer Ku 70/80 és capaç de reconèixer el DSB i unir-s'hi, després, atreu DNA-PKcs per formar el complex DNA-PK. DNA-PK, atreu el complex lligasa IV (compost de la lligasa IV, XRCC4 i XLF), que en conjunt segellarà els extrems d'ADN. (Modificada de Iyama & Wilson 2013)

suficient per a que les dues molècules de DNA-PKcs interaccionin tot formant un pont proteic entre els dos extrems (Hartlerode & Scully, 2009). La interacció de DNA-PKcs amb el complex Ku-DNA activarà la seva activitat serina/treonina quinasa permetent la fosforilació dels seus substrats (DeFazio, Stansel, Griffith, & Chu, 2002; Hartlerode & Scully, 2009). *In vitro*, s'ha vist que DNA-PKcs pot fosforilar tot un seguit de proteïnes que intervenen en la NHEJ com Ku70,

Ku80, XRCC4, XLF, Artemis, lligasa IV i H2AX, afectant la seva activitat i, fins i tot, es pot autofosforilar. Els DSBs senzills, aquells formats per 2 extrems roms, no necessiten cap processament per poder ser relligats. Tanmateix, aquest tipus de trencament és poc freqüent. Són més habituals els trencaments en què els extrems presenten fragments de cadena simple 3' o 5' protuberants. En aquest casos es requereix un processament, que almenys *in vitro*, és dut a terme per 3 enzims: Artemis i les DNA polimerases  $\mu$  i  $\lambda$ . Artemis, és reclutada al lloc de dany gràcies a la seva capacitat d'interaccionar amb DNA-PKcs. Artemis també actua com a exonucleasa 5'→3' i endonucleasa dirigida a les regions de DNA on hi ha una transició de doble cadena a cadena simple. El processament d'aquestes lesions genera buits en el DNA que han de ser omplerts amb l'ajuda de les DNA polimerases  $\mu$  i  $\lambda$ . Finalment, els dos extrems són units gràcies a l'acció de la DNA lligasa IV, XRCC4 i XLF(Cernunnos) (Ahnesorg, Smith, & Jackson, 2006; Buck et al., 2006). L'activitat de la DNA lligasa és estimulada tant per XRCC4 com per XLF i és capaç de lligar els extrems roms, però també extrems amb petits "overhangs" o protuberàncies.

La via MMEJ, que opera al llarg de tot el cicle cel·lular, funciona sense els factors més bàsics de la via NHEJ, factors com Ku, XRCC4 o la DNA lligasa IV. La proteïna CtIP (C-terminal-binding protein Interacting Protein) s'encarrega de retallar el DNA fins trobar petites seqüències homòlogues, les quals seran relligades amb la DNA polimerasa III, tot



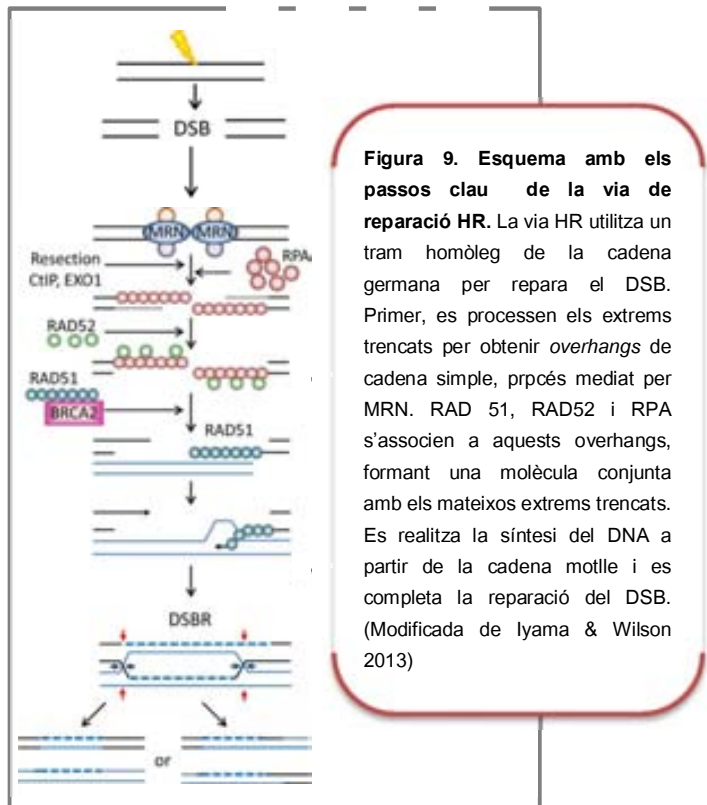
permetent la reparació del DSB (Bennardo, Cheng, Huang, & Stark, 2008; Simsek et al., 2011). Aquest tipus de reparació sempre acaba donant lloc a petites delecions, fet que fa que sigui la via amb més tendència a error (Figura 8).

### La via de reparació HR

La via de recombinació homòloga actua durant les fases S i G2, quan una cromàtide germana homòloga pot servir com a patró de reparació (Holthausen, Wyman, & Kanaar, 2010). El primer pas d'aquest procés és la detecció del DSB mitjançant el complex MRN i la resecció dels extrems trencats del DNA per part

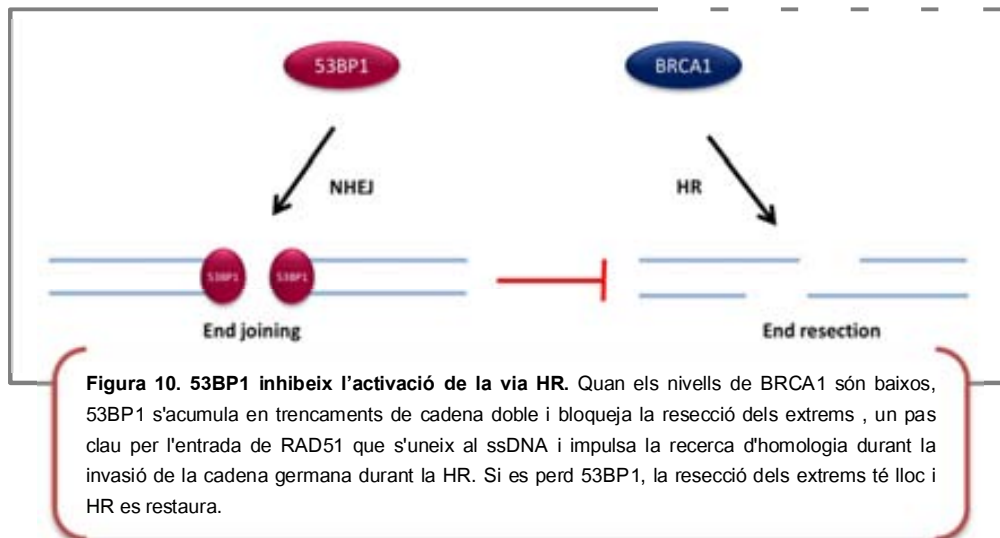
de CtIP. Aquesta resecció dóna lloc a extrems protuberants de DNA de cadena simple. Aquest primer pas és comú amb el de la via MMEJ (Truong et al., 2013) (Figura 8). Posteriorment, la proteïna RPA s'unirà als extrems de cadena simple per protegir-los de les nucleases. Després, RPA, en presència de BRCA2, serà reemplaçada per RAD51 (Figura 9). Els nucleofilaments de RAD51 dirigiran la invasió de la cromàtide germana en la cerca d'homologia. Tot seguit, la cadena

invasora patirà una extensió amb l'ajuda de la DNA polimerasa i serà relligada per formar el llaç D o *D-loop* (Chowdhury, Choi, & Brault, 2013). Encara es desconeix quina polimerasa duu a terme aquesta extensió *in vivo*, però la DNA polimerasa  $\eta$  pot fer-ho *in vitro* (McIlwraith et al., 2005). A banda del llaç D, també es forma una unió de Holliday (estructura en forma de creu entre les cadenes implicades en el trencament). S'ha vist que les proteïnes RAD54, WRN (amb funció helicasa i exonucleasa) i BLM (amb funció helicasa) s'encarreguen de fer lliscar la unió de Holliday a mesura que la síntesi del DNA avança. BLM conjuntament amb la topoisomerasa IIIa poden dissoldre la unió Holliday, acabant així amb els entrecreuaments.



### L'elecció de la via de reparació

En estudis recents s'ha vist que, les proteïnes que hem classificat com a mediadores, 53BP1 i BRCA1, tenen papers antagònics alhora de promoure l'elecció d'una de les dues vies principals de reparació dels DSBs (Zhang, 2013). 53BP1 promouria l'elecció de la via NHEJ, actuant com a inhibidor de la via de reparació homòloga (HR), mentre que BRCA1 té un rol central en la via HR (**Figura 10**). Quan les cèl·lules són deficientes BRCA1 s'acumulen en G2, activen Chk2 (checkpoint kinase 2), acumulen p53 i es dona augment en el nombre de trencaments en el seu DNA fruit de la manca d'activació de la via HR. Curiosament, quan es realitza un "knock down" de 53BP1 en aquestes cèl·lules, els canvis en la DDR esmentats, no



tenen lloc (revisat a Lowndes, 2010). Bouwman i col·laboradors conclouen que el knock-down de 53BP1 reestableix de manera parcial la via HR en les cèl·lules deficientes per BRCA1, incentivant una reparació més eficient. La possible restauració de la via HR no evita però, que aquella cèl·lula es transformi i esdevingui tumoral. Un bon exemple d'això, el trobem en els casos de càncer de mama on els tumors més agressius són aquells on els portadors d'una mutació en el gen BRCA1 també perden 53BP1. En resum, les proteïnes que havíem denominat com a mediadores tenen uns rols complexes, que s'han d'entendre bé per monitoritzar els efectes que poden tenir en les cèl·lules en que la xarxa de la DDR no actua de manera òptima.

## 2.4 Senescència i Apoptosi

Quan les cèl·lules no poden reparar el seu DNA de manera efectiva s'activen altres mecanismes antitumorigènics que indueixen una aturada irreversible del cicle cel·lular (senescència) o la mort de la cèl·lula (apoptosi). Es desconeix però què determina el destí final d'una cèl·lula. De fet, aquesta elecció sovint depèn del tipus cel·lular o de la intensitat i naturalesa del dany causat. La proteïna p53 és una proteïna central tant en la inducció de la resposta de senescència com en l'apoptosi. Aquesta proteïna és capaç d'induir l'aturada del cicle cel·lular de manera temporal (quiescència) o de manera irreversible (senescència). La proteïna p53 també pot desencadenar el procés d'apoptosi en el que les cèl·lules pateixen una mort programada.

### Senescència

La senescència cel·lular és un estat que es caracteritza per una aturada permanent del cicle cel·lular. Les cèl·lules senescentes deixen de proliferar, normalment amb un contingut de DNA típic de la fase G1, però romanen metabòlicament actives. Una vegada aturades no aconsegueixen reiniciar la replicació del DNA malgrat es donin les condicions de creixement adequades. Les cèl·lules senescentes adopten una morfologia ampla i aplanada i exhibeixen diversos marcadors moleculars que permeten la seva identificació, essent el més conegut la

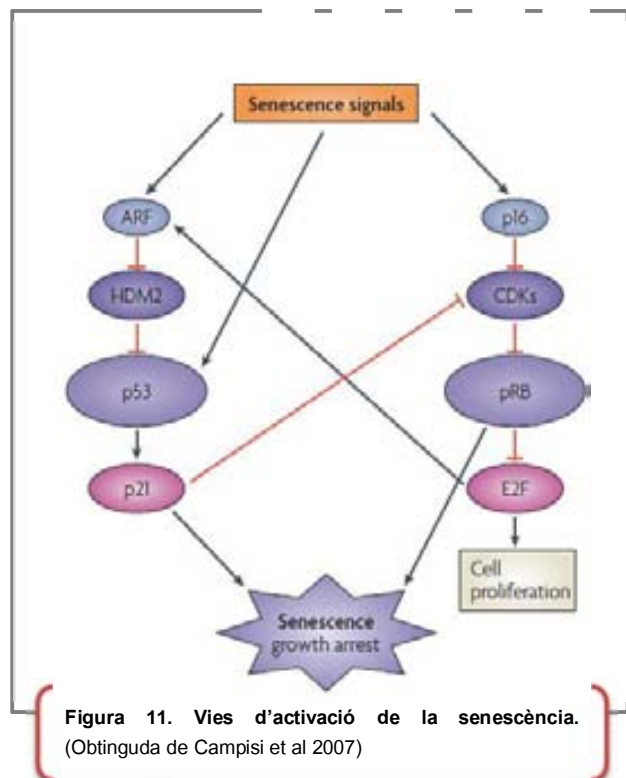


Figura 11. Vies d'activació de la senescència. (Obtinguda de Campisi et al 2007)

mesura de l'activitat SA- $\beta$ Gal (*Senescence-Associated beta-Galactosidase*) (Vicencio et al., 2008). Les cèl·lules senescentes, a diferència de les cèl·lules proliferants, presenten activitat  $\beta$ -galactosidasa detectable a pH 6. En afegir el substrat XGal, les cèl·lules senescentes prenen una



coloració blava identificable al microscopi òptic, prova d'un increment en el contingut lisosomal característic d'aquestes. Hi ha tres tipus de senescència reconeguts: a) la **senescència replicativa**, provocada per l'escurçament telomèric (veure apartat 5.1) b) la **senescència induïda per estrès**, que s'indueix quan les cèl·lules creixen en condicions inadequades o quan han estat incapaces de reparar el dany induït, i c) la **senescència induïda per oncogens** (Panganiban, Snow, & Day, 2013). La radiació ionitzant és capaç d'activar els mecanismes que conduiran a la cèl·lula a un estat de senescència induïda per estrès. Aquesta activació i la conseqüent aturada del cicle cel·lular a G1 es duu a terme per dues vies de senyalització diferents: la via que implica p53/p21 i la via dependent de p16/Rb. Les dues vies es regulen de manera recíproca i acaben provocant l'aturada del cicle cel·lular (**Figura 11**).

Estudis realitzats en cèl·lules senescentes mostren que la DDR en aquestes està permanentment activada. S'apunta a que la persistència de la DDR és el que manté les cèl·lules en estat de senescència (Fumagalli et al., 2012). Això no vol dir que, quan s'indueix dany a les cèl·lules que estan en estat de senescència, la resposta a aquest dany sigui eficient. Les cèl·lules senescentes mostren una cinètica alentida pel que fa al reclutament de les proteïnes de la DDR en els trencaments de cadena doble de DNA. Concretament, Sedelnikova i col·laboradors, mostren un reclutament alentit d'alguns factors de la DDR en cultius de fibroblasts amb un percentatge elevat de cèl·lules positives per  $\beta$ -galactosidasa (Sedelnikova et al., 2008).

### *Apoptosi*

L'apoptosi és una forma de mort cel·lular programada que pot ser induïda per una varietat d'estímuls. Entre aquests, trobem la presència de dany massiu en el DNA, com el que pot induir la radiació ionitzant. És un procés ordenat durant el qual el DNA es fragmenta i la cromatina es condensa. La cèl·lula pateix un encongiment fent que el citoplasma es vegi més dens. Durant l'apoptosi, p53 s'encarregarà d'activar un seguit de proteïnes que provocaran la disgregació ordenada de la cèl·lula en forma de cossos apoptòtics. L'activació de p53 també desencadena la síntesi *de novo* de molècules pro-apoptòtiques. L'apoptosi es regeix per la família de proteïnes Bcl-2 i es senyalitza a través de receptors de mort, com ara el Fas.

L'apoptosi es basa en el desplegament de grans plataformes multi-proteiques que faciliten l'activació de les caspases mitjançant el reclutament, la dimerització i l'escissió autocatalítica (Panganiban et al., 2013). En el procés d'apoptosi també tenen lloc un seguit de canvis a nivell bioquímic, com la pèrdua de la integritat de la membrana plasmàtica, la condensació del DNA i la fragmentació del DNA. De fet, l'inici de l'apoptosi es caracteritza per la translocació del fosfolípid fosfatidilserina a la monocapa exterior de la membrana plasmàtica (Bailey, Giles, Czarnota, & Stanis, 2009; Vermes, Haanen, Steffens-Nakken, & Reutelingsperger, 1995). Aquesta translocació permet la detecció de l'apoptosi a nivell cel·lular en els primers estadis de l'apoptosi, utilitzant la proteïna Annexina-V conjugada amb una molècula fluorescent. Aquesta metodologia es basa en la detecció de la translocació de la fosfatidilserina des de la monocapa interna cap a la monocapa externa de la membrana plasmàtica (Vermes et al., 1995; Bailey et al., 2009). La detecció de cèl·lules apoptòtiques amb Annexina-V s'acostuma a combinar amb el marcatge de la cromatina amb iodur de propidi, que només pot entrar a la cèl·lula i tenyir la cromatina si aquesta és morta i per tant permet distingir les cèl·lules apoptòtiques de les necròtiques. Els estadis més avançats en el procés d'apoptosi es poden detectar amb la tècnica de TUNEL (de l'anglès *Terminal dUTP Nick End-Labeling*). El TUNEL permet detectar la degradació del DNA a través de l'addició de nucleòtids fluorescents en els extrems trencats.

### *Què determina que les cèl·lules facin apoptosi o senescència?*

No està gens clar quins mecanismes determinen que una cèl·lula segueixi un procés d'apoptosi o de senescència. Tot i que la majoria de cèl·lules poden dur a terme ambdós processos, s'ha apuntat que són exclusius: quan s'inicia un procés, l'altre no pot tenir lloc (Campisi & d'Adda di Fagagna, 2007). El tipus cel·lular sembla ser determinant. Per exemple, en resposta al dany, les cèl·lules epitelials i els fibroblasts tendeixen a induir senescència, mentre que els limfòcits entren en apoptosi. En alguns estudis en que s'ha manipulat l'expressió de Bcl-2 o s'ha inhibit les caspases s'ha aconseguit que aquesta tendència s'invertís: les cèl·lules que tenien tendència a morir per apoptosi, ho feien per senescència

(Nelyudova & Aksenov, 2007). De manera similar, intents d'inhibir la senescència han acabat protegint les cèl·lules de l'apoptosi (Gorbunova, Seluanov, & Pereira-Smith, 2003). Aquests estudis fan palès el fet que hi ha una interacció clara entre aquestes dues vies. Un dels punts claus d'interacció és el nivell d'expressió de p53, sembla que la capacitat de mantenir un nivell constant de p53 conduiria a les cèl·lules a l'apoptosi (Seluanov et al., 2001). No obstant això, la regulació creuada entre l'apoptosi i la senescència cel·lular està lluny de ser entesa (Vicencio et al., 2008).

### **3. DDR i radiosensibilitat**

---

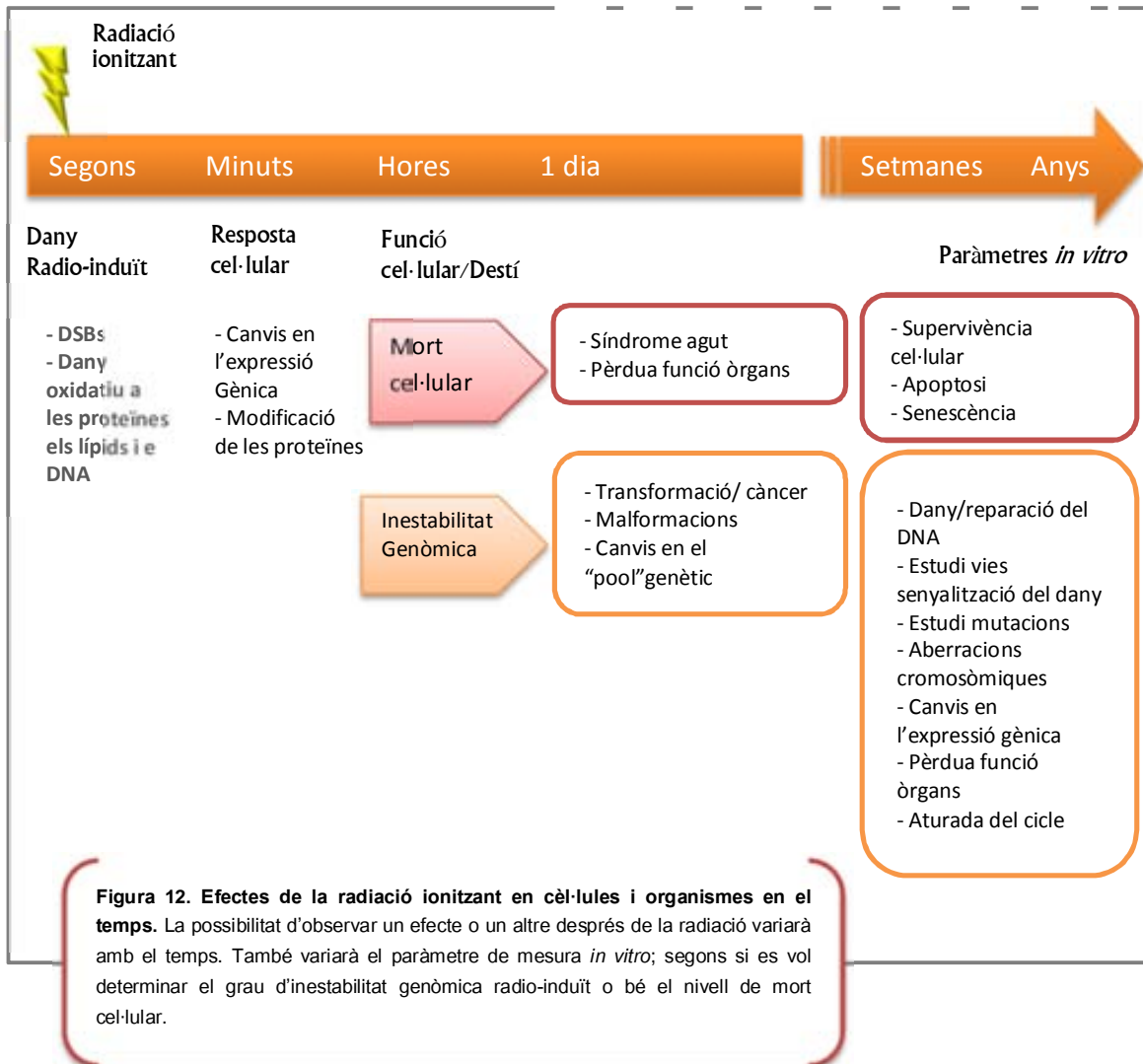
Tenint en compte que la finalitat de les vies de la DDR és mantenir la integritat del genoma, no és gens estrany que els defectes en els gens d'aquestes vies causin radiosensibilitat. L'estreta relació entre DDR i radiosensibilitat es posa de manifest en les síndromes humanes degudes a mutació dels gens d'alguna de les proteïnes la DDR. Aquestes síndromes tenen associat un augment en la radiosensibilitat degut a la incapacitat de reparar correctament el dany radio-induït. Aquesta incapacitat o ineficàcia a l'hora de reparar el dany de les cèl·lules duu a les persones que pateixen aquestes síndromes a una elevada inestabilitat genòmica i a una predisposició major de patir càncer. Es poden classificar aquestes síndromes d'acord amb la funció de la proteïna afectada en les vies de la DDR. Hi ha desordres deguts a mutacions en el reconeixement o la senyalització de la presència de dany com l'Ataxia Telangiectasia (causada per mutacions en el gen ATM), d'altres es deuen a defectes en la via homòloga de reparació (HR) com la síndrome de Bloom (mutació del gen de BLM) o a la via no homòloga de reparació (NHEJ) com les síndromes d'immunodeficiència combinada severa (SCID) que estant associades a mutacions a proteïnes com ARTEMIS, DNA-PKcs o la lligasa IV. L'estudi d'aquestes malalties tan poc freqüents ha permès entendre millor el paper de cadascuna d'aquestes proteïnes en la DDR.

#### **3.1 Concepte de radiosensibilitat**

El concepte de radiosensibilitat comporta la mesura de l'efecte o de la resposta de l'organisme o la cèl·lula a la radiació ionitzant. L'avaluació d'aquest efecte variarà segons si es fa a nivell

clínic o a nivell cel·lular. A nivell clínic, després d'un procediment mèdic com la radioteràpia, es podrà quantificar l'efecte de la radiació avaluant l'aparició d'una reacció en el teixit irradiat o bé, l'aparició d'un càncer secundari. A nivell cel·lular es pot valorar el grau de la resposta a la radiació i per tant el valor de la radiosensibilitat detectant el nivell de mort cel·lular després de la irradiació, quantificant el dany a nivell cromosòmic, valorant l'aparició de lesions en el DNA i la eficiència en la reparació d'aquestes o bé, monitoritzant l'activació dels punts de control del cicle cel·lular. El tipus d'assaig escollit per avaluar la resposta de les cèl·lules a la radiació, variarà segons la quantitat i la qualitat de radiació utilitzada i el temps que s'hagi esperat post-irradiació (Valdiglesias, Giunta, Fenech, Neri, & Bonassi, 2013). En el cas d'exposició a baixes dosis de radiació, és més adequat valorar la radiosensibilitat mitjançant la monitorització de la DDR o l'estimació del grau de dany a nivell cromosòmic (**Figura 12**). Les dosis baixes sovint són insuficients per conduir la cèl·lula a la mort, si que són suficients però per generar un dany en el DNA. Si s'indueix un cert grau de dany al DNA, aquest comportarà un increment en la inestabilitat genòmica que és potencialment carcinogènic.

En qualsevol cas, la realització d'experiments de tipus radio-biològic és important per esbrinar com responen les cèl·lules a la radiació, quins mecanismes cel·lulars queden afectats i quines diferències hi ha quan la qualitat de la radiació varia. També serveixen per entendre els mecanismes que hi ha darrera dels resultats dels estudis epidemiològics i sobretot, per optimitzar els nivells de protecció radiològica. Sovint es realitzen experiments d'irradiació *in vitro* per poder monitoritzar la resposta de la cèl·lula a la radiació, per veure la quantitat de dany induït i per determinar-ne la radiosensibilitat.



### 3.2 Avaluació del dany en el DNA i la resposta de la cèl·lula

L'avaluació del dany en el DNA és pot realitzar mesurant el dany causat a nivell cromosòmic o es pot monitoritzant la resposta de la cèl·lula a aquest dany seguint l'acció de les proteïnes de la DDR. Ambdues aproximacions són prou sensibles per detectar els canvis induïts per dosis baixes de radiació ionitzant.

#### *Avaluació del dany a nivell cromosòmic*

Les alteracions poden ser de diferents graus, des d'un canvi a nivell nucleotídic fins a alteracions en l'estructura o en el nombre de cromosomes o, fins i tot, de la ploidia cel·lular. El

dany a nivell cromosòmic pot ser un senyal d'**inestabilitat genòmica**, definint aquesta com un estat dinàmic generador d'una elevada taxa d'alteracions genètiques (Lengauer, Kinzler, & Vogelstein, 1998). Per aquest motiu s'ha desenvolupat diferents tècniques que permeten avaluar l'aparició d'aquest dany a nivell cromosòmic.

#### Aberracions cromosòmiques

Les aberracions cromosòmiques poden ser estudiades fent una tinció uniforme dels cromosomes metafàsics amb el colorant Giemsa o bé realitzant una hibridació amb diferents sondes per detectar cromosomes sencers o parts d'aquest amb la tècnica de FISH (de l'anglès fluorescence in situ hybridization ). La tinció amb Giemsa és útil per fer un recompte ràpid d'aquestes aberracions, però no permet detectar translocacions o insercions. La tècnica de FISH, en canvi, és més laboriosa, però més informativa alhora de definir la complexitat de les lesions (Anderson, Stevens, & Goodhead, 2002; Nakano et al., 2001). Una altra manera d'avaluar el nombre d'aberracions cromosòmiques és mitjançant la condensació prematura dels cromosomes o PCC (de l'anglès Premature Chromosome Condensation). Aquest assaig es realitza mitjançant l'ús d'inhibidors de les fosfatases com la caliculina A, que permeten l'anàlisi dels cromosomes de les cèl·lules en G2. El fet que l'anàlisi no estigui restringit a les cèl·lules en metafase, fa que la PCC incrementi notablement el nombre de cèl·lules analitzables en una mateixa mostra i permeti l'anàlisi de les cèl·lules fins i tot quan les cèl·lules del cultiu no estan en condicions de dividir-se.

#### Assaig dels micronuclis

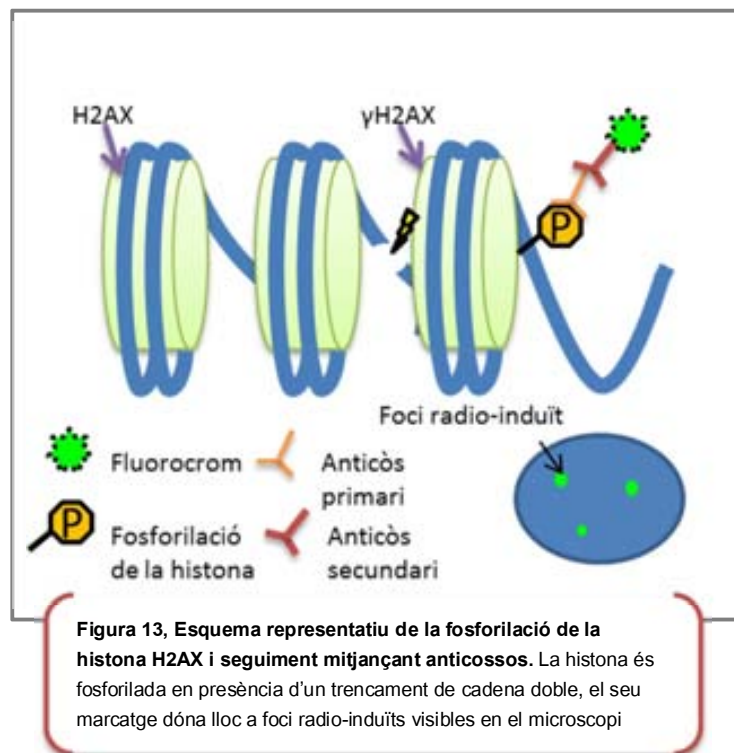
Els micronuclis són indicadors de la pèrdua de cromosomes sencers o de fragments acèntrics i, com van suggerir Schmid i Heddle, el seu estudi és molt útil per detectar el dany en els cromosomes (Heddle & Carrano, 1977; Schmid, 1975). Els micronuclis es formen a partir de cromosomes acèntrics o cromosomes sencers que es queden enrere durant l'anafase i que quedaran envoltats per un embolcall nuclear independent al del grup principal de cromosomes. La formació de micronuclis depèn de la divisió de la cèl·lula. Per això, per tal que les diferències en la taxa de proliferació no afectin la freqüència de micronuclis, l'assaig de micronuclis es combina amb la utilització de la citocalasina B. D'aquesta manera s'inhibeix

la citocinesi de les cèl·lules, tot permetent la seva divisió mitòtica completa, conduït així a l'acumulació de cèl·lules binucleades (Fenech & Morley, 1985; Lynch & Parry, 1993). Així doncs, l'anàlisi de micronuclis es limitarà a aquelles cèl·lules que s'han dividit (cèl·lules binucleades). A banda de la presència dels micronuclis, l'anàlisi també permet detectar els ponts nucleoplasmàtics i les protuberàncies nuclears, donant-nos així informació addicional sobre anomalies morfològiques nuclears indicadores d'inestabilitat cromosòmica.

### *Seguiment de les proteïnes de la DDR mitjançant tècniques d'immunodetecció*

Donat que la integritat genòmica està constantment vigilada pels factors de la DDR, el seu correcte funcionament estarà directament relacionat amb el grau de radiosensibilitat de la cèl·lula: com més eficient sigui el procés de reparació conduït pels factors de la DDR, menor serà la radiosensibilitat. En l'apartat 2.2 ja s'ha descrit la seqüència de reclutament d'aquestes proteïnes en el DSB, essent la fosforilació de la histona H2AX un dels primers successos que tenen lloc. La fosforilació és ràpida i es manté fins que el trencament és reparat. Per aquest motiu la seva desfosforilació és senyal que la lesió ha estat reparada. La cinètica d'aquesta fosforilació/desfosforilació es pot

seguir mitjançant diverses tècniques d'immunodetecció de la histona: recompte dels foci de  $\gamma$ H2AX en el microscopi de fluorescència, quantificació de la fracció de cèl·lules amb marcatge de  $\gamma$ H2AX mitjançant citometria de flux o quantificació de la histona fosforilada per *western blot*.



### Detecció foci de $\gamma$ H2AX radioinduïts mitjançant microscòpia de fluorescència

La detecció dels foci d'histona

s'aconsegueix amb l'ús de dos anticossos: un anticòs primari que reconeix el residu de serina 139 fosforilat i un secundari unit a un fluorocrom que s'unirà a l'anticòs primari de manera específica (**Figura 13**). L'assaig de la  $\gamma$ H2AX s'ha convertit en el test per excel·lència d'estimació del dany radioinduit, tot i que també valora l'eficàcia de la cèl·lula alhora d'iniciar la resposta de la DDR i l'eficiència de reparació (Rothkamm & Löbrich, 2003). Aquest tipus d'anàlisi s'ha fet extensiu a altres proteïnes que formen part de la DDR, com ara la detecció de 53BP1, proteïna clau de la via NHEJ, en els IRIF. D'aquesta manera també es pot valorar la capacitat de la cèl·lula de reclutar els factors necessaris per a la reparació del DSB en el lloc del dany. L'estudi de la formació d'aquests foci en cèl·lules representa en bona mesura la seva capacitat de resposta a la radiació, fins i tot a dosis molt baixes.

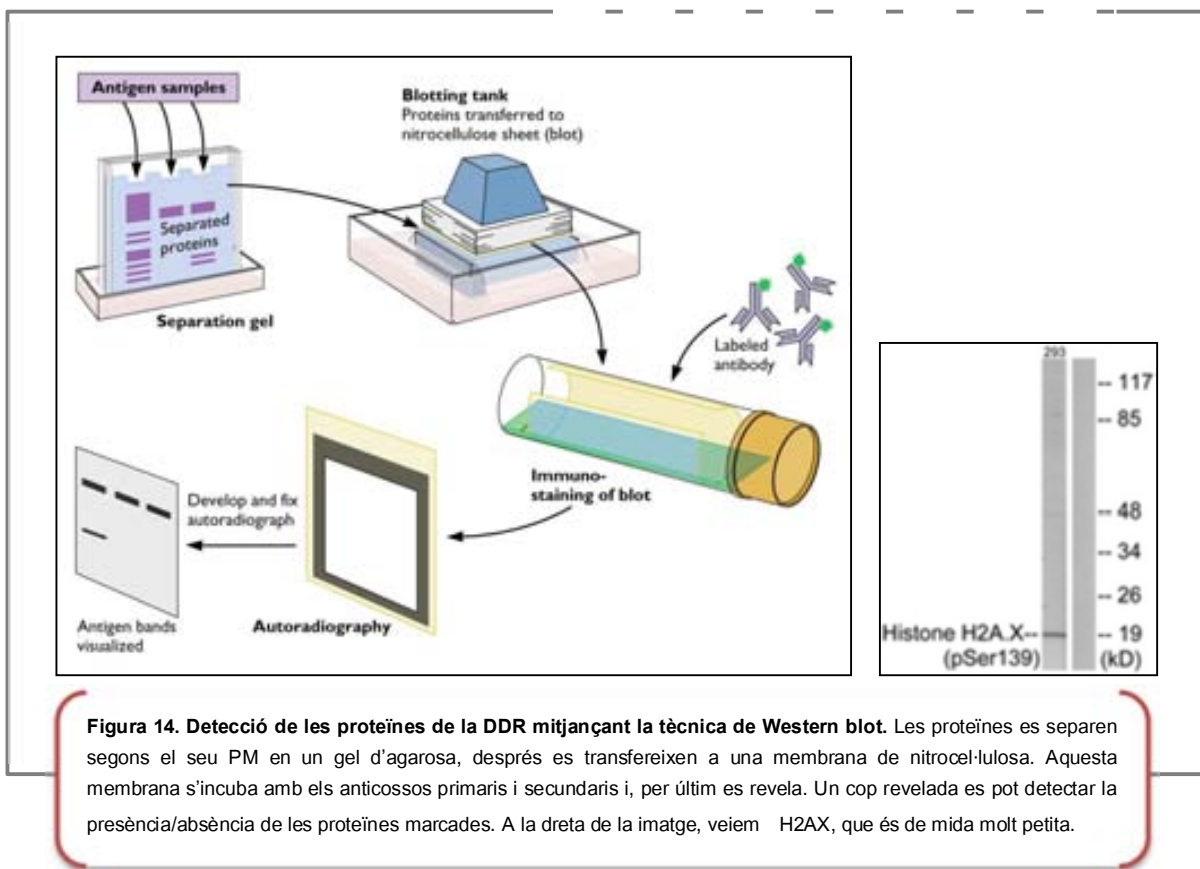
#### Valoració de la fosforilació de H2AX mitjançant western blot i citometria de flux

La detecció dels foci histona fosforilada en el lloc del dany mitjançant l'anàlisi microscòpica és lenta i molt laboriosa. En aquest sentit s'han desenvolupat tècniques que permeten detectar en un major nombre de cèl·lules, en un mateix espai de temps tant la histona fosforilada com la presència de diverses proteïnes de la DDR. Una d'aquestes tècniques és la tècnica del **western blot** que consisteix en la quantificació d'una proteïna concreta en un extracte proteic mitjançant la transferència a una membrana de nitrocel·lulosa de les proteïnes separades segons el seu pes molecular i la posterior immunodetecció de la proteïna d'interès (**Figura 14**). La detecció de la histona fosforilada amb aquesta tècnica ha de ser molt curiosa. Caldrà protegir la fosforilació de la histona ja que la pèrdua dels grups fosfat de les proteïnes és freqüent si la tècnica de western blot no està ben optimitzada. A més, és una tècnica que no permet valorar la presència d'histona en les cèl·lules de manera individual. Això representa un inconvenient important donat que en algunes fases del cicle, com la fase S o la M, les cèl·lules presenten un marcatge de  $\gamma$ H2AX que és independent de la inducció de dany. A

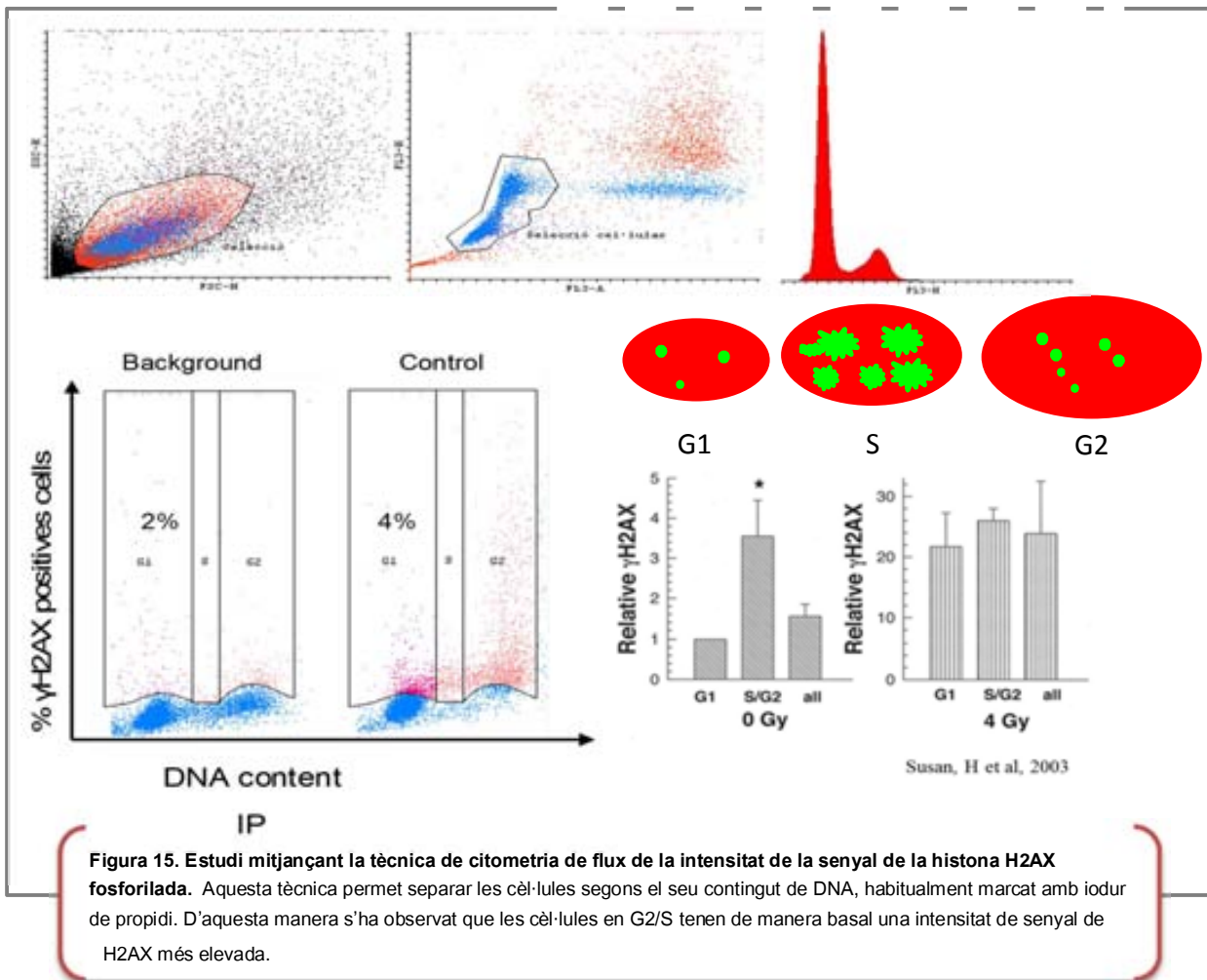


més, les cèl·lules en G2, al tenir més DNA que les que es troben en G1, sovint també presenten més marcatge d'histona. Tenir en compte aquests canvis és essencial per fer un seguiment precís del dany radio-induït.

La quantificació de  $\gamma$ H2AX per citometria també es basa en la immunodetecció de la proteïna, però la lectura es fa amb un citòmetre de flux. Mitjançant una doble tinció el citòmetre classifica les cèl·lules segons el contingut de DNA, marcat amb iodur de propidi, i la intensitat de senyal, emesa pel fluorocrom associat a la histona fosforilada. L'avantatge d'aquesta



tècnica respecte les altres dues és la seva rapidesa i el fet que distingeixi la fase del cicle cel·lular en què es troben les cèl·lules. Permet limitar l'anàlisi a una fase concreta del cicle evitant els problemes fruit dels canvis en el patró d'expressió de les cèl·lules (**Figura 15**).



Per treballar a baixes dosis de radiació ens cal un mètode de recompte de foci sensible (ja que s'indueixen pocs DSBs) automatitzat (per eliminar l'efecte subjectiu del que fa el recompte) i que tingui en compte els patrons d'expressió fruit dels canvis en l'estat del cicle cel·lular (per no sobreestimar o infravalorar el dany radio-induït).

#### 4. Exposició a baixes dosis de radiació

El 85% de la radiació rebuda per la població té un origen natural. Les fonts de radiació d'origen natural són principalment el radó (42%), el sòl (18%) els aliments (11%) i les que tenen un origen còsmic (14%). El 15% restant de radiació rebuda prové majoritàriament de fonts artificials, com ara radiografies de diagnòstic mèdic, medicina nuclear (TAC, MRI) o l'exposició ocupacional. Per tant, és important monitoritzar els efectes de la radiació ionitzant

a dosis baixes ja que la població general s'hi veu freqüentment exposada. Com que aquest tipus d'exposicions són cada cop més rellevants (p. ex. augmenta la radiació rebuda per la realització de proves mèdiques), els riscos provinents d'aquestes també han de ser avaluats. Es calcula que una persona rep de mitjana 2,4 mSv/any. L'ICRP (*International Commission on Radiological Protection*), a la publicació 99 redactada l'any 2005, estableix que 0,2 Gy és el llindar per sota el qual una dosi ha de ser considerada baixa. Des deleshores aquest llindar ha estat revisat i els diversos comitès que vetllen per la radioprotecció l'han situat a **0,1 Gy** (ICRP Publicació 103 l'any 2007, BEIR VII Phase 2 l'any 2006 i UNESCAR l'any 2012). Aquests llindars s'estableixen mitjançant estudis de tipus epidemiològic i estudis radiobiològics. A nivell epidemiològic s'ha establert de manera molt clara la relació entre les altes dosis de radiació i els riscos derivats d'aquestes. Per exemple, s'ha establert que l'exposició a 1 Sv (~ 1 Gy) provoca l'aparició de 5 casos de càncer per cada 100 persones exposades (així, si la incidència basal d'aquell càncer era d'un 25%, aquesta dosi l'incrementaria fins a un 30%). En aquest sentit, els efectes carcinogènics que puguin tenir les dosis situades per sota del llindar de 0,1 Gy són menys evidents degut a les dificultats de discernir entre els càncers radio-induïts i aquells deguts a altres factors. Diversos estudis epidemiològics han portat als comitès que dicten els estàndards en radioprotecció a assumir el model lineal sense llindar, més conegut com a *Linear No-Threshold* (LNT).

D'acord amb aquest model, s'assumeix que no existeix un llindar d'exposició a partir del qual comencin els efectes i que per tant qualsevol dosi de radiació, per petita que sigui, suposa un risc per a la salut humana. Malgrat que aquest model ha estat criticat per diversos autors, com Tubiana et al 2009, que defensen els beneficis de les baixes dosis de radiació en front dels riscos (hormesis)(Tubiana, Feinendegen, & Kaminski, 2009), el model LNT és recolzat per diversos estudis epidemiològics que mostren l'aparició de càncers en excés o ERRs (*excess relative risks*) després de l'exposició a dosis baixes de radiació ionitzant. Molts d'aquests estudis han estat realitzats en persones que han rebut un tractament o exploració mèdica que implicava l'ús de la radiació. Aquests tractaments sovint es situen en el rang de dosis de

radiació baixes. Per exemple, després d'irradiar dones joves amb múltiples fluoroscòpies toràciques, on cada dosi era equivalent a 0,01 Gy, el risc de patir càncer de mama es va veure incrementat (Boice Jr, Preston, Davis, & Monson, 1991; Ronckers et al., 2010). El nombre de casos de càncer per damunt dels esperats fou de 10 per cada 10000 per any i per Gy a l'edat de 50 anys.

Aquest excés és equiparable als riscos associats a altes dosis de radiació entre els supervivents de les bombes atòmiques (LSS, *Life Span Study*) (Boice, Land, Shore, Norman, & Tokunaga, n.d.; M. P. Little & Boice Jr, 1999; Tokunaga et al., 1994) En el LSS, es va estudiar el grup de supervivents que havia rebut

menys de 0,1 Gy. També es va trobar una resposta lineal respecte la dosi i el risc d'aparició de càncer, sense cap evidència de l'existència d'un llindar mínim (Preston et al., 2004). Com podem veure en la figura 16, l'ERR no és igual per a tots els tipus de càncer. Hi ha alguns càncers, com el càncer de mama, que presenten un valor més elevat d'ERR i per tant un risc major (Figura 16).

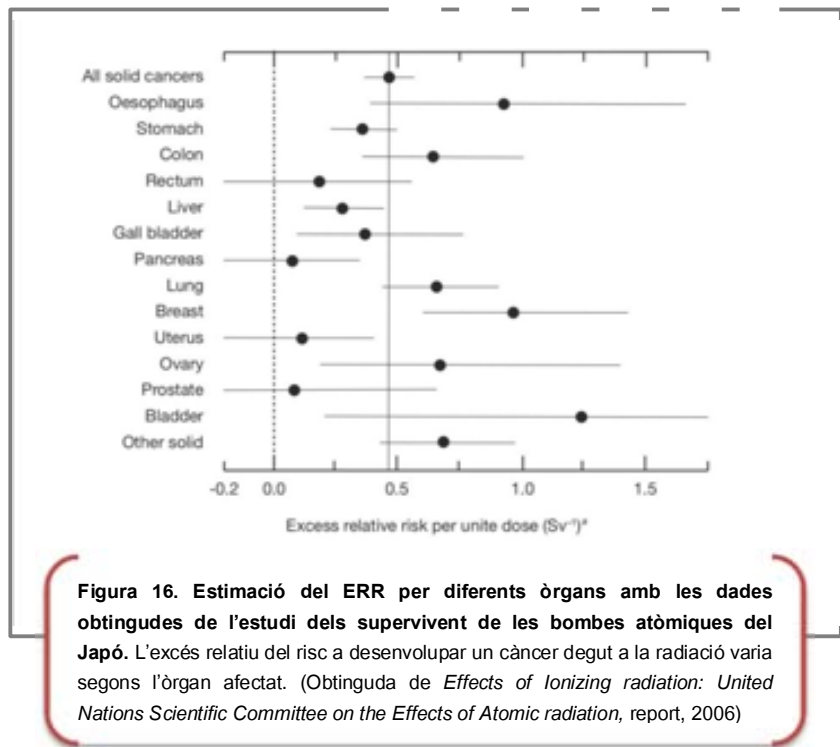


Figura 16. Estimació del ERR per diferents òrgans amb les dades obtingudes de l'estudi dels supervivents de les bombes atòmiques del Japó. L'excés relatiu del risc a desenvolupar un càncer degut a la radiació varia segons l'òrgan afectat. (Obtinguda de *Effects of Ionizing radiation: United Nations Scientific Committee on the Effects of Atomic radiation*, report, 2006)

La majoria de casos d'exposició de tipus ocupacional també estan relacionats amb baixes dosis de radiació. Tenint en compte que els estudis epidemiològics necessiten grups d'estudi molt grans per trobar diferències significatives a nivell estadístic, l'any 2007 Cardis i col·laboradors van realitzar un estudi d'exposició a radiació a 600000 treballadors de 15 països diferents que havien patit una exposició de tipus ocupacional a baixes dosis (Cardis et

al., 2007). En aquest estudi, els autors també conclouen que existeix una relació lineal dosis-efecte. Little i col·laboradors l'any 2009 fan una revisió profunda dels estudis esmentats i d'altres, conclouent que els valors de ERR dels diferents estudis són consistents amb els obtinguts per LSS i que per tant, l'aproximació lineal per estimar el risc a baixes dosis és la més adequada (Mark P Little, Wakeford, Tawn, Bouffler, & Berrington de Gonzalez, 2009).

Les dades epidemiològiques esmentades informen dels riscos relacionats amb la radiació tant en dosis moderadament altes (~1 Gy) com en les moderades (~ 0,1 Gy) i, en certa mesura, a baixes (~ 0,01 Gy) dosis, però no a nivells per sota del rebut de mitjana a nivell ambiental. En aquest sentit cada cop hi ha més estudis que intenten monitoritzar l'efecte de les baixes dosis a nivell experimental, omplint el buit que deixen els estudis epidemiològics. Per exemple, Martínez A i col·laboradors van estudiar mitjançant l'ús de l'assaig del cometa el nivell de dany en el DNA en treballadors exposats a baixes dosis de RI després d'un dia de treball (A. Martínez, Coleman, Romero-Talamás, & Frias, 2010). Els treballadors es van agrupar segons el tipus d'exposició que havien rebut; aquesta era diferent en cada grup segons el departament on treballava cada individu (radiologia, medicina nuclear i radioteràpia). Els resultats mostraven que en tots els casos, després d'un sol dia de feina, el dany en el DNA es veia incrementat. A més a més, es van observar diferències entre els treballadors dels diferents departaments, essent els treballadors de medicina nuclear els que mostraven una acumulació del dany major al final del dia. Tot i que aquest dany ja estava reparat el dia següent, els possibles reordenaments cromosòmics generats suposarien la font d'inestabilitat genòmica que podria ser rellevant en càncer radio-induït. També s'han realitzat estudis en ratolins exposats a una taxa de dosi baixa de rajos  $\gamma$  (20–200 mGy/dia) observant-se que els efectes indirectes de la radiació donaven lloc a aberracions cromosòmiques complexes (Tanaka, Kohda, Toyokawa, Ichinohe, & Oghiso, 2008). Tot plegat són aproximacions a les situacions reals de risc derivades de l'exposició a baixes dosis de radiació. Entendre l'extensió i la naturalesa de les respostes de les cèl·lules i els teixits a la radiació serveix per aprofundir

en els mecanismes que condueixen als efectes perjudicials per a la salut de l'exposició a la radiació.

## **5. L'edat com a factor modulador de la sensibilitat a la radiació**

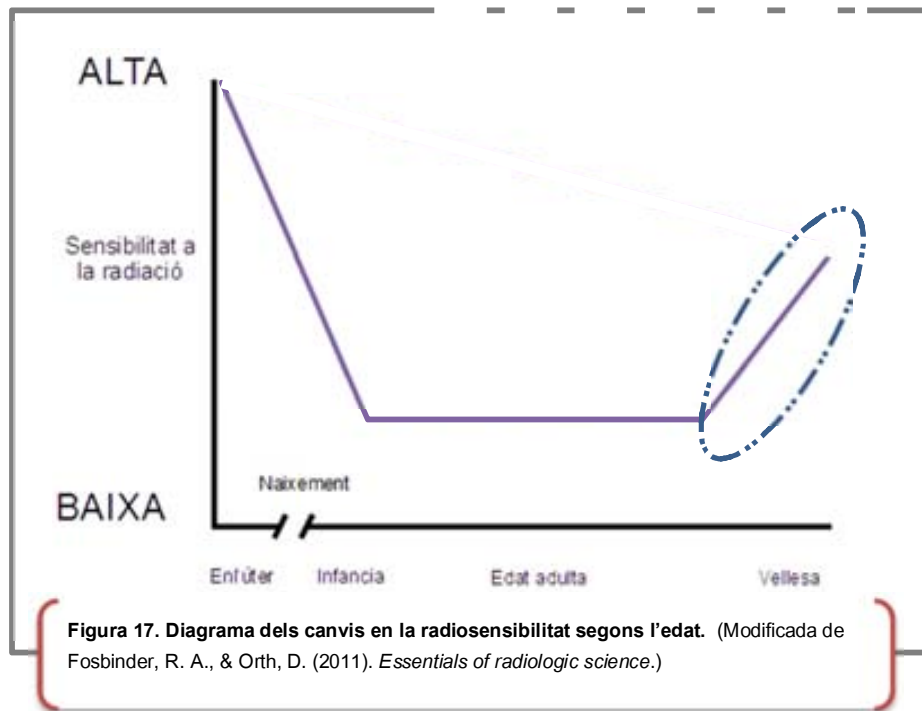
Els límits de dosi rebuda que s'estableixen en radio protecció per a un individu de la població general estan basats en els estudis de les patologies (majoritàriament l'aparició de càncer) que van patir els supervivents de les bombes atòmiques del Japó. Pel que fa a la inducció de càncer s'ha pogut determinar que hi ha diferències en la sensibilitat a la radiació entre individus i entre grups poblacionals depenent de l'edat, del patrimoni genètic, de l'estil de vida i de l'exposició a altres agents. En general, però, tot i que aquestes diferències han estat identificades no és comptabilitzen alhora d'establir els límits de dosi esmentats amb anterioritat. De moment, no hi ha suficient informació per establir quina és la magnitud d'aquestes diferències entre individus o grups i la seva influència alhora d'estimar els riscos a baixes dosis de radiació.

Entre els factors que poden modular la radiosensibilitat de les persones, n'hi ha que com el patrimoni genètic o la configuració genètica característica del individu, poden repercutir produint una variació en la sensibilitat en una fracció petita de la població. Altres, com l'edat, poden modular la radiosensibilitat afectant a una fracció important de la població. Per fer front a importants qüestions de política de protecció radiològica és necessari obtenir una informació científica més adequada sobre la magnitud de les variacions en la sensibilitat de la població, tant en la mida de les variacions com en la proporció de la població que es veu afectada.

### **5.1 Diversos estudis epidemiològics mostren un increment de la radiosensibilitat amb l'edat en la població adulta**

Els estudis epidemiològics permeten quantificar diferències inter-individuals en la radiosensibilitat fixant com a mesura l'aparició de casos de càncer radio-induït (càncer en excés, per sobre de la freqüència de càncer espontània a cada edat). L'edat en el moment de l'exposició pot ser un factor determinant pel què fa a la carcinogènesi radio-induïda. Els

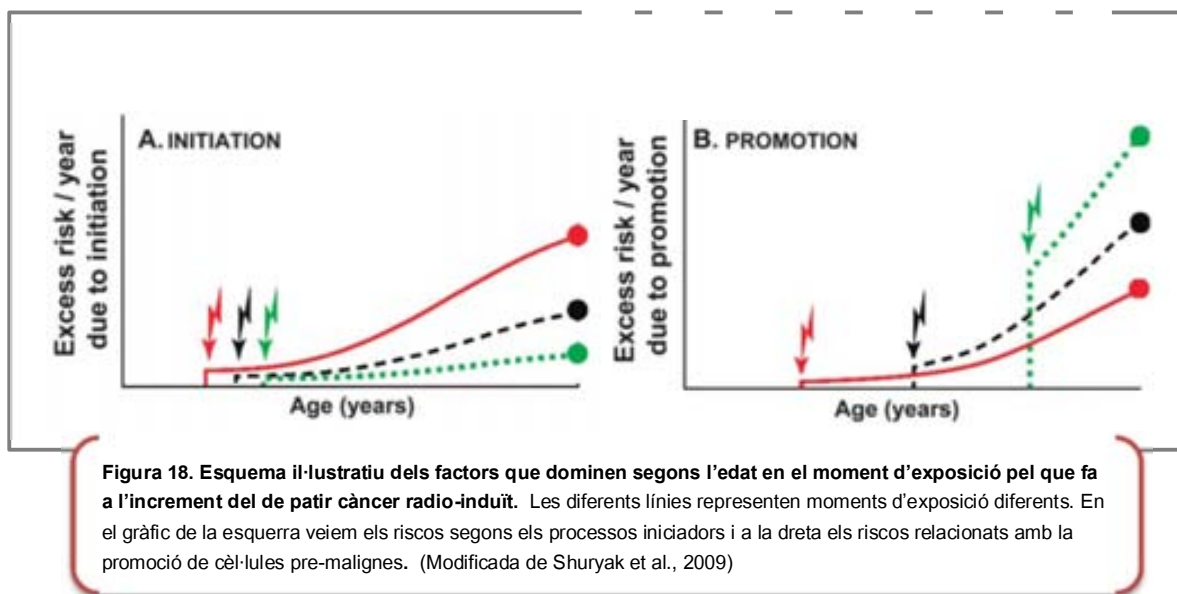
individus exposats durant la infantesa són els més sensibles a la radiació ja que hi ha un període més llarg de temps des del moment que es produeix la lesió primària per donar lloc a un esdeveniment carcinogènic. La sensibilitat a la radiació disminueix progressivament fins arribar a l'edat adulta i augmenta novament en els adults de major edat (**Figura 17**).



Per altra banda, l'organització mundial de la salut (WHO) ha registrat un increment destacable en l'esperança de vida: l'any 1990 una persona de 60 anys tenia una esperança de vida de 21 anys, l'any 2011 era de 24 anys. A més, cal tenir en compte que el percentatge de gent que necessita una exploració mèdica que impliqui l'ús de la radiació també augmenta amb l'edat (Fazel et al., 2009). Tot plegat fa que l'estudi dels efectes de la radiació ionitzant en les persones d'edat avançada sigui, a nivell de radioprotecció, cada cop més important.

Des de fa molts anys, es coneix que la població infantil és especialment sensible a la radiació ionitzant. Diversos estudis havien documentat la radiosensibilitat augmentada present durant la infantesa: en l'estudi dels supervivents de Hiroshima i Nagasaki, conegut com *LSS* (*Life Span Study*), també en un estudi realitzat per Bhatia i col·laboradors. En l'estudi de Bhatia

i col·laboradors veien un augment en l'aparició de càncer de mama en dones que havien estat irradiades durant la infantesa per tractar la malaltia de Hodgkin's. El mateix grup també observa un augment en el càncer de tiroides associat a una edat prematura en el moment de l'exposició (Bhatia S, Robison LL, Oberlin O, Greenberg M, Bunin G, Fossati-Bellani F, 1996; Bhatia et al., 2003). Més recentment, Shuryak i col·laboradors han establert un nou model per estudiar els efectes de l'edat en les estudis dels supervivents de les bombes atòmiques de Hiroshima i Nagasaki, on es té en compte com és el procés carcinogènic (Shuryak, Sachs, &



Brenner, 2010). Aquests investigadors conclouen que els riscos després d'exposar a individus joves estan associats a processos iniciadors, generadors de cèl·lules pre-malignes, potencialment carcinogèniques. En canvi, els riscos en la població adulta estan relacionats amb processos promotors de cèl·lules que ja eren pre-malignes i que després de la radiació es transformen (**Figura 18**).

Quan es calcula el risc derivat de l'exposició d'acord amb aquest nou model, s'observa que el valor de l'ERR pel què fa a la inducció de càncer és molt elevat en aquelles persones exposades durant la infantesa, disminuint fins a arribar a l'edat adulta i, de manera sorprenent, torna a augmentar en els adults més grans (Shuryak et al., 2010). Malgrat que aquests models són bastant recents, diversos estudis epidemiològics anteriors en altres



poblacions d'estudi ja havien mostrat que el risc de l'exposició a radiació no és manté baix al llarg de tota l'etapa adulta. Richardson i Wing ja havien observat una tendència similar entre els treballadors de les plantes d'urani de Oak Ridge Y-12, una població ocupacionalment exposada a radiació ionitzant (Richardson & Wing, 1999). El grup de treballadors que havien estat exposats després dels 45 anys mostraven una associació més forta entre les dosis rebudes i la mortalitat per càncer que els que havien estat exposats abans dels 45 anys. Mostrant així un augment en la sensibilitat a la radiació, mesurat segons l'aparició de càncer, depenent de manera positiva de l'edat en el moment de l'exposició.

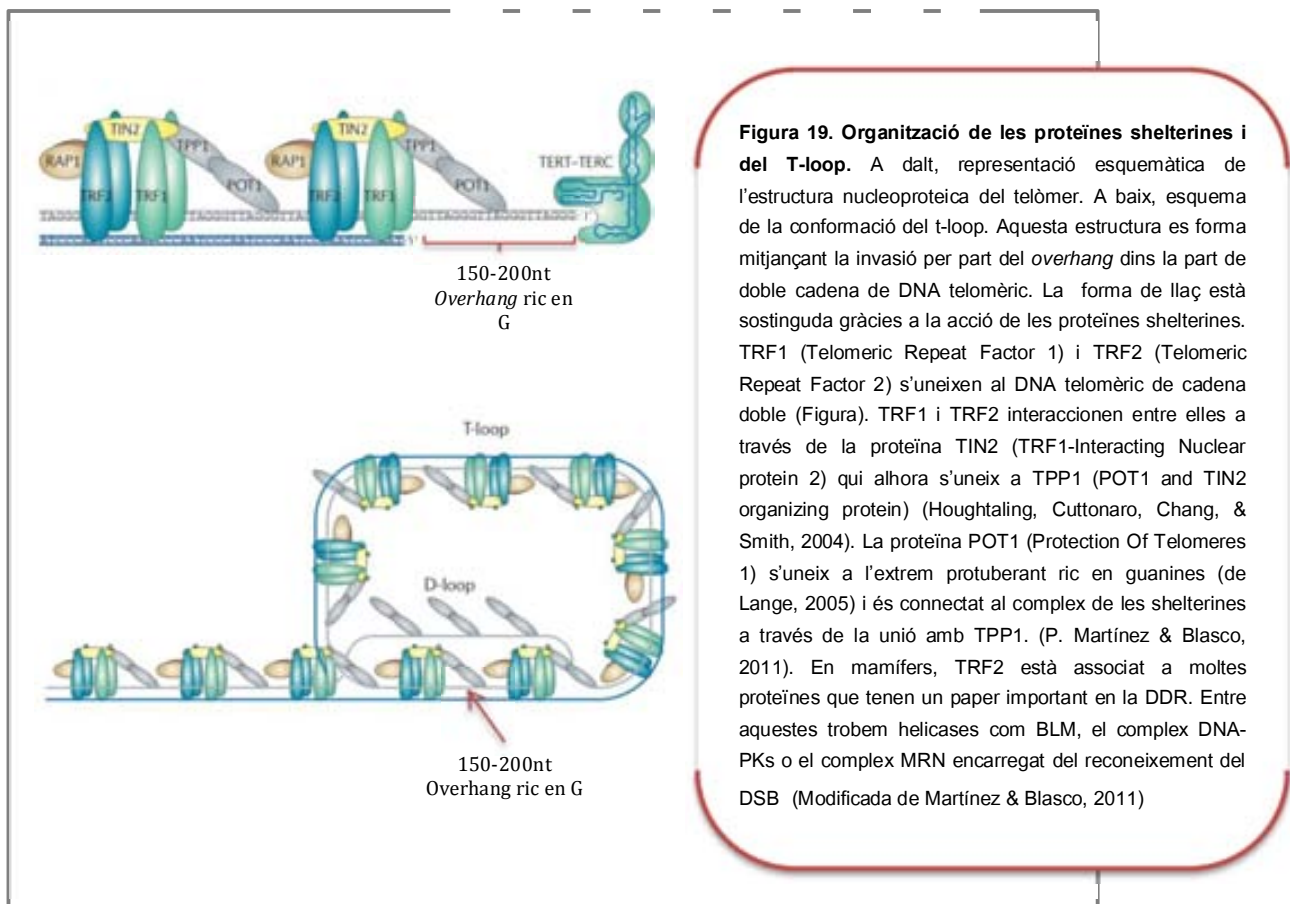
Hi ha certs canvis associats a l'envelliment, especialment a l'envelliment dels mamífers, com ara l'erosió telomèrica o la senescència replicativa, que podrien ser rellevants a l'hora d'entendre les bases mecanístiques d'aquest augment de la radiosensibilitat amb l'edat en la població adulta. En termes de radioprotecció és necessari entendre quins són els factors que intervenen en aquesta relació.

## 5.2 Bases de la biologia dels telòmers i la telomerasa

En els extrems dels cromosomes s'hi troben els **telòmers**, unes estructures nucleoproteiques especialitzades que tenen com a funció principal protegir els cromosomes de la recombinació i dels processos de degradació. En vertebrats, els telòmers estant compostats per la seqüència TTAGGG repetida en tàndem unida a un conjunt específic de proteïnes. Al final de la seqüència repetitiva de cadena doble hi ha un extrem 3' protuberant de cadena senzilla, ric en guanines, anomenat *overhang*. L'*overhang* juntament amb les proteïnes telomèriques són essencials per a la formació d'una estructura tridimensional anomenada llaç telomèric o *T-loop*. El *T-loop* protegeix l'extrem del cromosoma i permet a la cèl·lula distingir el final natural del cromosoma dels trencaments de cadena doble.

En humans aquestes repeticions telomèriques tenen una extensió d'entre 5 i 15 KB. La llargària telomèrica varia entre organismes d'una mateixa espècie, així com entre tipus cel·lulars i cromosomes d'un mateix individu. Aquestes variacions no alteren la funció dels telòmers mentre les repeticions telomèriques no arribin a tenir una mida crítica per sota de la

que no es pot formar el *T-loop*. Existeix un conjunt de 6 proteïnes unides a les seqüències telomèriques dels mamífers conegudes amb el nom de shelterines o *shelterin*, que tenen funció protectora i de manteniment del *T-loop* (de Lange, 2005). Dues d'aquestes proteïnes estan unides a les repeticions en tàndem de DNA de doble cadena i una s'uneix a l'*overhang*. La resta ho fa a altres proteïnes telomèriques (**Figura 19**) (P. Martínez & Blasco, 2011).



Les shelterines participen en la conformació del telòmer. Aquest pot tenir dues conformacions, una lineal i, per tant, oberta o poden formar el *T-loop*, segellant així els extrems cromosòmics. La conformació lineal facilita l'accés a la telomerasa, enzim encarregat de l'addició de noves seqüències telomèriques. En el *T-loop* el complex format pel DNA i les proteïnes conforma aquesta estructura característica quan l'*overhang* es plega sobre ell mateix i cap enrere envaint la doble hèlix de repeticions (**Figura 19**).

Com s'ha apuntat abans, aquesta estructura té un efecte protector, ja que impedeix que els factors de la DDR identifiquin l'extrem com si fos un trencament i intentin reparar-lo. Per fer-ho l'hauria d'ajuntar amb un altre extrem lliure de DNA donant lloc a una reorganització a nivell cromosòmic. Per tant, una de les principals funcions del telòmer és amagar els extrems cromosòmics i no permetre que siguin reconeguts i processats com a DSBs. Tot i així, els telòmers poden romandre oberts ja sigui degut a un escurçament telomèric prou extens que no permeti la formació del *T-loop* o a una pèrdua de les proteïnes telomèriques que desestabilitzi el complex de les shelterines. Aquests telòmers disfuncionals provoquen l'acumulació de les proteïnes de la DDR (53BP1,  $\gamma$ H2AX, NBS1, ATM, ATR i DNA-PKcs) que indueixen cascades de senyalització i acaben donant lloc a l'activació dels gens encarregats del control del cicle cel·lular (d'Adda di Fagagna et al., 2003). L'activació d'aquests gens, pot conduir a la senescència replicativa o a l'apoptosi.

L'extrem 5' dels cromosomes no pot ser replicat de manera completa, causant un escurçament telomèric de 50 a 200 parells de bases en cada cicle cel·lular. Això passa degut a la naturalesa antiparal·lela de la doble hèlix de DNA i al fet que les DNA polimerases només puguin afegir bases a l'extrem 3' de la cadena que s'està sintetitzant, fent necessari l'ús d'un encebador de RNA. Quan la seqüència de RNA més distal és degradada la replicació del DNA de la cadena retardada (3'-5') no pot ser completada en faltar un extrem 3'OH per continuar amb la síntesi d'aquesta. Per tant, el problema del final de la replicació causa un escurçament telomèric progressiu, que empitjora amb cada nou cicle. Una altra via que provoca escurçament telomèric és el fet que els telòmers estant més predisposats a patir dany degut a l'estrès oxidatiu que la resta del genoma. Concretament predisposat als trencaments de cadena simple que incrementen l'activitat de les nucleases i provoquen un escurçament telomèric. Per compensar aquesta pèrdua de longitud telomèrica, les cèl·lules poden tornar a allargar els telòmers amb l'activitat enzimàtica del complex **telomerasa** (E. H. Blackburn, 2001; Collins & Mitchell, 2002; Greider & Blackburn, 1985). Aquest complex està format, entre d'altres factors, per una unitat proteica amb activitat transcriptasa inversa (TERT) i per un component RNA (TERC), que conté el motlle per sintetitzar les seqüències telomèriques TTAGGG mitjançant

una transcripció inversa. D'aquesta manera la telomerasa allarga les seqüències telomèriques. La seva activitat però, està restringida a unes poques cèl·lules. En humans, l'expressió de la telomerasa està restringida a uns pocs tipus cel·lulars: les cèl·lules germinals (Wright, Piatyszek, Rainey, Byrd, & Shay, 1996), les cèl·lules mare hematopoietiques, les cèl·lules mare adultes (Chiu et al., 1996) i els limfòcits activats (Weng, Hathcock, & Hodes, 1998). La resta de cèl·lules somàtiques, tenen una activitat telomerasa insuficient, de manera que van erosionant els seus telòmers cada vegada que repliquen el seu DNA, fins que la longitud telomèrica és tant curta que les cèl·lules arriben al límit de Hayflick en el que es desencadena la senescència replicativa.

### *Senescència replicativa i edat*

Durant la primera meitat del segle XX es creia que les cèl·lules en cultiu es podien dividir indefinidament. Aquesta suposició es basava en els experiments d'Alexis Carrel, que va establir una línia de fibroblasts immortals, a partir del cor d'un embrió de pollastre, que van proliferar durant dècades. Aquests experiments però, no van poder ser reproduïts per ningú més. Finalment, l'any 1961 Leonard Hayflick i Paul Moorhead van demostrar que les cèl·lules derivades d'embrions humans i de ratolí, només es podien dividir un nombre finit de vegades en cultiu (Hayflick & Moorhead, 1961). El seu experiment demostrava que les cèl·lules deixaven de proliferar, però es mantenien en un estat metabòlicament actiu anomenat senescència (Hayflick's limit). Aquest tipus de senescència, com ja s'havia esmentat en l'apartat 2.4, ara s'anomena **senescència replicativa**. Després d'un seguit de divisions, les cèl·lules somàtiques aturen la seva proliferació, el nombre de cèl·lules en fase S decreix i el seu cicle queda aturat de manera irreversible en fase G1 i, a vegades, en G2. La causa d'aquesta aturada és la pèrdua de la funcionalitat del telòmer que desencadena un seguit de canvis en l'expressió gènica. Té lloc una sobre-expressió de p21 i p16INK4a, proteïnes encarregades d'inhibir les ciclines i provocar l'aturada del cicle (Pazolli & Stewart, 2008). La sobre-expressió de p16INK4a és independent de la via ATM-p53 (Herbig, Jobling, Chen, Chen, & Sedivy, 2004). L'associació entre l'escurçament telomèric i la senescència replicativa es va establir en

veure que l'expressió ectòpica de l'enzim telomerasa prevenia l'entrada en senescència de molts tipus cel·lulars.

Sembla que l'acumulació de dany en el DNA com a conseqüència de l'envelliment hagi d'afectar al genoma a l'atzar, però com ja apuntàvem abans, hi ha regions, com els telòmers, especialment susceptibles a patir un deteriorament amb l'edat (Blackburn, Greider, & Szostak, 2006). Varis models d'animals genèticament modificats han permès establir una relació entre la l'erosió telomèrica, la senescència i l'envelliment a nivell d'organisme. Estudis en ratolins han determinat que l'esperança de vida d'aquests animals era proporcional a la longitud dels seus telòmers (Armanios et al., 2009; Blasco et al., 1997; Herrera et al., 1999; Rudolph et al., 1999; Tomás-Loba et al., 2008). En humans, recentment, també s'ha establert, mitjançant l'estudi de la longitud telomèrica de leucòcits humans, que existeix una relació entre els telòmers curts i l'increment en la mortalitat, especialment a edats joves (Boonekamp, Simons, Hemerik, & Verhulst, 2013).

### *Erosió telomèrica i radiosensibilitat*

Com ja s'ha mencionat, l'erosió telomèrica duu a fusions entre els extrems dels cromosomes, podent-se produir entre els extrems de cromosomes diferents o entre cromàtides germanes. La fusió entre cromàtides germanes requereix la replicació del cromosoma i té lloc quan hi ha un sol o uns pocs extrems cromosòmics desprotegits (Sjögren & Nasmyth, 2001). Tanmateix, quan aquest nombre augmenta, les unions entre extrems de cromosomes diferents succeeix de manera prevalent, donant lloc a la formació de cromosomes dicèntrics (revisat per (Tusell, Pampalona, Soler, Frías, & Genescà, 2010)). Tant les cromàtides com els cromosomes dicèntrics, poden formar ponts anafàsics que es poden trencar quan els dos centròmers són estirats en direccions oposades durant la divisió. Aquests trencaments portaran a noves fusions i, conseqüentment, a nous ponts que es podran tornar a trencar, entrant així en els anomenats cicles de trencament-fusió-pont o cicles BFB (Breakage-Fusion-Bridge). L'entrada en aquests cicles genera una inestabilitat genòmica creixent que acaba donant lloc a anomalies de tipus estructural i numèric, capaces de generar desequilibris en les dosis gèniques. Aquests

desequilibris poden desencadenar la transformació maligna de la cèl·lula. La inestabilitat cromosòmica (CIN, Chromosome instability) que es genera a base de cicles BFB es considera important en la iniciació dels carcinomes (Artandi, Chang, Lee, & Alson, 2000; Gisselsson et al., 2000, 2001; Hagan et al., 2002; Meeker et al., 2004). Estudis realitzats en ratolins *knockout* pel gen que codifica la subunitat TERC de la telomerasa indiquen que la presència de telòmers curts disfuncionals a les cèl·lules d'aquests animals condueix a una hipersensibilitat davant l'exposició a radiació ionitzant. Dos estudis portats a terme de manera simultània i independent en dos laboratoris diferents van posar de rellevància que la longitud telomèrica afecta la radiosensibilitat tant a nivell cel·lular com de l'organisme sencer (Goytisolo et al., 2000; Wong et al., 2000). Les generacions tardanes i per tant amb telòmers de longitud més curta de ratolins *mTERC*<sup>-/-</sup> creuats entre ells mostraven una mortalitat incrementada quan eren exposades a una dosi aguda o fraccionada de rajos  $\gamma$ . Per altra banda, els estudis citogenètics en els fibroblast dels ratolins *mTERC*<sup>-/-</sup> mostraven un major nombre d'aberracions cromosòmiques en comparació amb els fibroblasts dels ratolins control. Es va avaluar la funcionalitat de les vies de reparació HR i NHEJ en els ratolins deficientes en telomerasa i estaven intactes. El fet que l'increment en les aberracions no s'observava en les generacions primerenques dels ratolins *mTERC*<sup>-/-</sup> apuntava l'escurçament telomèric i no l'absència de telomerasa com a causa de la radiosensibilitat incrementada d'aquests animals. Estudis realitzats en el nostre laboratori van permetre demostrar que els telòmers més curts en els ratolins *mTERC*<sup>-/-</sup> actuaven com vertaders DSBs. Aquests extrems desprotegits a causa de l'erosió telomèrica representaven extrems addicionals de reunió disponibles i afavorint la reparació il·legítima d'aquests dels DSBs radio-induïts (Latre et al., 2003). En estudis realitzats en el nostre grup també hem vist que aquest fet també té lloc en cèl·lules humanes (Soler, Pampalona, Tusell, & Genescà, 2009).

## **6. Mamografies i radioprotecció**

L'ús segur de la radiació en el camp del diagnòstic mèdic, sempre en el rang de les dosis baixes (< 100 mGy), requereix conèixer bé els mecanismes cel·lulars de resposta a aquestes. El cribratge mamogràfic o exploracions mamogràfiques rutinàries amb rajos X són un clar

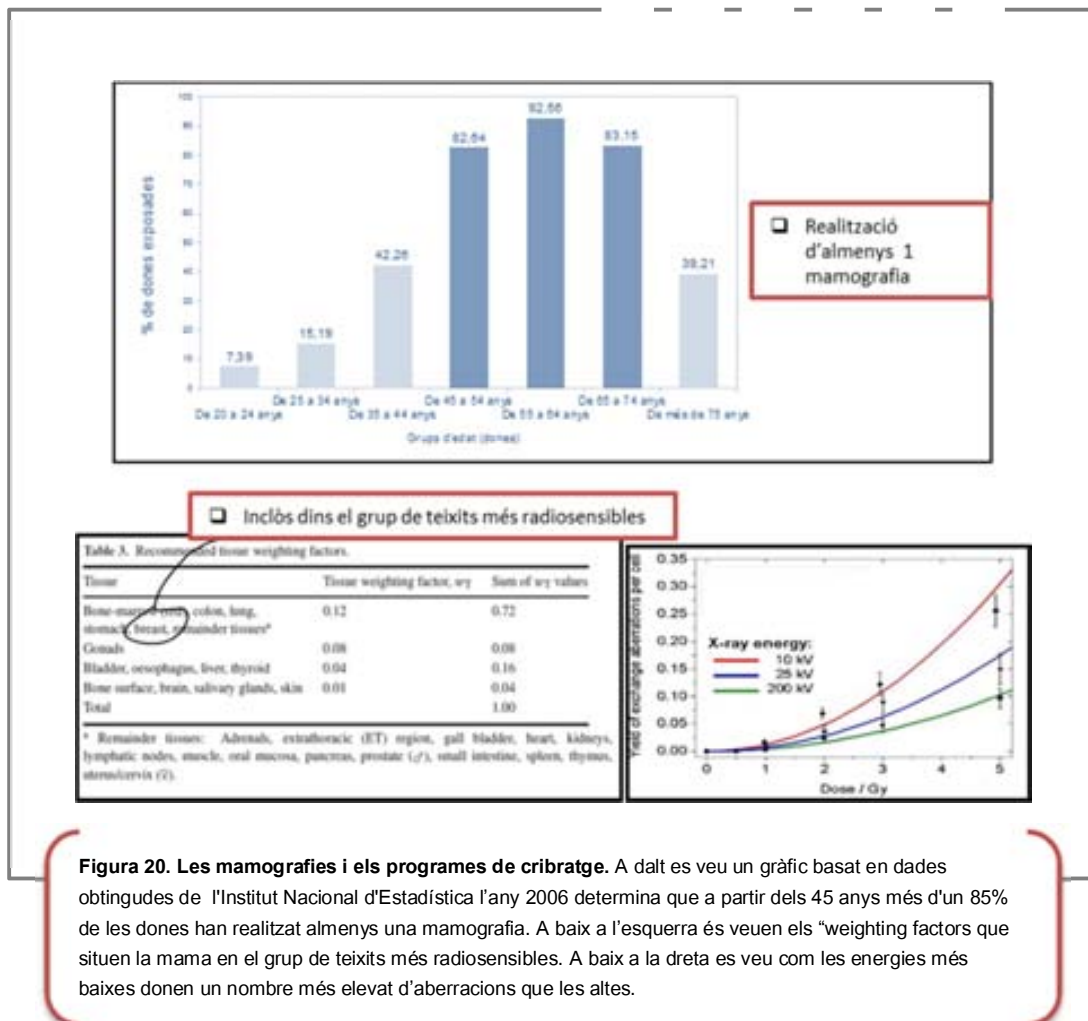
exemple d'exposició de la població femenina adulta a baixes dosis de radiació i també, una font de debat en termes de protecció radiològica.

A Espanya es va implantar el programa de detecció precoç de càncer de mama mitjançant exploracions mamogràfiques periòdiques l'any 1990. Un estudi realitzat per l'Institut Nacional d'Estadística l'any 2006 determina que, a partir dels 45 anys, més d'un 85% de les dones han realitzat almenys una mamografia (**Figura 20**). Malgrat que fa més de 20 anys de la seva implantació, la periodicitat del cribratge, cada un o dos anys, i l'edat d'inici d'aquest, a partir dels 45 o dels 50 anys, encara són font de debat. D'altra banda, també hi ha controvèrsia, sobre la relació entre els riscos i els beneficis d'aquest procediment mèdic. Part d'aquesta controvèrsia rau en que les mamografies comporten la utilització d'un tipus de radiació diferent. Per obtenir un bon contrast d'imatge en un teixit tou com la mama, és necessari l'emissió d'una energia concreta que es trobi dins del rang de rajos X de baixa energia.

### **6.1 Qualitat de la radiació emesa pel mamògraf**

En l'apartat 1 s'ha definit el concepte RBE, com l'efectivitat que tenen els diferents tipus de radiació a l'hora d'induir una certa quantitat de dany en les cèl·lules. Les radiacions d'alta LET tenen una major RBE en comparació a les de baixa LET, com els raigs X o els raigs gamma. No s'ha mencionat però que, dins de les radiacions de baixa LET, també poden existir diferències pel que fa a l'efectivitat biològica. En protecció radiològica s'assumeix que tant els raigs X com els  $\gamma$  tenen el mateix efecte biològic, independentment de l'energia del fotó. Tanmateix, actualment hi ha evidències que posen en dubte aquesta igualtat i que indiquen que els raigs X de baixa energia (de 29-30 KVp), com els que s'utilitzen en exploracions mamogràfiques, podrien tenir un efecte biològic superior (**Figura 20**). A partir de dades experimentals, diversos estudis han postulat que aquests rajos de baixa energia són més efectius que els de baixa LET però d'alta energia (com els rajos gamma) (Heyes & Mill, 2004). Mestres i col·laboradors van estudiar l'increment en el nombre de lesions incompletes i complexes induït per l'exposició a rajos X de 30 KVp respecte l'exposició a rajos d'energies

més elevades, 80 KVp i 120 KVp. Van demostrar que els rajos X de 30 KVp indueixen un increment en aquest tipus de lesions respecte els raigs X de més energia, aproximant-se al tipus de lesions que indueixen les radiacions d'alta LET. Per tant, el dany causat pels rajos X de baixa energia (mamografies) seria superior que el dany causat per rajos X d'alta energia. Això implica que les avaluacions del risc de les mamografies basades majoritàriament en estudis de supervivents a la bomba atòmica (rajos d'alta energia) podria estar subestimant el risc real dels programes de cribratge. A més, quan s'estudien els riscos de les mamografies cal tenir en compte que el teixit mamari està inclòs en el grup de teixits més radiosensibles segons l'ICRP (**Figura 20**). Si bé els tipus cel·lulars que s'han utilitzat fins al moment per avaluar el risc dels raigs X de baixa energia, els limfòcits i els fibroblasts, estan presents a la mama, cal tenir en compte que la majoria de càncers de mama no deriven d'aquests tipus de cèl·lules, sinó de cèl·lules epitelials de la glàndula mamària.



**Figura 20. Les mamografies i els programes de cribratge.** A dalt es veu un gràfic basat en dades obtingudes de l'Institut Nacional d'Estadística l'any 2006 determina que a partir dels 45 anys més d'un 85% de les dones han realitzat almenys una mamografia. A baix a l'esquerra es veuen els "weighting factors que situen la mama en el grup de teixits més radiosensibles. A baix a la dreta es veu com les energies més baixes donen un nombre més elevat d'aberracions que les altes.



L'existència de casos de càncer radio-induït causat per les mamografies dels programes de cribatge ha estat una font de preocupació pel públic en general i d'interès mèdic (Berrington de González & Reeves, 2005). Els estudis basen els seus models de benefici i risc en dades epidemiològiques que intenten esbrinar si la balança, en un rang concret d'edat, s'inclina més cap als riscos o cap als beneficis. En tot cas, encara trobem en aquest estudis moltes preguntes sense resoldre que no ens permeten prendre decisions a nivell de radioprotecció. En aquest sentit, la realització d'estudis experimentals en cèl·lules més rellevants des del punt de vista de la carcinogènesi mamària humana és important per estimar els riscos de mamografies. Entre aquests models experimentals hi ha les cèl·lules epitelials mamàries humanes (HMECs). Aquest es revela com un model molt interessant per a l'avaluació dels riscos de les mamografies donat que es tracta de cèl·lules no transformades ni immortals, que deriven de glàndula mamària normal. Treballar amb cèl·lules epitelials mamàries humanes ens permet proporcionar dades que permetin millorar l'avaluació de l'equilibri riscos/beneficis de les mamografies amb la finalitat d'optimitzar els protocols de protecció radiològica de les dones incloses en programes de cribatge per mamografia. La millora del coneixement sobre els riscos de les baixes dosis de radiació és essencial per a la seva utilització segura amb finalitats de diagnòstic mèdic.

## **6.2 Característiques del cultiu de les cèl·lules epitelials mamàries humanes**

Segons el teixit o l'espècie d'origen, les cèl·lules poden presentar diferències en la inducció de la senescència que els confereixen característiques específiques pel que fa a la seva capacitat de respondre al dany. Les HMECs presenten in vitro una primera etapa de proliferació activa fins que, un augment en l'inhibidor de les Cdks, p16INK4a, les condueix a un estat de senescència. En aquest punt, els cromosomes de les cèl·lules ja han patit un escurçament telomèric. Tanmateix, és agreujat quan, de manera espontània, algunes cèl·lules hipermetilen el promotor del gen p16INK4a evitant-ne la seva transcripció. El silenciament espontani del gen p16INK4a també s'ha observat en un 40% de les mostres de teixit mamari histològicament normal de dones sense càncer de mama ni predisposició a patir-lo (Brenner

et al., 1998; Holst et al., 2003). Les cèl·lules epitelials mamàries, mitjançant aquest silenciament, surten de l'estat de senescència induïda per estrès amb una probabilitat molt més elevada que si les comparem amb els fibroblast humans (1025 vs 1029) (Romanov et al., 2001).

Davant la pèrdua de p16<sup>INK4a</sup>, el cicle no s'atura i les cèl·lules continuen proliferant i escurçant encara més els seus telòmers (**Figura 21**). Quan això passa diem que les cèl·lules estan en una fase de post-selecció, durant la qual hi ha un increment progressiu del nombre d'extrems cromosòmics desprotegits capaços d'incrementar la radiosensibilitat de les cèl·lules. Disposar de cèl·lules epitelials mamàries humanes ens permet treballar amb un model molt adequat per avaluar tant l'efecte de les baixes dosis de radiació com l'efecte modulador de l'edat. És important escollir models cel·lulars rellevants en carcinogènesi humana quan es fan estudis experimentals sobre l'efecte de les mamografies per respondre algunes de les qüestions que queden sense resoldre dels estudis a nivell epidemiològic. El model de les cèl·lules epitelials mamàries ens permet treballar amb dosis equivalents a les que rep la superfície de la mama quan es fan mamografies en programes de cribratge i estudiar l'efecte modulador de l'envelliment cel·lular sobre la radiosensibilitat d'aquestes, una qüestió rellevant si tenim en compte que els programes de cribratge es practiquen en dones entre 50 i 70 anys.

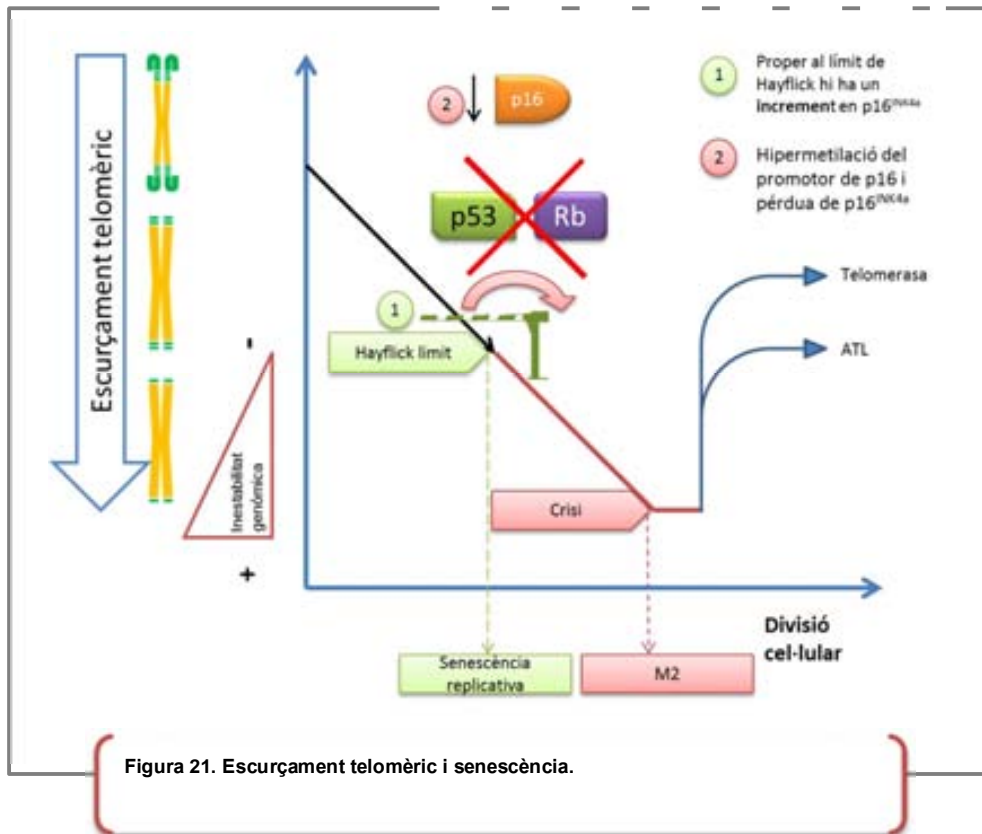


Figura 21. Escarçament telomèric i senescència.



## Objectius

---

Per prendre decisions a nivell de radioprotecció cal tenir en compte tots els factors que puguin influir en la radiosensibilitat cel·lular, tot omplint el buit d'informació que deixen els estudis epidemiològics respecte els efectes de les baixes dosis de radiació. En base a aquestes consideracions, l'objectiu principal de la present tesi doctoral és l'estudi de l'efecte de les baixes dosis de radiació, concretament de les exploracions mamogràfiques, en cèl·lules epitelials humanes de glàndula mamària normal, tot determinant la rellevància de l'envelliment en aquest efecte. Per tal d'esbrinar-ho, s'han fixat els següents objectius secundaris:

- Esbrinar si l'exposició de HMECs a una exploració mamogràfica provoca un augment en el nombre de DSBs.
- Estudiar si les HMECs irradiades són capaces de respondre i reparar amb eficiència les lesions causades.
- Determinar l'existència de diferències en la resposta al dany induït per radiació en cèl·lules epitelials mamaris joves i velles de diferents línies cel·lulars i si, a conseqüència d'això, s'observen diferències en el dany que finalment queda fixat a les cèl·lules exposades a baixes dosis de raigs X.
- Desenvolupar un sistema de recompte automàtic de foci d'histona que permeti aprofundir en la detecció de diferències de radiosensibilitat interindividuals.





# Resultats

*El primer pas és assumir el dret a equivocar-nos, a saber fer de l'error un punt de partida cap a un nou aprenentatge.*





# Increased Mammogram-Induced DNA Damage in Mammary Epithelial Cells Aged *In Vitro*

Laia Hernández, Mariona Terradas, Marta Martín, Purificación Feijoo, David Soler, Laura Tusell, Anna Genescà\*

Department of Cell Biology, Physiology, and Immunology, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra, Spain

## Abstract

Concerned about the risks of mammography screening in the adult population, we analyzed the ability of human mammary epithelial cells to cope with mammogram-induced DNA damage. Our study shows that an X-ray dose of 20 mGy, which is the standard dose received by the breast surface per two-view mammogram X-ray exploration, induces increased frequencies of DNA double-strand breaks to *in vitro* aged—but not to young—human mammary epithelial cells. We provide evidence that aged epithelial breast cells are more radiosensitive than younger ones. Our studies point to an inefficient damage response of aged cells to low-dose radiation, this being due to both delayed and incomplete mobilization of repair proteins to DNA strand breaks. This inefficient damage response is translated into an important delay in double-strand break disappearance and consequent accumulation of unrepaired DNA breaks. The result of this is a significant increase in micronuclei frequency in the *in vitro* aged mammary epithelial cells exposed to doses equivalent to a single mammogram X-ray exploration. Since our experiments were carried out in primary epithelial cell cultures in which cells age at the same time as they undergo replication-dependent telomere shortening, we needed to determine the contribution of these two factors to their phenotype. In this paper, we report that the exogenous expression of human telomerase retrotranscriptase in late population doubling epithelial cells does not rescue its delayed repair phenotype. Therefore, retarded DNA break repair is a direct consequence of cellular aging itself, rather than a consequence of the presence of dysfunctional telomeres. Our findings of long-lasting double strand breaks and incomplete DNA break repair in the *in vitro* aged epithelial cells are in line with the increased carcinogenic risks of radiation exposures at older ages revealed by epidemiologic studies.

**Citation:** Hernández L, Terradas M, Martín M, Feijoo P, Soler D, et al. (2013) Increased Mammogram-Induced DNA Damage in Mammary Epithelial Cells Aged *In Vitro*. PLoS ONE 8(5): e63052. doi:10.1371/journal.pone.0063052

**Editor:** Michel M. Ouellette, University of Nebraska Medical Center, United States of America

**Received:** October 22, 2012; **Accepted:** March 27, 2013; **Published:** May 7, 2013

**Copyright:** © 2013 Hernández et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Funding:** This work was funded by grants from Consejo de Seguridad Nuclear (CSN 2012-0001) and EURATOM (Dark.Risk GA 323216). AG laboratory is supported by Instituto de Salud Carlos III (RD06/0020/1020) and Generalitat de Catalunya (2009SGR-282). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

**Competing Interests:** The authors have declared that no competing interests exist.

\* E-mail: anna.genescà@uab.es

## Introduction

Breast cancer mortality is declining in many western countries. Both the improved effectiveness of treatment and mammography-screening programs, which involve women aged 50–70 years in most western countries, have contributed to decreasing this rate. However, like almost all medical procedures, regular screening mammography in woman brings benefits as well as risks. In all European countries, the breast cancer rate has increased in parallel with the dissemination of mammographies, without significantly reducing the incidence of aggressively growing tumors [1,2]. Therefore, one concern surrounding mammography screening is the possibility that the radiation received from the regular screening of mammograms may ultimately induce cancer.

Epidemiological studies provide evidence of increased breast cancer risks in populations exposed to low or moderate radiation doses for medical reasons. Elevated breast cancer risks have been reported in women who received repeated fluoroscopic examinations for tuberculosis [3] or for a population that had undergone frequent X-ray examinations for spinal curvature [4]. Furthermore, elevated breast cancer risk has been reported amongst women who had multiple chest X-rays or mammograms 5 years or more before diagnosis [5]. However, due to the limited sensitivity

of epidemiological studies, current mammogram-risk figures derive from epidemiological datasets with populations exposed to higher radiation doses. This extrapolation from high-to-low radiation doses is based on the unproven assumption that the extent of damage to a cell genome is proportionate to the radiation dose received, even when the dose is very low. However, some authors claim that, after low-dose radiation exposures such as mammogram X-ray doses, cells cannot efficiently respond to DNA lesions (reviewed in [6]). The concept of threshold for repair triggering gained support from the observation that fibroblasts fail to repair DSBs when they contain less than one DSB for each 20 cells [7] and also that radiation doses inducing less than ~20 DSBs (<0.4 Gy) fail to initiate the G2/M checkpoint [8].

Adding yet more complexity to this scenario, epidemiological studies have shown that there are important age-related differences in sensitivity to ionizing radiation in the human population, children and older people being the most sensitive. In Hiroshima and Nagasaki bomb survivor cohorts, radiation-induced cancer risks decrease with increasing age at exposure only until exposure ages of 30–40 years; at older ages, this risk increases for many individual cancer sites, as well as for all solid cancers combined [9]. Similar epidemiological evidence has been obtained for adult

exposures to low-dose radiation. Studies of nuclear-plant workers have provided evidence for a positive association between age at exposure and carcinogenic risk of radiation as they reveal a stronger dose-effect relationship for doses received at older ages [10–13]. All these observations raise the question of whether low-dose mammogram X-ray exposures could induce increased DNA damage in aged breast cells. We considered the possibility that the accumulation of dysfunctional telomeres in aged cells or a progressive impairment of responses triggered by cells when faced to DNA lesions (so called DNA damage response, DDR) could contribute to increasing the risk of radiation exposures in the elderly. Telomere erosion enhances high-dose radiation sensitivity because uncapped chromosomes can interfere with the correct repair of radiation-induced double strand breaks (DSBs) [14]. Additionally, it should be taken into account that impairment of cell cycle control and DNA repair mechanisms have been reported in aged fibroblasts and lymphocytes [15–17]. In order to avoid the uncertainty that can arise when carcinogenic risks are extrapolated from one cell type to another, it is important to investigate the molecular basis underlying age-dependent variations in the carcinogenic risks of radiation directly in epithelial cells, from which most breast cancers originate.

To gain insight into the carcinogenic risks of mammogram screening and the modulation of such risks through cell aging, we used epithelial cells derived from normal human mammary specimens that were then irradiated under a mammogram device. We examined the formation of  $\gamma$ H2AX foci to estimate DSB induction and disappearance over time after radiation exposure in proliferating (non-senescent) *in vitro* aged versus young mammary epithelial cells. In order to approach mechanistic clues underlying the observed differences, we examined DNA break disappearance after restoring telomerase activity, as well as recruitment of 53BP1—an important cell cycle and repair factor—to sites of lesions. Of relevance, our analyses show an increased induction of DSBs after X-ray doses equivalent to those received during mammogram explorations and a diminished capacity of *in vitro* aged epithelial breast cells to cope with DNA damage, a scenario that is not reversed by telomerase reactivation.

## Results

### A Single Mammogram X-ray Exploration Induces Increased Frequencies of DSBs to *in vitro* Aged—but not to Young—human Mammary Epithelial Cells

Women aged 50–70 years included in most national breast-screening programs receive a two-view exposure (oblique and craniocaudal) every 1, 2 or 3 years. The mean glandular dose in the general population (per two-view screening examination) is 4.5 mGy and the standard entrance skin dose is 20 mGy. Epidemiological studies are not sensitive enough to detect risks below 50 mGy [18] making it necessary to carry out an experimental risk assessment to overcome this limit. Consequently, we initially reflected on whether mammogram X-ray explorations produced a detectable increase of DSBs in the cells derived from mammary gland. We also considered whether there were differences between early and late population doubling (PD) cell samples. Our analysis focused on this type of DNA lesion because it plays a crucial role in human carcinogenesis. In order to minimize the impact of senescent cells, which have already triggered a mechanism that stops incipient cancer cells from proliferating, we used early and late PD HMEC samples containing fewer than 10% senescent cells in all experiments—as demonstrated by a  $\beta$ -galactosidase assay.

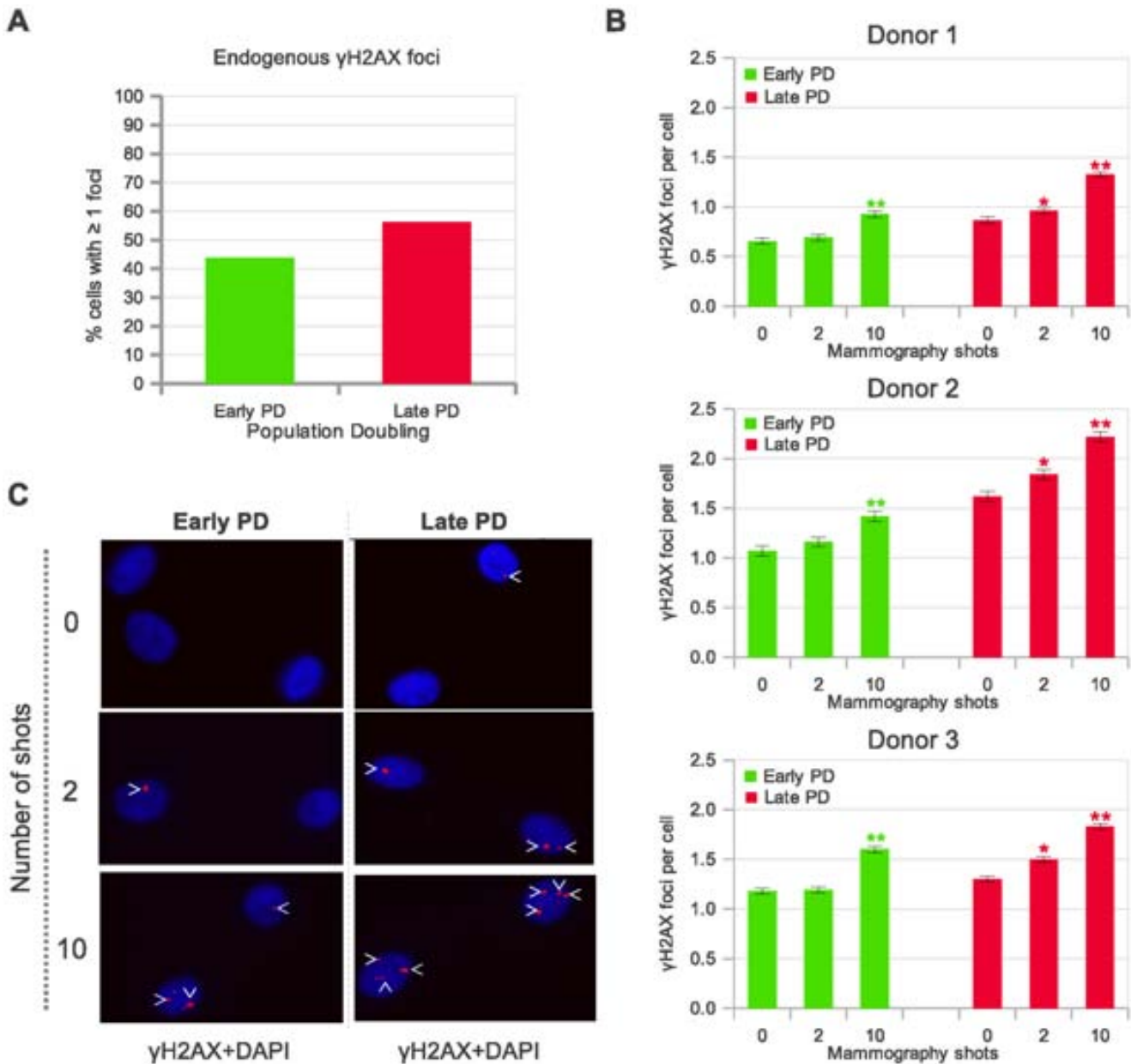
First, we used  $\gamma$ H2AX (protein immunofluorescence) detection to identify and quantify basal levels of DSBs in epithelial mammary cells derived from three different healthy donors. The nucleosomal histone H2AX is phosphorylated on its Ser139 in large segments of DSB-flanking chromatin, which are visible by epifluorescent microscopy as nuclear foci [19,20]. We observed that the proportion of cells containing endogenous  $\gamma$ H2AX foci was higher in the *in vitro* aged cell subpopulations (Figure 1A shows results obtained in HMECs derived from donor 1; *chi*-squared test,  $p < 0.0001$ ). The higher levels of endogenous damage in late PD cells in comparison to their early counterparts may be revealing age-associated accumulation of irreparable DSBs [17,21] and/or critical telomere erosion [22].

In order to assess DSB induction by mammography screening, early and late PD HMEC samples from three different donors were irradiated with 2 and 10 automatic-shot X-rays under a mammogram device (10 mGy per shot; doses equivalent to 1 and 5 two-view screens, respectively). The time interval between shots was under 30 seconds. To avoid observer bias, scoring of  $\gamma$ H2AX foci was performed blindly on coded slides. The analyses were carried out 120 min after radiation exposure. We selected this timing because it was reported as optimal for obtaining a maximum  $\gamma$ H2AX foci scoring in most cell types [23]. If the early and late PD HMECs had had the same radiation sensitivity, we should have found similar increases in the frequencies of DSBs after mammogram X-ray exposure. Instead, we found that there was a more pronounced increase between shamirradiated and 10 shot in late PD cells than in early PD cells in each of the three donor samples analysed (Figure 1B and 1C). Most importantly, only 2 shots were sufficient to show a statistically significant increased amount of damage in the *in vitro* aged cells, but not in the young counterparts (Mann Whitney test,  $p < 0.05$  each sample).

### Mammogram-induced DSBs in Late PD Cells Remain Unrepaired for Longer Times, thus Promoting Illegitimate End Joining

In order to broaden our understanding of the age cell-dependence of low-dose radiation sensitivity, we carried out a time-course experiment to score the number of  $\gamma$ H2AX foci at 6 different times post-IR in early and late PD HMECs. It is accepted that rapid loss of  $\gamma$ H2AX is contingent upon functional and efficient DSB repair [20]. The results of  $\gamma$ H2AX foci dynamics after 10 automatic-shot X-rays under a mammogram device are shown in Figure 2A. It can be deduced from these experiments that the disappearance of  $\gamma$ H2AX foci is strongly dependent on the cell's PD. Early PD HMECs have a maximum peak of  $\gamma$ H2AX foci 90 min post-irradiation, with the number of foci decreasing significantly thereafter. In contrast, the mean number of  $\gamma$ H2AX foci in late PD increases throughout the whole experiment (4 hours), suggesting that DSBs remain unrepaired for a more prolonged time in the *in vitro* aged mammary epithelial cells than in their young counterparts.

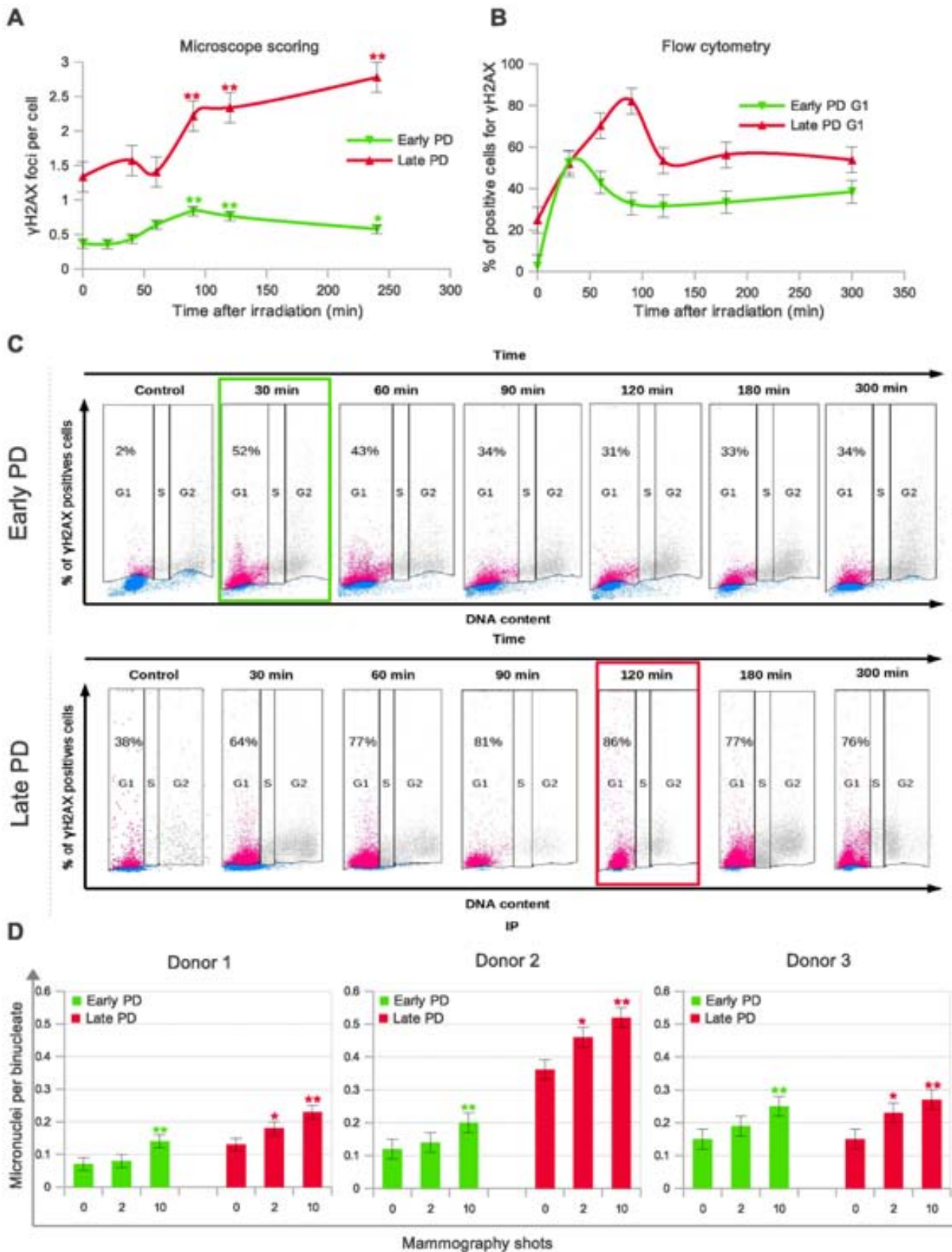
Direct microscopic visualization of  $\gamma$ H2AX is probably the most specific and sensitive technique for spotting DSBs in cells and for monitoring their repair. However, as it is highly time-consuming, the number of cells analyzed for each time-point is limited. Therefore, we also analyzed the kinetics of damage removal by flow cytometry. To increase the sensitivity of this assay, we irradiated the cells with 1 Gy  $\gamma$ -rays. We combined a fluorescently labeled antibody against  $\gamma$ H2AX and DNA staining with propidium iodide (PI), since it is known that the frequency of  $\gamma$ H2AX positive cells varies according to the phase of the cell cycle [23]. Through this assay, we were able to measure changes in the level of the phospho-histone in relation to the cell-cycle position in



**Figure 1. Detection of phosphorylated histone ( $\gamma$ H2AX) foci in human mammary epithelial cells (HMECs) to estimate DNA damage.** **A.** Endogenous  $\gamma$ H2AX foci: the proportion of cells containing  $\geq 1$  foci in late PD cells is significantly higher than in early PD cells ( $p < 0.0001$ , Chi-squared test). The foci were counted in 1000 cells per sample. **B.** Mean incidence of  $\gamma$ H2AX foci per cell 2 h after mammogram X-ray exposures is greater in the late PD HMECs in each of the three donors analyzed. The foci were counted in 2000 cells (donor 1) and 1000 cells (donor 2 and 3) per group. Error bars signify standard error. Asterisk denotes statistically significant difference in a group of irradiated HMECs compared to the shamirradiated controls of each cell subpopulation (Mann Whitney test). Simple asterisk (\*) refers to statistically significant difference  $p < 0.01$  and double asterisk (\*\*) refers to highly significant difference  $p < 0.0001$ . **C.** Representative images of  $\gamma$ H2AX foci in HMECs from early and late PD exposed to 0, 2 and 10 automatic X-ray shots under a mammogram device (2 hours post-irradiation). Arrowheads point to the  $\gamma$ H2AX foci stained in red. *In vitro* aged populations exhibited a higher number of  $\gamma$ H2AX foci compared to the young counterparts. doi:10.1371/journal.pone.0063052.g001

individual cells within each subpopulation. Flow cytometric analysis of  $\gamma$ H2AX labeling in G1-phase cells was more sensitive than in other cell cycle phases because background staining is lower. Analysis of the kinetics of  $\gamma$ H2AX appearance and disappearance in G1 HMECs by flow cytometry confirmed the results obtained through microscope analysis. Figure 2B shows the average percentage of  $\gamma$ H2AX positive G1 cells, which reached a maximum at 30 minutes after irradiation in early PD HMECs, whereas *in vitro* aged HMECs do not reach maximum until 90 min

post-irradiation. After these time-points a decrease in  $\gamma$ H2AX labeling was observed in all samples, but was far more moderated in the *in vitro* aged cell samples. Figure 2C, shows a representative example of the dot-plots obtained for early and late PD HMECs in one of the experiments. DSBs that remain open for longer can potentially promote cytogenetic damage. In agreement with this possibility, a significant increase in micronucleus frequency in binucleated HMECs from three different donors was observed in late PD –but not in their early counterparts– after only two shot



**Figure 2. DNA double strand breaks (DSBs) measured by detection of  $\gamma$ H2AX induction in late PD HMECs by mammogram X-rays last longer than in early PD HMECs.** A. Time-dependence of  $\gamma$ H2AX foci formation and disappearance measured by direct microscopic visualization. The foci were counted in 1000 cells per each time and cell subpopulation group. Error bars signify standard error. Simple asterisk (\*)

refers to statistically significant difference  $p < 0.05$  and double asterisk (\*\*) refers to highly significant difference  $p < 0.0001$ . Mann Whitney test was performed in all samples. **B.** Time-dependent flow cytometric bivariate detection of propidium iodide (PI) and  $\gamma$ H2AX. Histogram showing the kinetics of  $\gamma$ H2AX appearance and disappearance measured by flow cytometry. For early PD HMECs (green), the maximum percentage of  $\gamma$ H2AX positive G1-stage cells was reached at 30 minutes after irradiation, whereas *in vitro* aged HMECs (red) do not reach maximum until 90 min time-point. A minimum of 10,000 cells and two replicas were analyzed by bivariate flow cytometry for each time-point and cell subpopulation. **C.** Representative dot-plots illustrate that  $\gamma$ H2AX labeling lasts longer in the *in vitro* aged epithelial cells (red dots indicate positive and blue negative  $\gamma$ H2AX labeled cells). Cell cycle is displayed using contour plots and  $\gamma$ H2AX labeling using pseudo-color plots. Gating set at 3% increment over unspecific background fluorescence for both control and irradiated HMECs. Percentages of positive  $\gamma$ H2AX cells at the G1 cell cycle stage are indicated in each dot-plot. For cytometric analysis, early and late PD HMECs were irradiated with 1Gy  $\gamma$ -rays. **D.** Mean incidence of micronuclei per cell in early and late PD HMECs derived from three different donors and exposed to 0, 2 and 10 automatic X-ray shots under a mammogram device (24 h after irradiation). The micronuclei were counted in 2000 (donor 1) and 500 (donor 2 and 3) binucleates per group. Error bars signify standard error. Asterisk denotes statistically significant difference in a group of irradiated HMECs compared to the shamirradiated controls of each cell subpopulation (Mann Whitney test). Simple asterisk (\*) refers to statistically significant difference  $p < 0.05$  and double asterisk (\*\*) refers to highly significant difference  $p < 0.0001$ . doi:10.1371/journal.pone.0063052.g002

mammogram X-rays (Figure 2D,  $p < 0.05$  for each donor sample; test Mann-Whitney). This higher frequency of micronuclei in the late PD cell samples is probably a consequence of illegitimate rejoining promoted by long lasting DSBs that accumulate in cells. A similar situation has been reported in repair deficient cell models [24]. In summary, DNA breaks remain unrepaired for longer in the *in vitro* aged cell samples, resulting in increased cytogenetic damage after exposure doses equivalent to a single mammogram exploration.

#### Delayed Disappearance of DSBs in Late PD Samples is Directly Linked to Cell Aging rather than to the Dysfunctional Telomeres Present in Aged Cells

The presence of dysfunctional telomeres in aged proliferative cells is associated with increased radiosensitivity as they interfere with the correct joining of DNA strand breaks [14]. We therefore speculated on whether the observed delay in DSB disappearance in the late PD cell samples was caused by the presence of dysfunctional telomeres or, instead, whether it was a direct consequence of cell aging. For this purpose, we investigated whether DSB repair kinetics—as measured by  $\gamma$ H2AX and PI bivariate flow cytometry—was influenced by the restoration of telomerase through transduction of *hTERT* gene in late PD HMECs derived from donor 1 (Figure 3A). To ensure we had transduced the cells properly, instead of measuring the average telomere lengthening, we scored the frequency of chromosome ends without visible telomere signals (probably uncapped ends). We observed a significant reduction in the frequency of chromosome ends with no visible telomeric signal after transduction of cells with *hTERT* (Figure 3B and 3C). Regardless of having been transduced (or not) with *hTERT*, all late PD HMECs reached the maximum percentage of  $\gamma$ H2AX positive G1-stage cells with delay, at 90 minutes after irradiation (Figure 3D). Taken as a whole, this would suggest that rather than a consequence of the presence of dysfunctional telomeres, the delayed disappearance of DSBs in the *in vitro* aged samples is directly associated with chronological cell aging.

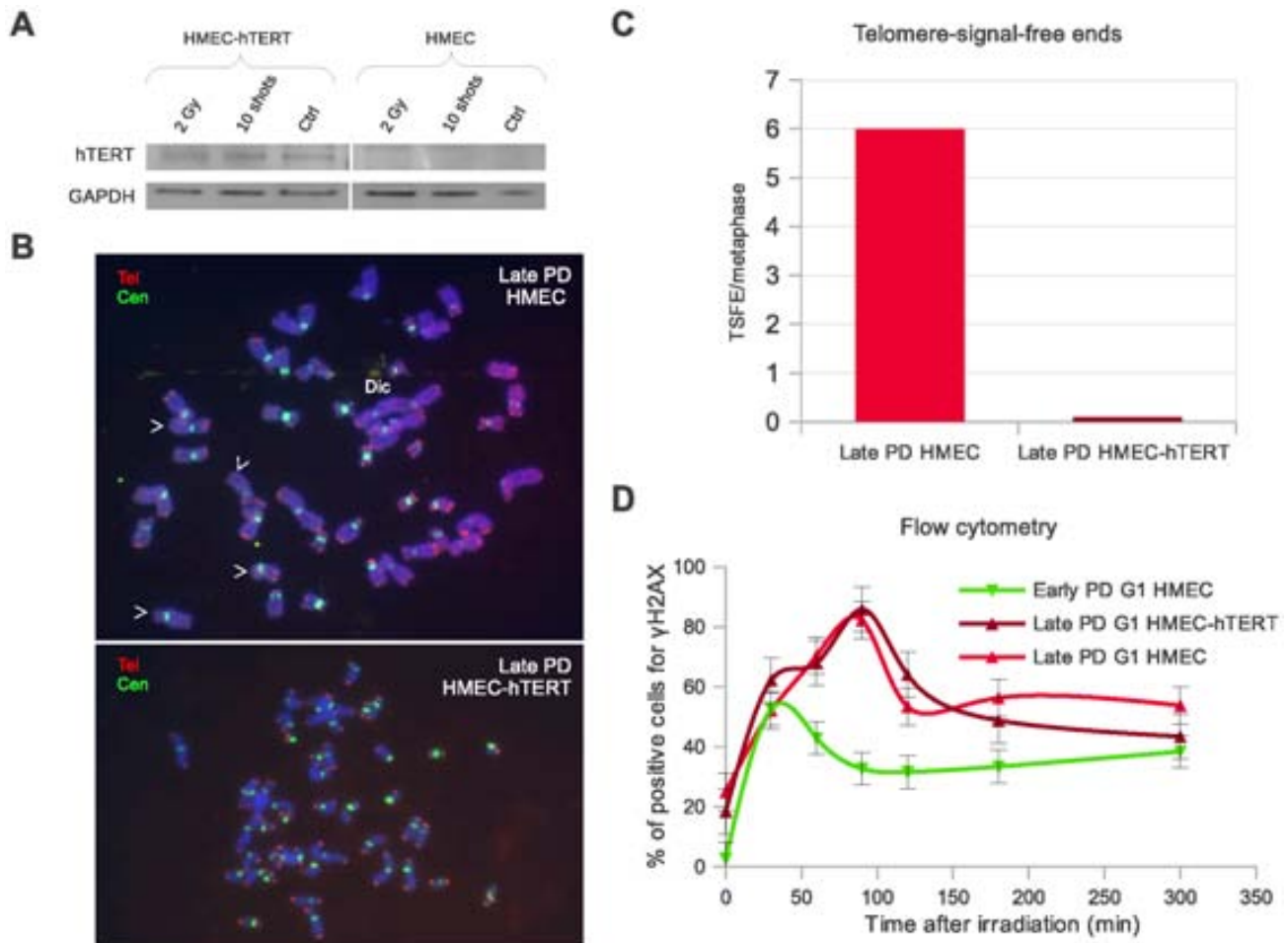
#### Deficient Response of Aged Mammary Epithelial Cells to Mammogram-induced DNA Damage

To approach mechanistic clues underlying the observed radiation sensitivity of late PD epithelial mammary cells, we investigated their capacity to trigger an effective response when exposed to low doses of X-ray. The reduced amount of DSBs induced by mammograms may pose a serious threat to genome integrity if they are not sufficient to trigger DDR. We were therefore led to enquire whether mammary epithelial cells do indeed respond to the low number of DSBs induced by mammogram X-ray exposures, and whether early and late PD cells do this with the same efficacy. To answer these questions, we

blindly analyzed the formation of 53BP1 foci, a protein that participates in the activation of factors involved in cell-cycle control and DNA repair if recruited at break sites [25]. In the early PD HMECs irradiated under the mammogram device (0, 1 and 10 shots), enumeration of 53BP1 discrete foci revealed a significantly increase with respect to the basal levels after 10 automatic shots (Mann Whitney  $< 0.001$ ; Figure 4A). This increase is in line with the observed increase of  $\gamma$ H2AX foci (Figure 1B) thus providing evidence of an effective response despite the small number of DSBs induced. In contrast to the early passage cell samples, the previously observed increase in the number of  $\gamma$ H2AX foci after two X-ray shots (Figure 1B) did not entail a significant increase of 53BP1 foci in late passage HMECs (Mann Whitney  $p > 0.05$ ; Figure 4A).

The results obtained by 53BP1 foci scoring may indicate that late PD cells require a higher number of lesions to trigger DDR or, alternatively, that the response exists but is delayed. To address this question, we needed to investigate the kinetics of DSB response. We irradiated early and late passage HMECs from donor 1 with 10-shot mammogram exposures, and quantified 53BP1 foci at five different time-points after irradiation and in the shamirradiated control (Figure 4B). The results of our time-course experiment indicate that early PD cells are able to recruit 53BP1 at the damage site faster than their late PD counterparts. The first time-point showing an increase in 53BP1 recruitment to the sites of damage was 20 min in early passage cells and 120 min after irradiation in late passage cells (Figure 4B; Mann Whitney test,  $p < 0.001$ ). The maximum frequency of 53BP1 foci in the late PD HMECs was 100 min delayed, which points to inefficient DDR protein recruitment in the *in vitro* aged epithelial cells.

In order to fully determine that DDR efficiency decreases with cell aging, a time-course experiment for measuring co-localization of  $\gamma$ H2AX and 53BP1 foci after 1Gy X-rays was performed. The results of the time-course experiment are summarized in Figure 4C and are illustrated in Figure 4D. Complete colocalization between  $\gamma$ H2AX and 53BP1 endogenous foci was observed in almost 100% of cells in both shamirradiated subpopulations. In contrast, statistically significant differences between early and late PD samples were observed in every time-point after irradiation ( $p < 0.0001$  for each time-point analyzed; *Chi-square* test). Barely 10 min after irradiation, 50% of early PD cells showed full colocalization of  $\gamma$ H2AX and 53BP1 signals whilst less than 20% of late PD HMECs accomplished this. The percentage of cells having full colocalization increased over time in both cell samples; importantly, however, nearly 100% of the early PD samples achieved full colocalization 2 h after damage infliction, whereas this remained under 50% in late PD samples. Recruitment of 53BP1 into the damage sites is therefore not only delayed but is also incomplete in late PD samples. The inability of the *in vitro* aged HMECs to recruit repair factors in an efficient and complete



**Figure 3. Restoration of telomerase activity in the late PD HMEC samples does not rescue their delayed DSB disappearance phenotype.** Results obtained from donor 1 samples. **A.** Western blot showing that transduction of late PD HMECs with *hTERT* gene restituted telomerase protein subunit expression. **B.** Metaphase plates of a late PD non-transduced (top) and *hTERT*-transduced (bottom) HMECs. Telomeric (red) and centromeric (green) sequences detected with fluorescent *in situ* hybridization procedures. Telomerase restoration resulted in a reduction of telomere-signal-free ends (white arrow heads) and end-to-end fusions (Dic) as a consequence of telomere elongation. **C.** Bar diagram showing average frequencies of telomere-signal-free ends in non-transduced and *hTERT*-transduced HMECs. **D.** Histogram showing the kinetics of  $\gamma$ H2AX appearance and disappearance measured by flow cytometric analysis. *hTERT*-transduced late PD HMECs (brown) reach its maximum percentage of  $\gamma$ H2AX positive cells 90 min post-irradiation, which is delayed as compared to the early PD HMECs (green), but is the same time point as non-transduced late PD HMECs (red). A minimum of 10,000 cells and two replicas were analyzed by bivariate flow cytometry for each time-point and cell subpopulation.

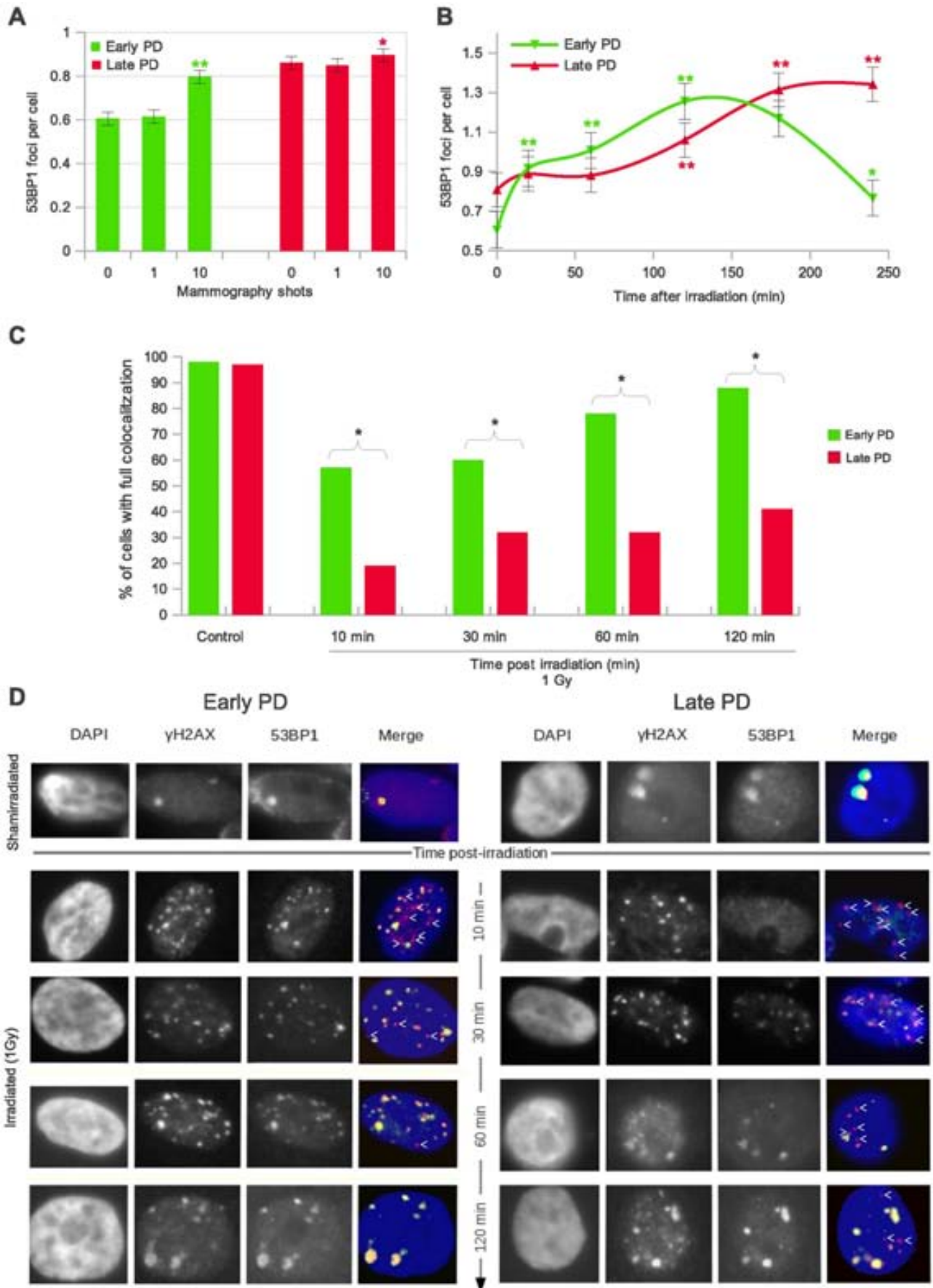
doi:10.1371/journal.pone.0063052.g003

way may—jointly with the presence of dysfunctional telomeres that promote the illegal break-repair— lead to a greater radiosensitivity of proliferating aged cells.

## Discussion

The study of low-dose responses in cell models relevant to human cancer is essential to a better understanding of the potential risks of medical irradiation procedures. Concerned about the risks of mammography screening in the adult population, we analyzed the ability of *in vitro* aged human mammary epithelial cells to cope with mammogram-induced DNA damage. Our study clearly shows that late passage mammary epithelial cells exposed to mammogram X-ray doses have a diminished capacity to cope with DNA damage, which is translated into an increased persistence of open DSBs, which finally promotes unfaithful repair and micronucleus formation.

The blind direct microscope enumeration of  $\gamma$ H2AX foci in individual cells evidenced that X-ray doses equivalent to discrete mammogram explorations induce a significant increase of DSBs in mammary epithelial cells. Our data fits well with the sensitivity of the  $\gamma$ H2AX foci assay, which is capable of detecting radiation doses down to a few mGy [7]. But, most importantly, we are reporting here that X-ray doses equivalent to a single mammogram exploration induced increased amounts of DSBs in the *in vitro* aged epithelial cells, but not in their young counterparts. Sedelnikova et al [17] did not observe any difference in  $\gamma$ H2AX foci level with regard to donor age or cell-PD after a single acute dose of 600 mGy in peripheral lymphocyte and fibroblast samples. The observed difference between the two studies highlights the importance of the observation time-point election when caused damage is estimated from the analysis of protein foci having a marked dynamics of appearance and disappearance. We evaluated the mammography effects 2 h post irradiation, whereas Selenikova's studies were performed only 30 minutes post-irradiation; this



**Figure 4. Mammogram-induced DNA damage response in early and late PD HMECs. A.** Mean incidence of 53BP1 foci per cell 120 min after mammogram X-ray exposures: weakened low-dose radiation response of late PD HMECs. The foci were counted in 2000 cells per group (donor 1). Error bars signify standard error. Asterisk denotes statistically significant difference in a group of irradiated HMECs compared to the shamirradiated controls of each subpopulation. **B.** Diagram showing the kinetics of 53BP1 foci formation. Late PD HMECs show a 100-minute delay in their peak of 53BP1 foci per cell as compared to early PD HMECs. The 53BP1 foci for kinetics analyses were counted in 1000 cells per time-point and cell subpopulation (donor 1). Cells were exposed to 10 automatic X-ray shots under a mammogram device. **A & B.** Error bars signify standard error. Simple asterisk (\*) refers to statistically significant difference  $p < 0.05$  and double asterisk (\*\*) refers to highly significant difference  $p < 0.0001$ . Mann Whitney test was performed in all samples. **C.** Histogram showing the fraction of cells with full colocalization of  $\gamma$ H2AX and 53BP1 for both early and late PD in time (donor 1). Late PD samples do not reach full colocalization even after 2 h post-irradiation, revealing a slower mobilization of repair proteins to the damaged site than early PD HMECs. **D.** Representative images of early and late PD HMECs immunostained for  $\gamma$ H2AX and 53BP1 at various times post-IR. Cells were irradiated with 1Gy of  $\gamma$ -rays. Red ( $\gamma$ H2AX) and green (53BP1) fluorochromes appear yellow where they coincide in the merged images. Post-IR mobilization of 53BP1 to the  $\gamma$ H2AX nuclear foci follows different kinetics in early and late PD HMECs.

doi:10.1371/journal.pone.0063052.g004

probably does not leave enough time for the age-related differences to show up. Moreover, uncertainty can arise when age-dependent carcinogenic risks are extrapolated from one cell type to another because, although DDR pathways are common to all higher eukaryotic cell types, they may not be equally efficient. Epithelial cells emerge from stress-induced senescence with dramatically higher probability than fibroblasts ( $10^{-5}$  vs  $10^{-9}$ ) [26], thus potentially leading to higher risks of transformation. The study of the low-dose responses in epithelial cells is essential to a better understanding of potential carcinogenic risks. Our direct study using HMECs irradiated under a mammogram device revealed aging to be a key factor in the ability of cells to cope with mammogram-induced damage.

Comprehending the limitations of the DDR mechanisms and their impairment with cell aging is essential to optimize cancer-avoidance strategies. Here, we show that *in vitro* aged epithelial mammary cells are not as efficient as their young counterparts in recruiting 53BP1 after low-dose radiation exposure. Rather than a minimum level of DNA damage required to trigger an efficient response, the results of our time-course experiment of 53BP1 foci formation favor an explanation based on a delayed mobilization of DDR proteins in the late PD cell samples. An additional manifestation of the inefficient damage response of the *in vitro* aged epithelial cells is that a significant proportion of radiation-induced DSBs finally fails to recruit 53BP1. Altogether these results point to an inefficient damage response in the *in vitro* aged epithelial cells to low-dose radiation, which is due both to the delayed and incomplete mobilization of repair proteins to DSB sites. It is important to note that the age-related DDR efficacy decline observed in the present study occurs before the mammary epithelial cells enter senescent growth arrest. Therefore, this goes further than the well-defined deterioration in the homeostasis and functions of tissues associated with cellular senescence [27,28], such as the delayed kinetics of DSB processing reported in senescing fibroblasts and peripheral blood lymphocytes [17]. Consistent with our results, Mao et al [29] recently showed that homologous recombination-mediated DSB repair declines sharply with increasing replicative age in proliferating fibroblasts. What causes *in vitro* aged cells to respond inefficiently to chromosome breaks? The most likely scenario is that chromatin or nuclear envelope changes could influence the mobilization of proteins involved in the DDR [30]. Age is associated with an overall increase in heterochromatin domains in murine and primate tissues [31] and with a deterioration of nuclear pore complexes [32]. All these age-associated changes might hinder mobilization of repair proteins to DNA lesions [33,34] and compromise the exquisitely regulated DDR pathways.

In order to understand the transcendence of inefficient DSB processing, we have taken an additional step. The enumeration of  $\gamma$ H2AX foci and the flow cytometric analysis of histone labeling at different times after low-dose X-ray exposure reveals that the

inefficient damage response of *in vitro* aged mammary epithelial cells leads to delayed DSB disappearance. Retarded DSB repair is a direct consequence of cell aging rather than a consequence of the presence of dysfunctional telomeres, because, as shown here, telomerase reactivation does not rescue this deficient phenotype. Therefore, despite telomere erosion being an important factor for radiation sensitivity, cell aging *per se* also contributes to this. In late-passage epithelial mammary cells with slow response to DSB, many broken ends remain as repair substrates close in space and time. Although the repair pathways might subsequently process them, this delay would dramatically increase the probability of misrepair [24,35]. Not surprisingly, an increase in the frequency of micronuclei is observed in the *in vitro* aged epithelial cells exposed to an X-ray dose equivalent to a single mammogram exploration (two view screens). Hence DSBs that have not been quickly detected by the DDR machinery and efficiently repaired will pose a higher risk for causing genomic rearrangements and chromosome instability. These results are consistent with recent IRCP published data that classifies breast tissue as amongst those that are most sensitive to radiation. Our findings of long-lasting and incomplete DSB repair in late passage human mammary epithelial cells constitutes a proof of their increased radiation sensitivity and might be related to increased carcinogenic risks of radiation exposures at older ages [9]. In the specific case of breast cancer, which has already been described as strongly dependent on hormonal and extracellular signals, age should be considered as an additional factor to be taken in account to properly evaluate the carcinogenic risks of radiation.

## Materials and Methods

### Cell Culture

Primary non-transformed human mammary epithelial cells (HMEC) derived from normal breast tissue of three Caucasian women age 28, 50 and 58; cells purchased from Gibco (donor 3), Cambrex Bio Science Walkersville (donor 1) and Cambrex Biowhitacker (donor 2), respectively. The cells were seeded into T 25 flask/chamberslides/plates depending on the experiment and were grown in serum-free MepiCGS (ScienCell, research laboratories) supplemented with penicillin and streptomycin at 37°C and 5% CO<sub>2</sub>. The number of accumulated population doublings (PD) achieved by the culture at each passage was determined using the equation  $PD = PD_{initial} + \log(N/N_0)$ , where N stands for the initial number of harvested cells, and N<sub>0</sub> for the number of cells plated. Confluent cultures of early PD HMEC (PD 25–29 for donor 1, PD 27 for donor 2 and PD 24 for donor 3 HMECs) and late PD HMEC (PD 33–38, for donor 1, PD 38–40 for donor 2 and PD 32–34 for donor 3 HMECs) were used in experiments. A  $\beta$ -galactosidase assay was performed in order to score the fraction of senescent cells in each experiment. Less than



10% of early and late PD HMECs were senescent in all the experiments performed.

### Irradiation

HMEC cells were irradiated with one, two and ten automatic shots X-rays under a mammogram X-ray diagnostic device (SENO DMR plus, General electric). Each shot was equivalent to 10 mGy at skin surface (measured with an R-100 detector) and 2.7 mGy glandular dose. The X-ray molybdenum-anode tube voltage was 28 keV and a dose rate of 0.67 Gy/min was used. HMECs were exposed in a chamber slide support, placed on top of several methacrylate plates to emulate the average height of breast under compression. For  $\gamma$ H2AX and 53BP1 proteins colocalization experiments, HMEC were irradiated at 1 Gy by exposing them to  $^{137}\text{Cs}$   $\gamma$ -rays at a dose rate of 5.45 Gy/min using an IBL 437C source.

### Immunostaining

HMECs seed in chamber slides were grown until 70% confluence was reached. Fixation was carried out with paraformaldehyd 4% for 10 minutes. Cells were then permeabilized in 1 × PBS-1% TritonX100 solution. The blocking step was carried out with 0.1% Tween20 and 2% fetal calf serum diluted in 1X PBS for 1 hour at room temperature.  $\gamma$ H2AX and 53BP1 proteins were detected using mouse anti- $\gamma$ H2AX (Ser139) (Upstate) and rabbit anti-53BP1 (Abcam) at a final concentration of 1:1000. Secondary antibodies were anti-mouse Cy3 (Amersham Biosciences) and anti-rabbit Alexa 568 (Molecular Probes). Three rounds of washes with PBS-0.1% Tween 20 were carried out to eliminate any excess of antibodies. Progressive alcohol dehydration was performed, followed by nuclear staining with 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) for fluorescent counterstaining DNA for microscopy. DAPI was added at a final concentration of 2.5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  in Vectashield Mounting Medium. Fluorescence signals were visualized under an Olympus BX microscope equipped with epifluorescent optics specific for each fluorochrome. Images were captured and analysed using Cytovision software (Applied Imaging, Inc.).

### Flow Cytometric $\gamma$ H2AX Analysis

Detection of  $\gamma$ H2AX signal was carried out by using the  $\gamma$ H2AX phosphorylation assay kit for flow cytometry (Upstate Biotechnology, Lake Placid, NY). The assay was performed following manufacturer instructions with two major modifications: the FITC-labeled antibody was incubated overnight at 4°C and an extra 5 min permeabilization step with 0.5% TritonX100 was also included. Cells were suspended in flow buffer (1% f PBS 1% RNaseA containing 20 ml PI) and analyzed by using a FACS Caliber Flow Cytometer (Becton Dickinson). Data were analyzed by using both Cell Quest and Cyflogic software (Tree Star, San Carlos, CA). In order to increase the sensitivity of the flow cytometric detection of  $\gamma$ H2AX positive cells, the mean number of cells positive for  $\gamma$ H2AX in G1, S and G2/M-phase in untreated cells was subtracted from the respective means of the G1, S and G2/M subpopulations of the radiation-exposed cells. We also used the isotype control to estimate the non-specific antibody-binding component, since this component varies for the untreated and treated cells. It is noteworthy that TUNEL positive cells were below 5% in all samples, thus excluding the possibility that the increased amount of  $\gamma$ H2AX labeling was caused by apoptosis.

### References

1. Esserman L, Shieh Y, Thompson I (2009) Rethinking screening for breast cancer and prostate cancer. *JAMA* 302: 1685–1692.

### Micronucleus Assay

Irradiated and non-irradiated cells grown in chamberslides were cultured for 24 h in the presence of cytochalasin B at a final concentration of 3  $\mu\text{g}/\text{ml}$ . The cells were washed twice in 1% PBS for 1 minute, after which they were placed in 0.075 mM KCl hypotonic solution at 37°C and fixed in acetic acid/methanol for 15 min. After removing the fixative, the slides were completely air dried and stained with DAPI (0,25  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) and PI (40  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) in order to identify the binucleated cells.

### PNA-FISH of Metaphase Chromosomes

Chromosome metaphase preparations were obtained through a colcemid treatment (0.02  $\mu\text{g}/\text{ml}$  final concentration) for 8h before harvesting, followed by hypotonic shock (0,075M KCL, 37°C for 30 min) and subsequently fixed with a mixture of glacial acetic acid and methanol (25%:75%), dropped onto the ice-cold slides and air-dried. Slides were stored at  $-4^{\circ}\text{C}$  before being labeled with PNA-FISH probes using a Cy3-(CCCTAA)<sub>3</sub> PNA-probe for telomeres and a FITC-AAACACTCTTTTTGTAGA PNA-probe for centromeres (PE Biosystems; Foster City, CA), as previously described [36]. To evaluate telomere dysfunction DAPI was added (2.5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  final concentration) and chromosome counting was performed in all the metaphases before FISH-PNA labeling. Subsequently, pantelomeric probes allowed us to determine the chromosome arms that had telomere-signal-free ends (TSFE). The TSFE rate was calculated by dividing the number of chromosome arms without a telomere signal by the number of scored metaphases for each cell population analyzed. Images were captured and analysed using Cytovision software (Applied Imaging, Inc.).

### Transduction Procedures

To reconstitute telomere length, late PD HMECs from donor 1 were transduced with viral particles containing LV.hTERT, a lentivirus construct provided by the Viral Vector Facility (CNIC, Spain), in the presence of 4  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Polybrene (Sigma-Aldrich). After 24 h post-transduction, medium was replaced and cells were incubated at 37°C and 5% of CO<sub>2</sub> atmosphere. To evaluate telomerase activity, protein extracts were prepared from transduced and control cells using a RIPA lysis buffer. Protein concentration was measured with a spectrophotometer (Nano-Drop 2000). The presence of hTERT, necessary for telomerase activity, was confirmed by Western blot immunodetection.

### Acknowledgments

We thank the Language Advisory and Translation Unit at the *Universitat Autònoma de Barcelona* Language Service for editing the manuscript. We also thank The Radiophysics and Radioprotection Service at Santa Creu and Sant Pau Hospital for sample irradiation and Cytometry facility at the *Universitat Autònoma de Barcelona* for its assistance in sample processing.

### Author Contributions

Generated the HMEC-hTERT stable cell lines: DS. Conceived and designed the experiments: AG LT. Performed the experiments: LH MT PF DS. Analyzed the data: AG LH. Wrote the paper: AG LH LT MM MT.

3. Howe GR, McLaughlin J (1996) Breast cancer mortality between 1950 and 1987 after exposure to fractionated moderate-dose-rate ionizing radiation in the Canadian fluoroscopy cohort study and a comparison with breast cancer mortality in the atomic bomb survivors study. *Radiat Res* 145: 694–707.
4. Ronckers CM, Land CE, Miller JS, Stovall M, Lonstein JE, et al. (2010) Cancer mortality among women frequently exposed to radiographic examinations for spinal disorders. *Radiat Res* 174: 83–90.
5. Ma H, Hill CK, Bernstein L, Ursin G (2008) Low-dose medical radiation exposure and breast cancer risk in women under age 50 years overall and by estrogen and progesterone receptor status: results from a case-control and a case-case comparison. *Breast Cancer Res Treat* 109: 77–90.
6. Mullenders L, Atkinson M, Paretzke H, Sabatier L, Bouffler S (2009) Assessing cancer risks of low-dose radiation. *Nat Rev Cancer* 9: 596–604.
7. 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. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 5057–5062.
8. Löbrich M, Jeggo PA (2007) The impact of a negligent G2/M checkpoint on genomic instability and cancer induction. *Nat Rev Cancer* 7: 861–869.
9. Shuryak I, Sachs RK, Brenner DJ (2010) Cancer risks after radiation exposure in middle age. *J Natl Cancer Inst* 102: 1628–1636.
10. Kneale GW, Stewart AM (1995) Factors affecting recognition of cancer risks of nuclear workers. *Occup Environ Med* 52: 515–523.
11. Richardson DB, Wing S (1999) Radiation and mortality of workers at Oak Ridge National Laboratory: positive associations for doses received at older ages. *Environ Health Perspect* 107: 649–656.
12. Ritz B (1999) Radiation exposure and cancer mortality in uranium processing workers. *Epidemiology* 10: 531–538.
13. Wing S, Richardson DB (2005) Age at exposure to ionising radiation and cancer mortality among Hanford workers: follow up through 1994. *Occup Environ Med* 62: 465–472.
14. Soler D, Pampalona J, Tusell L, Genescà A (2009) Radiation sensitivity increases with proliferation-associated telomere dysfunction in nontransformed human epithelial cells. *Aging Cell* 8: 414–425.
15. Seluanov A, Mittelman D, Pereira-Smith OM, Wilson JH, Gorbunova V (2004) DNA end joining becomes less efficient and more error-prone during cellular senescence. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 7624–7629.
16. Seluanov A, Danek J, Hause N, Gorbunova V (2007) Changes in the level and distribution of Ku proteins during cellular senescence. *DNA Repair* 6: 1740–1748.
17. Sedelnikova OA, Horikawa I, Redon C, Nakamura A, Zimonjic DB, et al. (2008) Delayed kinetics of DNA double-strand break processing in normal and pathological aging. *Aging Cell* 7: 89–100.
18. Brenner DJ, Doll R, Goodhead DT, Hall EJ, Land CE, et al. (2003) Cancer risks attributable to low doses of ionizing radiation: assessing what we really know. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 13761–13766.
19. Rogakou EP, Pilch DR, Orr AH, Ivanova VS, Bonner WM (1998) DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139. *J Biol Chem* 273: 5858–5868.
20. Rogakou EP, Boon C, Redon C, Bonner WM (1999) Megabase chromatin domains involved in DNA double-strand breaks in vivo. *J Cell Biol* 146: 905–916.
21. Sedelnikova OA, Horikawa I, Zimonjic DB, Popescu NC, Bonner WM, et al. (2004) Senescing human cells and ageing mice accumulate DNA lesions with unreparable double-strand breaks. *Nat Cell Biol* 6: 168–170.
22. Soler D, Genescà A, Arnedo G, Egozcue J, Tusell L (2005) Telomere dysfunction drives chromosomal instability in human mammary epithelial cells. *Genes Chromosomes Cancer* 44: 339–350.
23. MacPhail SH, Banáth JP, Yu Y, Chu E, Olive PL (2003) Cell cycle-dependent expression of phosphorylated histone H2AX: reduced expression in unirradiated but not X-irradiated G1-phase cells. *Radiat Res* 159: 759–767.
24. Martín M, Genescà A, Latre L, Jaco I, Taccioli GE, et al. (2005) Postreplicative joining of DNA double-strand breaks causes genomic instability in DNA-PKcs-deficient mouse embryonic fibroblasts. *Cancer Res* 65: 10223–10232.
25. FitzGerald JE, Grenon M, Lowndes NF (2009) 53BP1: function and mechanisms of focal recruitment. *Biochem Soc Trans* 37: 897–904.
26. Romanov SR, Kozakiewicz BK, Holst CR, Stampfer MR, Haupt LM, et al. (2001) Normal human mammary epithelial cells spontaneously escape senescence and acquire genomic changes. *Nature* 409: 633–637.
27. Campisi J (2005) Senescent cells, tumor suppression, and organismal aging: good citizens, bad neighbors. *Cell* 120: 513–522.
28. Zhang H (2007) Molecular signaling and genetic pathways of senescence: Its role in tumorigenesis and aging. *J Cell Physiol* 210: 567–574.
29. Mao Z, Tian X, Van Meter M, Ke Z, Gorbunova V, et al. (2012) Sirtuin 6 (SIRT6) rescues the decline of homologous recombination repair during replicative senescence. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109: 11800–11805.
30. Krishnan V, Liu B, Zhou Z (2011) Relax and repair to restrain aging. *Aging Cell* 3: 943–954.
31. [31] Kreiling JA, Tamamori-Adachi M, Sexton AN, Jeyapalan JC, Munoz-Najar U, et al. (2011) Age-associated increase in heterochromatic marks in murine and primate tissues. *Aging Cell* 10: 292–304.
32. D'Angelo MA, Raices M, Panowski SH, Hetzer MW (2009) Age-dependent deterioration of nuclear pore complexes causes a loss of nuclear integrity in postmitotic cells. *Cell* 136: 284–95.
33. Costes SV, Chiolo I, Pluth JM, Barcellos-Hoff MH, Jakob B (2010) Spatiotemporal characterization of ionizing radiation induced DNA damage foci and their relation to chromatin organization. *Mutat Res* 704: 78–87.
34. Terradas M, Martín M, Hernández L, Tusell L, Genescà A (2012) Nuclear envelope defects impede a proper response to micronuclear DNA lesions. *Mutat Res* 729: 35–40.
35. Rothkamm K, Kühne M, Jeggo PA, Löbrich M (2001) Radiation-induced genomic rearrangements formed by nonhomologous end-joining of DNA double-strand breaks. *Cancer Res* 61(10): 3886–3893.
36. Martín M, Genescà A, Latre L, Ribas M, Miró R, et al. (2003) Radiation-induced chromosome breaks in ataxia-telangiectasia cells remain open. *Int J Radiat Biol* 79: 203–210.

*Article*

## **Highly Sensitive Automated Method for DNA Damage Assessment: Gamma-H2AX Foci Counting and Cell Cycle Sorting**

**Lai Hernández, Mariona Terradas, Marta Martín, Laura Tusell and Anna Genescà \***

Department of Cell Biology, Physiology and Immunology, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Bellaterra, Spain; E-Mails: laia.hernandez@uab.es (L.H.); mariona.terradas@uab.es (M.T.); marta.martin@uab.es (M.M.); laura.tusell@uab.es (L.T.)

\* Author to whom correspondence should be addressed; E-Mail: anna.genesca@uab.es; Tel.: +34-93-581-14-98; Fax: +34-93-581-18-39.

*Received: 6 June 2013; in revised form: 15 July 2013 / Accepted: 22 July 2013 /*

*Published: 30 July 2013*

---

**Abstract:** Phosphorylation of the H2AX protein is an early step in the double strand break (DSB) repair pathway; therefore, phosphorylated histone ( $\gamma$ H2AX) foci scoring is widely used as a measure for DSBs. Foci scoring is performed either manually or semi-automatically using hand-operated capturing and image analysis software. In general, both techniques are laborious and prone to artifacts associated with manual scoring. While a few fully automated methods have been described in the literature, none of them have been used to quantify  $\gamma$ H2AX foci in combination with a cell cycle phase analysis. Adding this feature to a rapid automated  $\gamma$ H2AX foci quantification method would reduce the scoring uncertainty that arises from the variations in the background level of the  $\gamma$ H2AX signal throughout the cell cycle. The method was set up to measure DNA damage induced in human mammary epithelial cells by irradiation under a mammogram device. We adapted a FISH (fluorescent in situ hybridization) Spot-counting system, which has a slide loader with automatic scanning and cell capture system throughout the thickness of each cell (z-stack), to meet our assay requirements. While scanning the sample, the system classifies the selected nuclei according to the signal patterns previously described by the user. For our purposes, a double staining immunofluorescence was carried out with antibodies to detect  $\gamma$ H2AX and pericentrin, an integral component of the centrosome. We could thus distinguish both the number of  $\gamma$ H2AX foci per cell and the cell cycle phase. Furthermore, restrictive settings of the program classifier reduced the “touching nuclei” problem described in other image analysis software. The automated scoring was faster than

and as sensitive as its manually performed counterpart. This system is a reliable tool for  $\gamma$ H2AX radio-induced foci counting and provides essential information about the cell cycle stage. It thus offers a more complete and rapid assessment of DNA damage.

**Keywords:** gamma-H2AX; cell cycle; automated screening method; dosimetry; DNA damage; mammography

---

## 1. Introduction

The need to assess DNA damage after exposure to ionizing radiation has prompted research into finding specific molecular markers for DNA lesions and the DNA damage response. The study of histone H2AX phosphorylation has become a widely used method for DNA damage detection and the analysis of repair [1,2]. H2AX phosphorylation ( $\gamma$ H2AX) takes place at the double strand break (DSB) site shortly after its formation, disappears at its resolution and is microscopically visible as discrete foci after antibody labeling [3,4]. As DSBs are the most toxic lesions following ionizing radiation, the proportion of  $\gamma$ H2AX foci remaining after a certain time period has been used as a measure of the radiation sensitivity and repair efficiency of exposed cells [5–7].

Quantification of  $\gamma$ H2AX foci can be performed either manually, by individually counting the number of foci present in each cell nucleus or automatically, by evaluating the total  $\gamma$ H2AX immunofluorescence intensity emission per cell, using high throughput techniques, such as flow cytometry. The first method is time-consuming and is subject to the interpretation of the investigator. The second approach is more efficient, but less sensitive, and therefore, it is not suitable for low dose radiation damage assessment. To improve these methodologies, several intelligent computer pattern recognition algorithms have been developed [8,9]. These algorithms permit focus counting, as well as foci size definition. The programs process the images after capturing them, either manually or automatically. Open source programs, such as FociCounter and CellProfiler, are used to analyze images after their capture [10,11]. CellProfiler is faster than FociCounter, because it does not require treating each image and cell nuclei individually and it provides more information about the  $\gamma$ H2AX foci and the cell nuclei. However, these methods still have some problems to overcome, such as counting “touching nuclei” or requiring large amounts of time for image exportation and processing. Other authors have reported the development of methodologies to couple motorized image capture to software, which analyses the images with pattern recognition algorithms [9]. A common feature of the works found in the literature that use these programs is that they limit their study to the number of  $\gamma$ H2AX foci, excluding qualitative factors, such as the variations in the  $\gamma$ H2AX foci pattern during the cell cycle.

Replicating cells (S-phase) with undamaged DNA display  $\gamma$ H2AX constitutively [12,13]. Similarly, since the number of foci in the G2-phase are higher than in the G1-phase, this could significantly enlarge the foci-count error bars [14]. These differences have been corrected by means of flow cytometry [15,16], but no automated fluorescent microscopy system has addressed them. In this regard, we endeavored to improve the damage assessment process by incorporating a cell cycle marker to the  $\gamma$ H2AX immunofluorescence. Our system, adapted from a FISH Spot-counting system, has a slide loader with an automatic scanning and cell capture system. Coupling these two steps is faster than

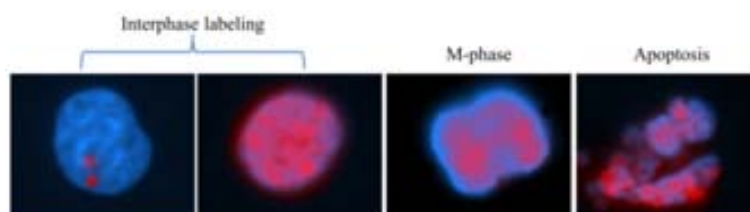
processing the images after their capture. In contrast to other systems, Spot-counting immediately classifies the selected nuclei according to the signal patterns previously described by the user. In terms of pattern definition, co-staining with  $\gamma$ H2AX and pericentrin permits considering the number of foci scored variations depending on the phase of the cell cycle. This approach also minimizes the problem of touching nuclei, which unequivocally leads to over-scoring the number of foci per cell. This problem decreases the method sensitivity, either by masking or overstating the differences among the samples. Furthermore, as it is a “one step process” where capture and classification are coupled, it is faster than current methods. We performed several experiments to set up and evaluate the sensitivity and reliability of our innovative method, with the specific purpose of assessing DNA damage induction in human mammary epithelial cells (HMECs) after irradiation with the mammogram device. This scenario required a highly sensitive DNA damage detection method, since radiation doses were very low; in fact, the minimum dose delivered to the cells in our study is equivalent to the dose received during a single mammogram exploration.

## 2. Results and Discussion

### 2.1. Improved Automated Scoring Classifies Cells According to the Cell Cycle Phase

An important consideration in  $\gamma$ H2AX immunostaining is that the number of foci scored and the labeling pattern varies according to the phase of the cell cycle, since the histone content doubles during the cell cycle along with the doubling of DNA content [12,14]. Indeed, we observed different patterns in  $\gamma$ H2AX immunostaining of human mammary epithelial cell lines, due to both cell cycle transition and apoptosis (Figure 1). We thus considered it essential to take such changes into account to accurately use  $\gamma$ H2AX foci scoring as a surrogate of DNA damage induction. Using cell cycle markers and nuclear area measurements, cell cycle sorting can be performed, thereby allowing a more precise scoring of  $\gamma$ H2AX foci in each cell cycle phase.

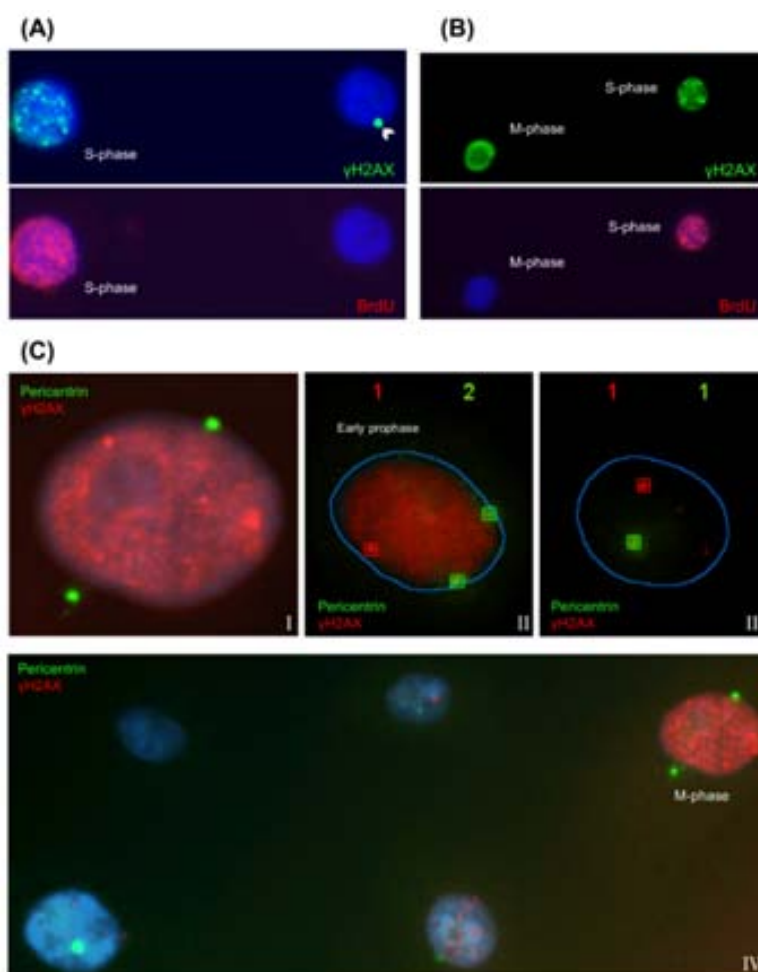
**Figure 1.** Representative images of different phosphorylated histone ( $\gamma$ H2AX) labeling (red) patterns in combination with nuclear staining (blue) show remarkable variance in the  $\gamma$ H2AX immunostaining patterns, not just during apoptosis, but between the different cell cycle phases on human mammary epithelial cells (HMECs).



#### 2.1.1. Characteristic $\gamma$ H2AX Staining Patterns of S- and M-Phase Cells

H2AX is not only phosphorylated in response to DNA damage, but also during normal replication and in response to replication stress [17]. Thus, when  $\gamma$ H2AX is scored as an indicator of DSBs, it is important to discriminate the radio-induced foci from those seen in S-phase cells in the absence of DNA-damage-inducing treatments.

**Figure 2.** S- and M-phase  $\gamma$ H2AX labeling pattern characterization in non-irradiated HMECs. **(A)** The top figure shows green  $\gamma$ H2AX labeling, and the lower figure shows red bromodeoxyuridine (BrdU) labeling. S-phase nucleus (on the left) displays a characteristic  $\gamma$ H2AX labeling pattern: a rough staining across the nucleus. None of the cell nuclei with discrete  $\gamma$ H2AX foci (on the right) presented any BrdU labeling; **(B)** The top figure shows green  $\gamma$ H2AX labeling, and the lower figure shows red BrdU labeling. M-phase cells (nucleus on the left), negative for BrdU, exhibit a bright pan-nuclear  $\gamma$ H2AX labeling pattern different from the characteristic S-phase pattern (nucleus on the right) defined by both BrdU and  $\gamma$ H2AX staining; **(C)** Pericentrin has been labeled with a green fluorochrome; two pericentrin dots can be observed during the M-phase. They are detected unengaged in early prophase stages (II) and in both poles from late prophase (I) up to the end of the mitosis. Note that at mitosis (I, II and IV), cells present a homogeneous and bright pan nuclear  $\gamma$ H2AX staining with respect to their interphase cells counterparts (III and IV). In the images, C.II and C.III, red boxes signal  $\gamma$ H2AX foci detected by the Spot-counting system, and green boxes signal the detected pericentrin. Boxes are drawn by the system.



To characterize the  $\gamma$ H2AX pattern displayed by S-phase cells, we incubated human mammary epithelial cells actively growing *in vitro* (70% confluence) with the thymidine analog, bromodeoxyuridine (BrdU), which is incorporated into newly synthesized DNA strands. By means of

double immunodetection of BrdU and  $\gamma$ H2AX, we established that after a 30 min BrdU pulse in proliferating cells, 24% were positive for BrdU. The BrdU positive cells showed a characteristic granulated and rough  $\gamma$ H2AX labeling across the nuclei, as shown in Figure 2A. The BrdU staining pattern coincided to a greater or lesser extent with the  $\gamma$ H2AX pattern, due to their common presence in the replication forks. This  $\gamma$ H2AX pattern can be easily distinguished from the pattern exhibited by M-phase cells. The M-phase cells'  $\gamma$ H2AX pattern is also pan-nuclear, but brighter, and the nuclei appear more uniformly stained (Figure 2B). Furthermore, the  $\gamma$ H2AX labeling pattern of M-phase cells was unequivocally characterized by combining the detection of the phosphorylated histone and pericentrin, a conserved centrosome protein that is located in each spindle pole in mitotic cells (Figure 2C).

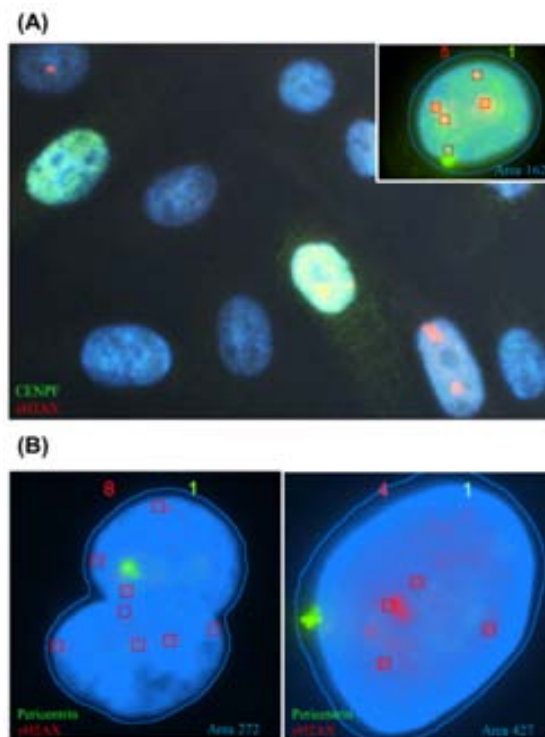
### 2.1.2. CENP-F to Identify G2 Cells and Define the Nuclear Area Range of Cells in G2

With the aim of discriminating G2 from G1 cells, we analyzed the presence of centromere protein F (CENP-F), a kinetochore protein that gradually accumulates in G2- and M-phase cells. The analysis of the CENP-F expression was performed in growing HMEC-hTERT cells. By direct observation under an epifluorescence microscope, we established that 14% of cells were CENP-F positive (Figure 3A, 200 cells analyzed). As the Spot-counting system cannot analyze both CENP-F and  $\gamma$ H2AX, we decided to use the nuclear area as a surrogate of CENP-F staining in order to distinguish cells in G2 from G1 cells. To estimate which was the nuclear area range of CENP-F positive cells, we used the automatic capture and analysis mode of the Spot-counting system (Figure 3A). We performed two consecutive rounds of staining; first, a  $\gamma$ H2AX and pericentrin co-staining and, secondly,  $\gamma$ H2AX and CENP-F. Using the re-localization function of the Spot-counting system, we restricted our nuclear area analysis to CENP-F positive cells with only one pericentrin foci, disregarding any cell in the M-phase. We determined that the mean area for CENP-F positive cells was 162.7 points, with a range between 130 and 250. We couldn't find any CENP-F positive cells over 266 points of cell nuclei surface size, nor any less than 130 pts. Furthermore, we observed that cellular nuclei under 50 area points were commonly debris, and cells displaying a nuclei area over 250 points were likely to be either overlapped nuclei or polyploid cells (Figure 3B). We therefore defined two different cell groups: 50–130 for G1 cells and 130–250 for cells in G2.

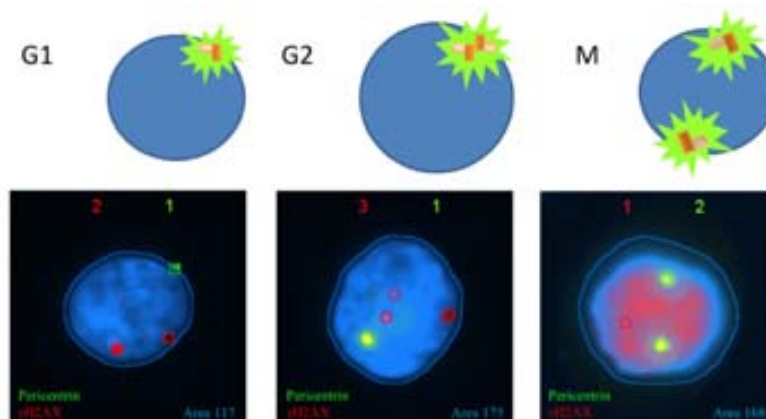
### 2.1.3. Pericentrin: The Co-Staining Marker of Choice

Spot-counting, our system for automatic  $\gamma$ H2AX foci scoring, was originally established for automated scoring of FISH signals. It was not prepared to count cells with no signal; thus, initially, it disregarded the cells with zero  $\gamma$ H2AX foci. To overcome this problem, we needed to choose a constitutive marker whose expression was independent from radiation exposure. Pericentrin was our marker of choice, because of its constitutive presence in the cell, frequently overlapping the nuclear area. Pericentrin, as described before, is a conserved protein of the pericentriolar material (PCM) [18], which surrounds the centrioles and plays an important role in microtubule organization and, as illustrated in Figure 4, varies in size and distribution along the cell cycle. Besides allowing us to score nuclei with no  $\gamma$ H2AX foci, pericentrin labeling also allowed distinguishing late G-2 and M-phase cells, when both centrosomes are unengaged. Therefore, pericentrin was chosen as the most suitable co-staining marker in combination with  $\gamma$ H2AX.

**Figure 3.** Centromere protein F (CENP-F) staining used for defining G2 cell area range. (A) CENP-F, which accumulates to become abundant in G2, was found in cells from 130 to 250 nuclear area points, with a mean value of 162.7 points for CENP-F positive cells; (B) nuclear area measurements above 250 probably corresponded to overlapped nuclei or polyploidy cells. Red boxes signal  $\gamma$ H2AX foci detected by the system. Boxes are drawn by the system.



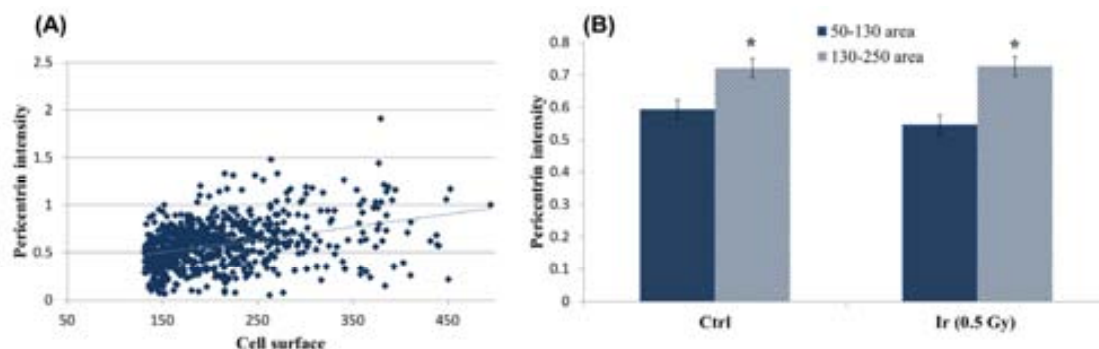
**Figure 4.** Pericentrin signal variations during the cell cycle. Surrounding the centrioles, the pericentriolar material (PCM) provides a platform for emerging microtubules. In parallel with the cell cycle progression runs, a process known as centrosome maturation, where the PCM increases in size (mid-diagram and nucleus image) and finally splits (right diagram and nucleus image) to organize a bipolar mitotic spindle necessary for chromosome segregation between daughter nuclei. Red boxes mark  $\gamma$ H2AX foci detected by the system and green boxes mark the detected pericentrin. Boxes are drawn by the system.





In addition, pericentrin labeling could also help discriminate G1 from G2 cells, when combined with automatic cell surface measurements. The Spot-counting system is able to count the number and measure the intensity of each dot captured. Using the information of pericentrin signal intensity, we plotted this intensity *versus* the area stained with 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) (Figure 5A). A good correlation was found between pericentrin intensity and nuclear area, especially when the cells were growing exponentially (Spearman  $r = 0.4942$ ,  $p < 0.0001$ ). The experiment was performed using cells from three different donors (for further information, see the Experimental Section). The correlation coefficient ranged from 0.34 to 0.6 for the different donors when only one pericentrin signal was observed, all the correlations being extremely significant ( $p < 0.0001$ ). As expected, when cells were reclassified by the defined area groups, the pericentrin signal was significantly brighter in the 130–250 area group, both in irradiated and in non-irradiated cell samples ( $p < 0.0001$ , Mann Whitney test) (Figure 5B). In addition, the percentage of cells in the big area group (16%, Donor 1, 70% confluence) coincided with the percentage of CENP-F positive cells (14%, Donor 1, 70% confluence).

**Figure 5.** Nuclear area vs. pericentrin signal intensity. (A) Plotting cell surface measurements *versus* pericentrin intensity shows a positive correlation between the two variables: pericentrin intensity increases as the area increases. 1000 unsorted cells were plotted; (B) When sorting cells by area range, the mean pericentrin intensity value is found significantly higher in the 130–250 area groups, as compared to the 50–130 area groups. A single asterisk (\*) refers to statistically highly significant difference ( $p < 0.0001$ ). One-thousand cells per dose were analyzed 2 h post irradiation and two replicates per time point.



These positive correlations encourage the use of nuclear area measurements as a G1/G2 classifier, as it clearly corresponds to the changes that the cell undergoes along the cell cycle. During its progression through the cycle, the cell coordinately replicates the DNA material and duplicates the centrosome material, which, at the end of G2, is split in order to organize an effective bipolar mitotic spindle. The nuclei surface measurement classification reinforced by the pericentrin intensity data is a double check for the cell cycle sorting, providing a consistent  $\gamma$ H2AX scoring on sorted cells. The accuracy of the area group classification and the use of pericentrin as a strategy to gather additional cell information are evidence of the system reliability.

## 2.2. $\gamma$ H2AX Automatic Foci Counting

### 2.2.1. Foci Analysis

The foci analysis is performed rapidly, though the time consumed depends on the culture confluence and whether the sample has been irradiated or not. We calculated that it takes 3 h from setting up the microscope platform to obtain the data and store it in a spreadsheet for a 0.5 Gy irradiated sample (70% confluence, 2 h post-irradiation). This time would be reduced in a control sample. The information given by the system is more extended than that obtained by manually counting, as it provides data on the foci intensity (minimum and maximum) and the cell nuclei diameter in addition to the number of foci per cell. To evaluate whether the system was able to perform a consistent scoring, four samples (two controls and two 0.5 Gy irradiated) were scored twice. The differences in the mean foci count were barely detectable; none of the samples displayed a difference higher than 0.05 foci/cell within the two counting rounds. When working with replicates (two irradiated with 0.5 Gy samples and two irradiated with 1 Gy samples and their respective controls), the differences between their mean foci counts (in non-sorted cells) vary from a minimum of 0.06 foci/cell to 0.56 foci/cell. The smallest differences were detected between the controls ( $1.12 \pm 0.06$ ), and they became greater with radiation dose: 0.5 Gy ( $4.75 \pm 0.36$ ) and 1 Gy ( $5.23 \pm 0.56$ ). Thus, when the immunostaining of the sample is adequate and the capture conditions are steady, the Spot-counting system homogeneously and repeatedly gave very similar scoring results.

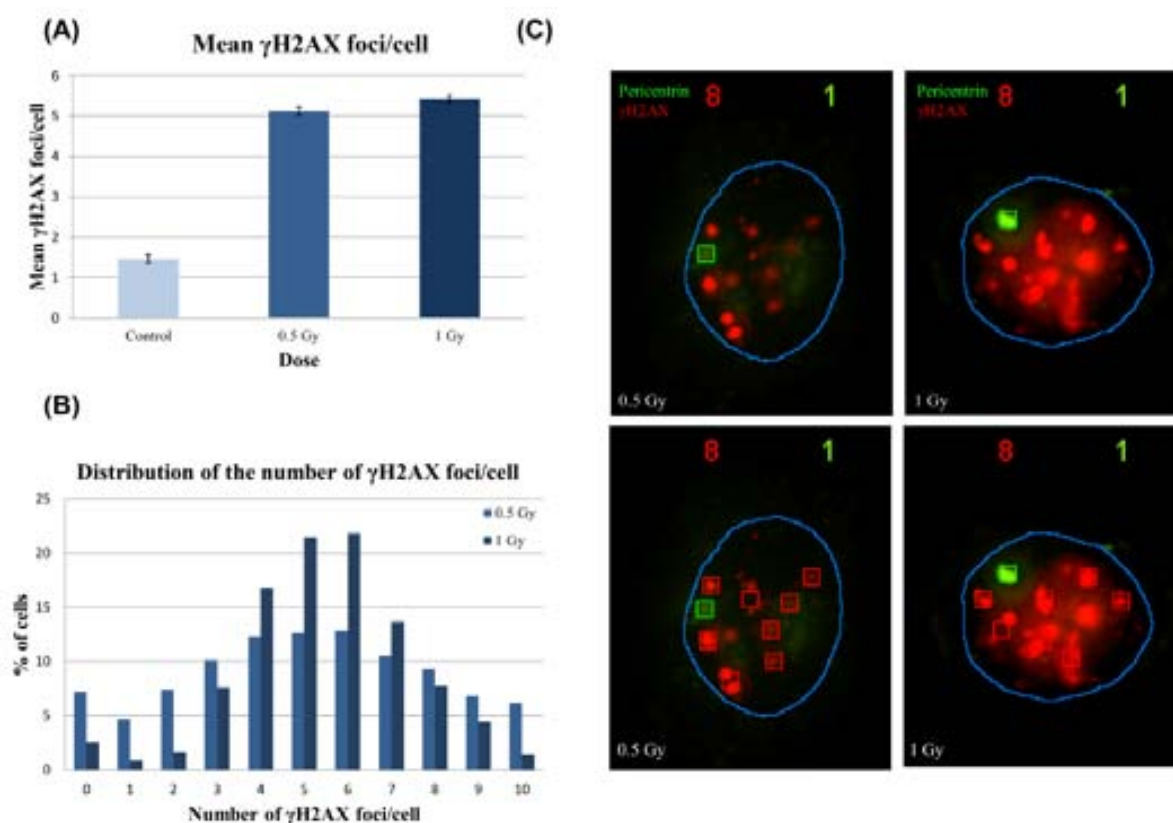
### 2.2.2. $\gamma$ H2AX Signal Saturation at High Radiation Doses in Non-Sorted Cells

To evaluate the use of the Spot-counting method for DNA damage induction assessment, we irradiated Donor 1 HMECs, previously immortalized by hTERT gene transduction, with 0.5 and 1 Gy. When plotting the dose *versus* the mean number of  $\gamma$ H2AX foci per cell scored in Donor 1 cells (not sorted by area), we found that the average number of foci per cell increased with the irradiation dose. However, the increase exhibited by the cells irradiated with 1 Gy was smaller than expected (Figure 6A). This observation could be due to a saturation effect caused by overlapping foci signals in the cells irradiated at the highest dose. To unravel this problem, we analyzed the number of foci per cell (Figure 6B). We observed that the distribution of foci per cell in the 1 Gy sample was narrower than in the 0.5 Gy sample: less cells with zero foci, as was expected for cells irradiated with a higher dose, but also a diminished number of cells with 10 foci. We hypothesized that the cells containing more than five foci in the 1 Gy sample are not being properly classified, because they are not seen as discrete foci, since they overlap, forming larger, but fewer, foci (Figure 6C).

We wanted to check if the qualitative perception of the foci becoming wider with increasing dose was measurable. With that purpose, we used the mean intensity value of the brightest foci of each cell, information also provided by the Spot-counting system. As seen in Figure 7, the mean  $\gamma$ H2AX foci max intensity increases strongly, depending on the dose ( $r^2 = 0.9781$ ). This result supports the idea that the overlap between the foci is more pronounced among higher doses, corresponding to the moderate difference observed between the mean number of foci in the 0.5 Gy sample and the 1 Gy sample. We can envisage two reasons to explain why higher doses of radiation lead to larger foci: the foci signals

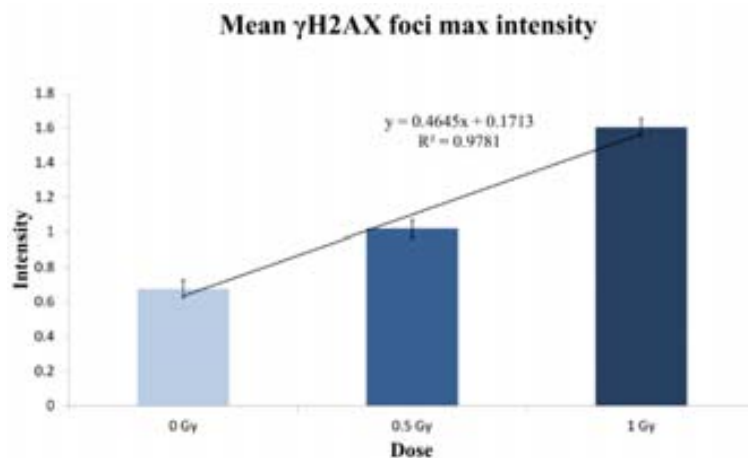
become wider with the dose and, as the number of radio-induced DSBs rises, thus the chance of two foci placed together and scored as one is greater.

**Figure 6.**  $\gamma$ H2AX radio-induced foci number, distribution and size. (A) The average number of foci per cell was statistically significantly higher ( $p < 0.0001$ , Mann Whitney test) in both 0.5 and 1 Gy samples with respect to their controls, but the increase between 0.5 and 1 Gy, despite being statistically significant ( $p < 0.01$ , Mann Whitney test), was smaller than expected; (B) The foci distribution was tighter in the 1 Gy sample than in the 0.5 Gy sample, where the distribution was broader; (C) Representative images to illustrate the observed increase in the size of radio-induced foci with dose. As a result, 1 Gy  $\gamma$ H2AX foci signals are wider than 0.5 Gy foci. One-thousand cells per dose were analyzed 2 h post-irradiation and two replicates per time point. Red boxes signal  $\gamma$ H2AX foci detected by the system, and green boxes signal the detected pericentrin. The blue line is drawn by the system and delimitates the nucleus.

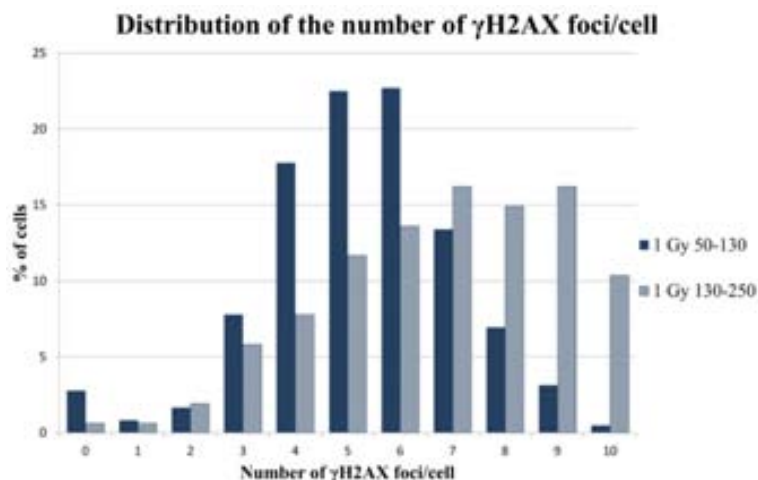


In order to check whether automatic scoring of  $\gamma$ H2AX foci in sorted cells by cell cycle phase could overcome the problems derived from signal overlapping, we scored radiation-induced  $\gamma$ H2AX foci in cells sorted by area. The cells classified under the G2 nuclear area range displayed a significantly increased number of foci with respect to their G1 range counterparts in all the samples. As shown in the 1 Gy sample, the foci distribution of G2 nuclear area range cells was clearly shifted to the right, with higher numbers of foci per cell (Figure 8). Therefore, by means of sorting cells by area, we can limit the  $\gamma$ H2AX foci analysis to cells in G1, in order to reduce the signal saturation effect at high doses.

**Figure 7.** The mean  $\gamma$ H2AX foci intensity increases linearly with radiation dose. Two-thousand unsorted cells per dose were analyzed 2 h post-irradiation. Note the high value of the coefficient of determination,  $r^2 = 0.9781$ .



**Figure 8.** The foci distribution is shifted to the right in G2 cells. The cells under the 130–250 range classification presented higher percentages of cell containing more than five foci than the cell classified under the small area range, *i.e.*, in G1. One-thousand sorted cells were analyzed.

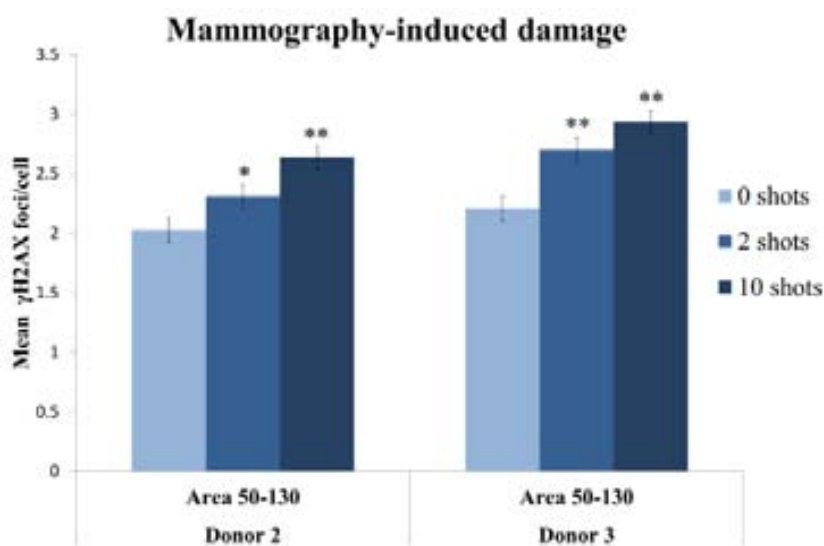


### 2.2.3. Two Mammography Shots Induce a Significant and Detectable Increase in the Number of Foci

Our aim was to develop a method that performed rapid and automatic detection of radio-induced damage, even at very low doses. Therefore, the method had to be very sensitive. Otherwise, the radiation effects in the cells would remain unnoticed. To evaluate the sensitivity of the Spot-counting system, we irradiated vHMECs from two donors with zero, two and 10 automatic X-ray shots under a mammogram device. One single shot is equivalent to 0.01 Gy; thus, the doses received were 0.02 Gy for the cells irradiated with two shots and 0.1 Gy for the samples that received ten shots. After irradiation, we incubate them for 2 h, and a double immunostaining with pericentrin and  $\gamma$ H2AX was performed. For the automatic scoring, we maintained the same capture settings in all experiments performed. All the data was transferred into a spreadsheet, where we delimited the area and the

number of pericentrin signals, to meet all the requirements for a reliable result. The Spot-counting system was able to detect differences between controls and 10 shots, and most importantly, it was able to distinguish an increase in the mean number of  $\gamma$ H2AX foci in the cell samples that received only two automatic X-ray shots with respect to the non-irradiated cell samples (Donor 2 and Donor 3 cells) (Figure 9). This proves that the method is highly sensitive, as two shots are equivalent to a dose received in each single standard mammogram X-ray exploration (standard entrance skin dose is 0.02 Gy per two-view mammogram exposure).

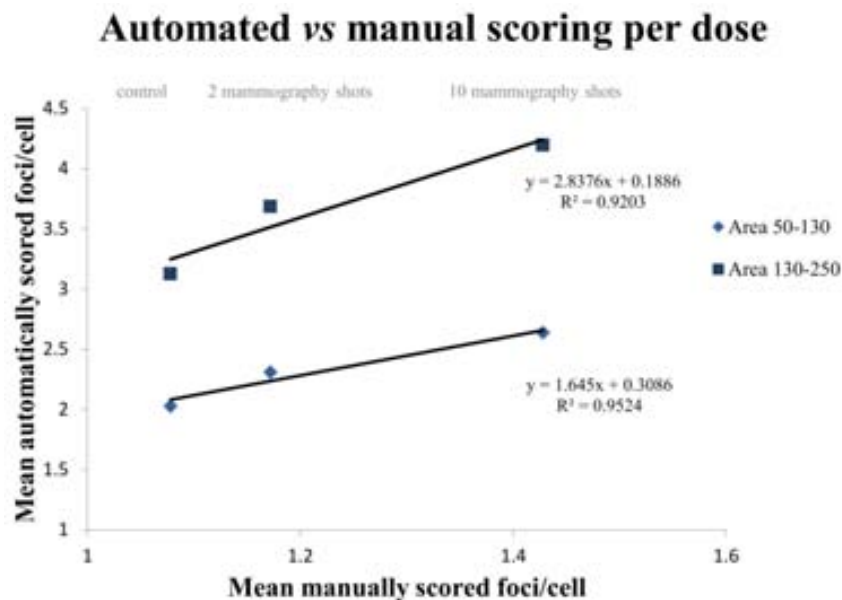
**Figure 9.** Detectable increase in the mean incidence of mammography induced  $\gamma$ H2AX foci per cell 2 h post-irradiation in cells exposed to an X-ray dose equivalent to a single mammogram exploration. One-thousand sorted cells by area were analyzed per dose and donor. Columns represent the mean, and error bars signify standard error. An asterisk denotes a statistically significant difference between the irradiated samples and their sham-irradiated controls (Mann Whitney test). A single asterisk (\*) refers to statistically significant difference ( $p < 0.01$ ), while a double asterisk denotes a highly significant difference ( $p < 0.0001$ ).



#### 2.2.4. Manual vs. Automatic $\gamma$ H2AX Foci Scoring: A Reliable Automated Approach

In order to evaluate if the method was reliable, we proceeded to compare automatically scored samples with their manually scored counterparts. The manual scoring was done blindly without any other labeling than  $\gamma$ H2AX and DAPI as a counterstain. The automatic scoring was performed on the same samples used for the manual scoring with identical capture settings for all the samples, as described in the Experimental Section. Figure 10 illustrates that there was a good agreement between automated and manual scoring in all samples. However, when comparing sorted cells, the small area subpopulation gave a better fit ( $y = 1.645x + 0.3086$ ,  $r^2 = 0.9524$ ) than big area cells ( $y = 2.8376x + 0.1886$ ,  $r^2 = 0.9203$ ). As described before, G2 cells present a higher number of foci, so when comparing their foci values to those scored manually, where the scorer does not distinguish between phases, it is expected that the slope of the latter should be substantially greater than one.

**Figure 10.** Agreement between automatic and manual scoring. One thousand cells were scored both manually and automatically for each dose (control, two mammography shots and 10 mammography shots). The mean number of foci per cell obtained with the Spot-counting system was plotted *versus* the manual scoring. The lines represent the results obtained when sorting the cells by area: 50–130 area range (rhombs) and 130–250 (squares). The small area range gave a better fitted result.



### 3. Discussion

After defining the  $\gamma$ H2AX labeling pattern of HMEC cells along the cell cycle, we used it in combination with cell cycle markers and area measurements to improve the accuracy of the automated scoring of  $\gamma$ H2AX foci. The steps that we followed to define the changing labeling pattern of  $\gamma$ H2AX and the establishment of the area measurements could be followed by any researcher to set up not just the Spot-counting system, but any automated platform. These steps provided the basis to properly sort the cells according to the cell cycle phase via our Spot-counting system, which almost completely avoids the problem of “touching nuclei” reported by other automated system users [11]. Our system is able to immediately discriminate the cells containing two pericentrin foci, thus reducing the possibility of scoring two cells as one. In addition, we studied in depth the area measurements in order to assure that the possibility of scoring two cells instead of one was ruled out. Although there is no clear specification of the time that other automated systems need for  $\gamma$ H2AX foci scoring, using the Spot-counting system on irradiated cells (0.5 Gy) at 70% confluence, less than three hours are needed to scan, if necessary, review and export the data of 1000 nuclei into a spreadsheet. Thus, this method is definitely faster than manual scoring and any other method requiring the user’s intervention at some point (namely, image exportation or nuclei delimitation by hand).

In terms of scoring accuracy, the system tends to slightly over-score the mean number of foci, due to the small portion of zero  $\gamma$ H2AX foci cells in which the pericentrin signal does not overlap with the nuclei and remains unseen by the system. Spot-counting results are in excellent agreement with manual scoring, demonstrating its high reliability. Nevertheless, this consistency with manual counting could

be lost at high radiation dose exposures, where overlapping foci impede proper scoring. As the radiation dose increases, the number of DSBs increases, and thus, for the number of  $\gamma$ H2AX foci, too, accordingly, the chance of overlapping is greater. For this reason, we observed a better correlation between mean foci intensity and dose than between dose and the mean number of foci. However, this is not only due to overlapping; as other authors have described, there is also an increment in the foci size with the radiation dose [8]. This loss of linearity on the dose-response curve due to overlapping could be corrected to some extent by excluding the cells in the big area range, as they are mainly cells in G2 with higher numbers of foci per cell.

Finally, the method has been proven to be highly sensitive, as it is capable of distinguishing an increase in dose at as low as 0.02 Gy, the typical radiation dose delivered at the skin level by a mammogram device. The Spot-counting system is able to measure small differences in the number of  $\gamma$ H2AX foci, since high numbers of nuclei can be scored, and the system provides the possibility to discriminate between cell cycle phases. This discrimination allows the user to monitor the culture progression and to differentiate increments in the number of foci caused by the changes in the cell cycle from the radio-induced foci. Excluding the variations due to the cell cycle makes the system not just more sensitive, but more reliable.

## 4. Experimental Section

### 4.1. Cell Cultures

Primary non-transformed human mammary epithelial cells (HMEC) were derived from normal breast tissue of three Caucasian women. Cells were purchased from Cell Application (Donor 1, age 30), Cambrex Biowhittacker (Donor 2, age 58) and Gibco (Donor 3, age 28). The cells were seeded into cover slips or chamber slides and were grown in serum-free MepiCGS (ScienCell, research laboratories) supplemented with penicillin and streptomycin at 37 °C and 5% CO<sub>2</sub>. To reconstitute telomere length, HMECs from Donor 1 were transduced with viral particles containing LV.hTERT, a lentivirus construct provided by the Viral Vector Facility (CNIC, Spain), in the presence of 4  $\mu$ g/mL polybrene (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). After 24 h post-transduction, new medium was added and cells were incubated at 37 °C and 5% CO<sub>2</sub>. The presence of hTERT, necessary for telomerase activity, was confirmed by Western blot immunodetection (data not shown).

### 4.2. Irradiation

HMECs were irradiated with different doses: two and ten automatic shot X-rays under a mammogram X-ray diagnostic device (SENO DMR plus, General electric). Each shot was equivalent to 0.01 Gy at the skin surface (measured with an R-100 detector), which implies a 0.0027 Gy glandular dose. The X-ray molybdenum-anode tube voltage was 28 KeV, and a dose rate of 0.67 Gy/min was used. HMECs were exposed in a chamber slide support, placed on top of several methacrylate plates at a height corresponding to the average thickness of breast under compression. For experiments in Section 2.2.2, HMECs were irradiated at different doses (0.5 Gy or 1 Gy) by exposing them to <sup>137</sup>Cs  $\gamma$ -rays at a dose rate of 5.45 Gy/min using an IBL 437C source.

### 4.3. Immunostaining

The HMECs were seeded in cover slips and grown until 70% confluence was reached. Cells were fixed (paraformaldehyde 4% for 10 min) and, then, permeabilized for 20 min in 1× PBS 0.5% TritonX100 solution, rinsed twice with 1× PBS and, then, incubated in PBS 0.1% Tween20 2% fetal calf serum for 1 h at room temperature.  $\gamma$ H2AX, Pericentrin and CENP-F proteins were detected using mouse anti- $\gamma$ H2AX (Ser139) (Upstate), rabbit anti-Pericentrin (Abcam) and rabbit anti-CENPF (Abcam) at a final concentration of 1:1000, 0.5:1000 and 1:1000, respectively. Secondary antibodies were anti-mouse Cy3 (Amersham Biosciences, Uppsala Sweden) and anti-rabbit Alexa 568 (Molecular Probes, Eugene, United States). Three rounds of washes with 1XPBS 0.1% Tween 20 were carried out. After that, progressive alcohol dehydration was performed, followed by nuclear staining with 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) for fluorescent DNA counterstaining for microscopy. DAPI was added at a final concentration of 2.5  $\mu$ g/mL in Vectashield Mounting Medium. Fluorescence signals were visualized under an Olympus BX microscope equipped with epifluorescent optics specific for each fluorochrome. Images were captured and analyzed using Cytovision software (Applied Imaging, Inc., Michigan, MI, USA).

### 4.4. $\gamma$ H2AX Immunostaining Combined with a BrdU Assay

HMECs were cultured for 30 min with 50  $\mu$ M BrdU solution at 37 °C and 5% CO<sub>2</sub>. They were rinsed twice in 1× PBS and permeabilized for 20 min with 1× PBS 0.5% TritonX100. After a 1 h blocking step (1× PBS 0.1% Tween 20 2% FCS), rabbit monoclonal anti- $\gamma$ H2AX antibodies diluted in the same blocking solution (1:500) were added. Following an overnight incubation, the cover slides were washed 3 times with 1× PBS 0.1% Tween 20 for 5 min and incubated for 1 h with A488 anti-rabbit monoclonal antibodies (Molecular Probes, Eugene, OR, USA) diluted 1:1000 in blocking buffer. After a second washing step (3 times with 1× PBS 0.1% Tween 20 for 5 min), they were fixed with 4% paraformaldehyde for 10 min. After that, they were soaked for another 10 min in a 0.5M HCl 0.1% TritonX100 solution, followed by another 30 min blocking step. Mouse anti-BrdU (1:100) and rabbit anti- $\gamma$ H2AX (1:500) were added and left to incubate overnight. A third washing step was performed before adding the secondary antibodies: 1:200 Cy3 anti-mouse and 1:500 A488 anti-rabbit diluted in blocking solution. Finally, the last washing step was performed, followed by a short wash with distilled water and a dehydration step in alcohol (1 min 70% ethanol, 1 min 85% ethanol and 1 min 100% ethanol) before mounting the slides with DAPI.

### 4.5. Automated Microscopy and Analysis

A minimum of one-thousand cell nuclei per time point from each sample were evaluated under the automated platform using a 60× objective. The system used was a Spot-counting scan system (Spot AX software, Applied Imaging, Newcastle, UK) consisting of an Olympus BX61 epifluorescence microscope, a CCD camera (with specific filters for DAPI, FITC and Cy3), a motorized x-y stage (BX-UCB, Olympus), a focus motor and computer with the software to store the information concerning the number and combination of signals for each cell. This system automatically scans the preselected area and captures the images under the established capture settings. After that, it classifies



every cell “on-the-fly” by the signal combination criteria set up by the user. The settings of the system were maintained from the original FISH analysis [19] with a small variation on the % Spot diameter value (280 instead of 200), and number of planes was fixed to 4 for both probes. The system scans and focuses using DAPI and, after recognizing the presence of a cell, captures the other fluorescent dye signals (Cy3 and FITC). Both are acquired as a z-stack, where each step size was 2.1  $\mu\text{M}$  between planes with a total of 4 planes. The same exposure and camera settings are used to acquire the images for each donor sample. Finally, the system has a review screen, where the images could be reloaded, studied and, if necessary, the user can relocate every cell to verify the automatic classification. The signal combination criteria includes any cell containing 1 or 2 pericentrin signals, from 0 to 10  $\gamma\text{H2AX}$  foci with a total number of 20 class groups. All the data is imported into spreadsheets, sorted by number of pericentrin signals and area measurements and analyzed for the number of  $\gamma\text{H2AX}$  per cell. The software measures the area in pixels, but for storage reasons, it converts pixels into a non-international unit obtained from a mathematical formula expressed as a value of 1000. We refer to this value as nuclear area points.

## 5. Conclusions

In order to study the effects of mammography on HMECs, a highly sensitive method was developed to monitor the chromosome DSBs arising from very low irradiation doses, equivalent to those used in the clinical setting. Our Spot-counting system includes a cell cycle marker, which has enhanced the efficiency of automated methods, as well as improved the accuracy of DNA damage assessment. Furthermore, the additional information that this automated system provides opens up new possibilities in terms of radiation sensitivity assessment, such as using the individual  $\gamma\text{H2AX}$  foci intensity number or recognizing the cell cycle phase.

## Acknowledgments

We thank Anna Godo for her help with setting up the Spot-counting system and Daniel Dominguez for his help with the cell culture. We thank Rosemary Thwaite for her critical reading and correction of the manuscript. We also thank the Radiophysics and Radioprotection Service at Santa Creu and Sant Pau Hospital for sample irradiation. This work was funded by grants from Consejo de Seguridad Nuclear (CSN 2012-0001) and EURATOM (Dark.Risk GA 323216). AG laboratory is supported by Generalitat de Catalunya (2009SGR-282). LH is supported by the Universitat Autònoma de Barcelona PhD programme fellowship. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

## Conflict of Interest

The authors declare no conflict of interest.

## References

1. Celeste, A.; Difilippantonio, S.; Difilippantonio, M.J.; Fernandez-Capetillo, O.; Pilch, D.R.; Sedelnikova, O.A.; Eckhaus, M.; Ried, T.; Bonner, W.M.; Nussenzweig, A. H2AX haploinsufficiency modifies genomic stability and tumor susceptibility. *Cell* **2003**, *114*, 371–383.
2. Sedelnikova, O.A.; Pilch, D.R.; Redon, C.; Bonner, W.M. Histone H2AX in DNA damage and repair. *Cancer Biol. Ther.* **2003**, *2*, 233–235.
3. Rogakou, E.P.; Pilch, D.R.; Orr, A.H.; Ivanova, V.S.; Bonner, W.M. DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139. *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 5858–5868.
4. Paull, T.T.; Rogakou, E.P.; Yamazaki, V.; Kirchgessner, C.U.; Gellert, M.; Bonner, W.M. A critical role for histone H2AX in recruitment of repair factors to nuclear foci after DNA damage. *Curr. Biol.* **2000**, *10*, 886–895.
5. MacPhail, S.H.; Banath, J.P.; Yu, T.Y.; Chu, E.H.M.; Lambur, H.; Olive, P.L. Expression of phosphorylated histone H2AX in cultured cell lines following exposure to X-rays. *Int. J. Radiat. Biol.* **2003**, *79*, 351–358.
6. Banáth, J.P.; MacPhail, S.H.; Olive, P.L. Radiation sensitivity, H2AX phosphorylation, and kinetics of repair of DNA strand breaks in irradiated cervical cancer cell lines. *Cancer Res.* **2004**, *64*, 7144–7149.
7. Klokov, D.; MacPhail, S.M.; Banáth, J.P.; Byrne, J.P.; Olive, P.L. Phosphorylated histone H2AX in relation to cell survival in tumor cells and xenografts exposed to single and fractionated doses of X-rays. *Radiother Oncol.* **2006**, *80*, 223–229.
8. Böcker, W.; Iliakis, G. Computational methods for analysis of foci: Validation for radiation-induced  $\gamma$ -H2AX foci in human cells. *Radiat. Res.* **2006**, *165*, 113–124.
9. Runge, R.; Hiemann, R.; Wendisch, M.; Kasten-Pisula, U.; Storch, K.; Zoephel, K.; Kotzerke, J. Fully automated interpretation of ionizing radiation-induced  $\gamma$ H2AX foci by the novel pattern recognition system AKLIDES<sup>®</sup>. *Int. J. Radiat. Biol.* **2012**, *88*, 439–447.
10. Jucha, A.; Wegierek-Ciuk, A.; Koza, Z.; Lisowska, H.; Wojcik, A.; Wojewodzka, M.; Lankoff, A. FociCounter: A freely available PC programme for quantitative and qualitative analysis of gamma-H2AX foci. *Mutat. Res.* **2010**, *696*, 16–20.
11. González, J.E.; Lee, M.; Barquinero, J.F.; Valente, M.; Roch-Lefèvre, S.; García, O. Quantitative image analysis of gamma-H2AX foci induced by ionizing radiation applying open source programs. *Anal. Quant. Cytol. Histol.* **2012**, *34*, 66–71.
12. MacPhail, S.H.; Banáth, J.P.; Yu, Y.; Chu, E.; Olive, P.L. Cell cycle-dependent expression of phosphorylated histone H2AX: Reduced expression in unirradiated but not X-irradiated G1-phase cells. *Radiat. Res.* **2003**, *159*, 759–767.
13. Yoshida, K.; Yoshida, S.H.; Shimoda, C.; Morita, T. Expression and radiation-induced phosphorylation of histone H2AX in mammalian cells. *J. Radiat. Res.* **2003**, *44*, 47–51.
14. Löbrich, M.; Shibata, A.; Beucher, A.; Fisher, A.; Ensminger, M.; Goodarzi, A.A.; Jeggo, P.A.  $\gamma$ H2AX foci analysis for monitoring DNA double-strand break repair: Strengths, limitations and optimization. *Cell Cycle* **2010**, *9*, 662–669.
15. Huang, X.; Darzynkiewicz, Z. Cytometric assessment of histone H2AX phosphorylation: A reporter of DNA damage. *Methods Mol. Biol.* **2006**, *314*, 73–80.

16. Hernández, L.; Terradas, M.; Martín, M.; Feijoo, P.; Soler, D.; Tusell, L.; Genescà, A. Increased mammogram-induced DNA damage in mammary epithelial cells aged *in vitro*. *PLoS One* **2013**, *8*, e63052.
17. Ward, I.M.; Chen, J. Histone H2AX is phosphorylated in an ATR-dependent manner in response to replicational stress. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 47759–47762.
18. Mühlhans, J.; Brandstätter, J.H.; Gießl, A. The centrosomal protein pericentrin identified at the basal body complex of the connecting cilium in mouse photoreceptors. *PLoS One* **2011**, *6*, e26496.
19. Molina, Ò.; Sarrate, Z.; Vidal, F.; Blanco, J. FISH on sperm: Spot-counting to stop counting? Not yet. *Fertil. Steril.* **2009**, *92*, 1474–1480.

© 2013 by the authors; licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution license (<http://creativecommons.org/licenses/by/3.0/>).





## Annex de resultats

---

*El primer pas es assumir el dret a equivocar-nos, a saber fer de l'error un punt de partida cap a un nou aprenentatge.*



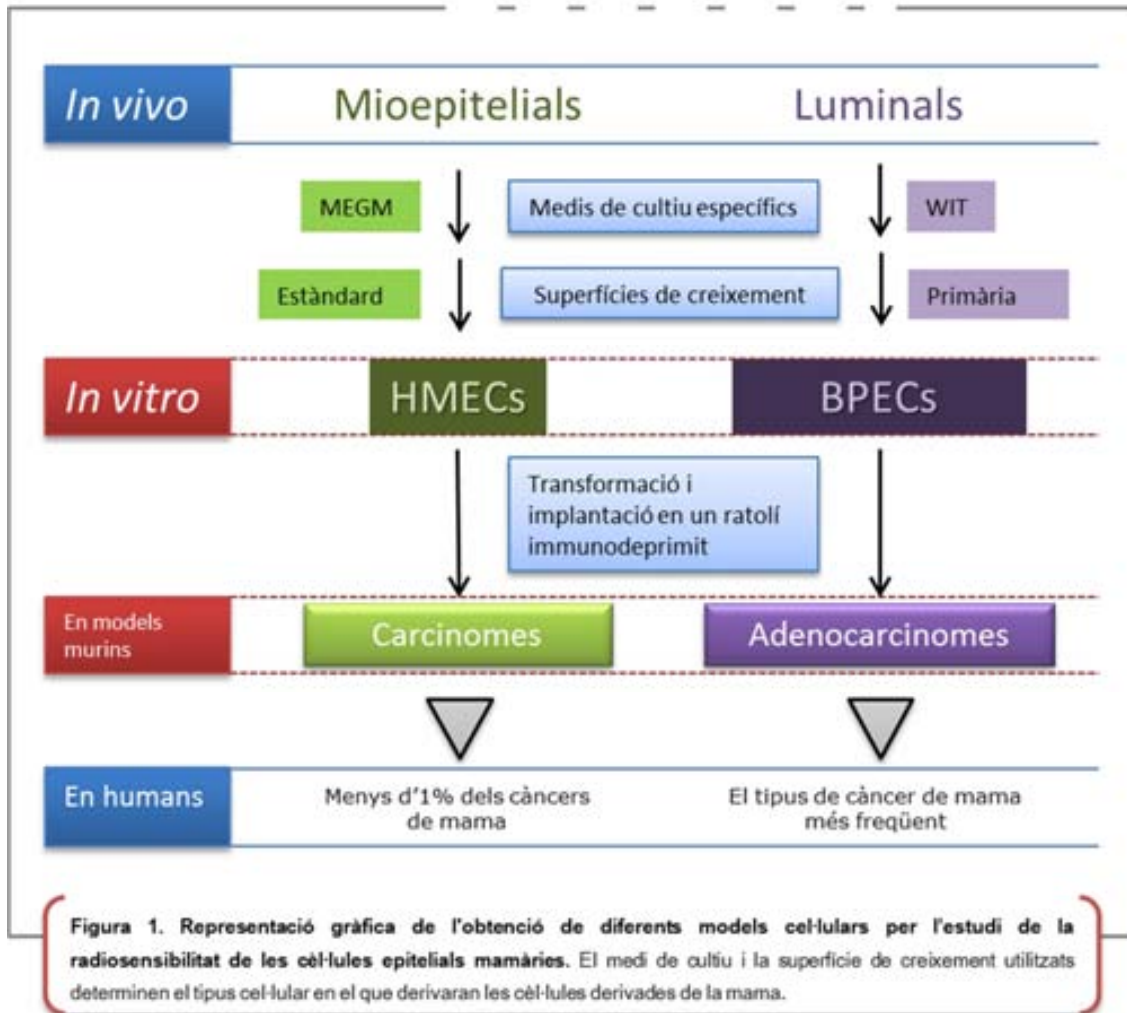
## 1. Estudi de les diferències en la resposta al dany entre donants d'edats diferents

---

Davant els resultats del **treball 1** en el que es conclou que les HMECs de *population doublings* tardans presenten una cinètica de reparació dels DSBs alentida es va plantejar la pregunta de si l'edat de la donant també podia influir en aquesta resposta.

En la mama s'hi poden trobar dos tipus de cèl·lules epitelials diferents: les **luminals**, secretores de la llet, i les **mioepitelials**, que són estrictament epitelials, però que poden contraure's com si fossin músculs. La funció d'aquestes últimes és conduir la llet dins al mugró. En el nostre laboratori s'han derivat cèl·lules epitelials a partir de mostres de glàndula mamària normal (intervencions estètiques) de diferents dones sanes, sense història familiar de càncer de mama. El cultiu d'aquestes cèl·lules ha estat possible gràcies al desenvolupament de medis de cultiu diferents que permeten el creixement selectiu de cèl·lules epitelials amb característiques luminals i amb característiques mioepitelials. Si es cultiven les mostres de teixit mamari en medi MEGM i superfície de plàstic estàndard, el creixement estarà restringit a les cèl·lules que presenten marcadors mioepitelials, conegudes com a cèl·lules epitelials mamàries humanes o **HMECs** (Hammond et al., 1984). Per obtenir cèl·lules que expressin marcadors moleculars característics de cèl·lules luminals, Ince i col·laboradors van elaborar un medi lliure de sèrum que van anomenar WIT (Ince et al., 2007). Les cèl·lules que creixien en aquest medi i que presentaven alguns marcadors luminals, com la claudina 4, es van anomenar **BPECs** (*breast primary epithelial cells*). Els dos tipus cel·lulars esmentats tenen una rellevància diferent pel que fa a l'estudi de la carcinogènesi (**Figura 1**). Una vegada transformades amb un conjunt d'elements genètics ben definits (hTERT, SV40-LT i H-RAS) i transferides a models murins immunodeprimits, aquestes línies cel·lulars donen lloc a 2 tipus de tumors diferents (Elenbassa et al., 2001). Mentre que les HMECs transformades originaven carcinomes que s'assemblen als carcinomes escamosos i que representen menys d'un 1% del casos de càncer de mama; les BPEC donen lloc a tumors

similars a l'adenocarcinoma mamari, que és el tipus de càncer de mama més freqüent en dones.



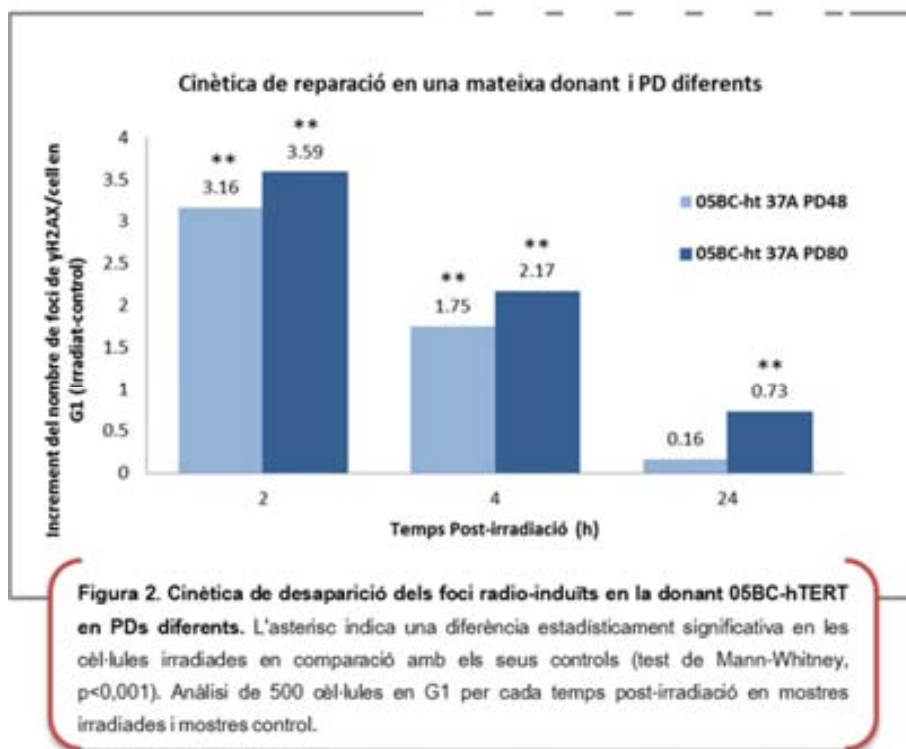
Per aquest estudi es va voler dissenyar una experimental que avalués la radiosensibilitat de les donants de manera individual, posant especial atenció a les diferències en la resposta a la radiació que es poguessin derivar de l'edat de la donant. Inicialment, per continuar amb els resultats obtinguts en el treball 1, volíem realitzar el present estudi de radiosensibilitat individual amb cèl·lules HMEC de diferents donants. Per analitzar la variable "edat de la donant" de manera independent de l'erosió telomèrica vàrem voler realitzar una transducció amb el gen de la subunitat hTERT de la telomerasa. En iniciar el treball experimental ens



vàrem trobar amb una dificultat insalvable: les HMECS derivades en el nostre laboratori a partir de mostres de reduccions mamàries estètiques no creixien gens bé després de la transducció amb hTERT. Això ens va obligar a realitzar aquesta part de l'estudi amb cèl·lules BPECs en compte de HMECs. Les BPECs utilitzades van ser prèviament transduïdes, a PDs molt primerencs, amb un vector lentiviral que contenia el gen de la subunitat catalítica amb activitat transcriptasa inversa de la telomerasa, hTERT. Per prevenir l'aparició dels canvis que tenen lloc en relació a l'escurçament telomèric i a l'estrès que se'n deriva d'aquest, la transducció es va realitzar a *population doublings* molt primerencs.

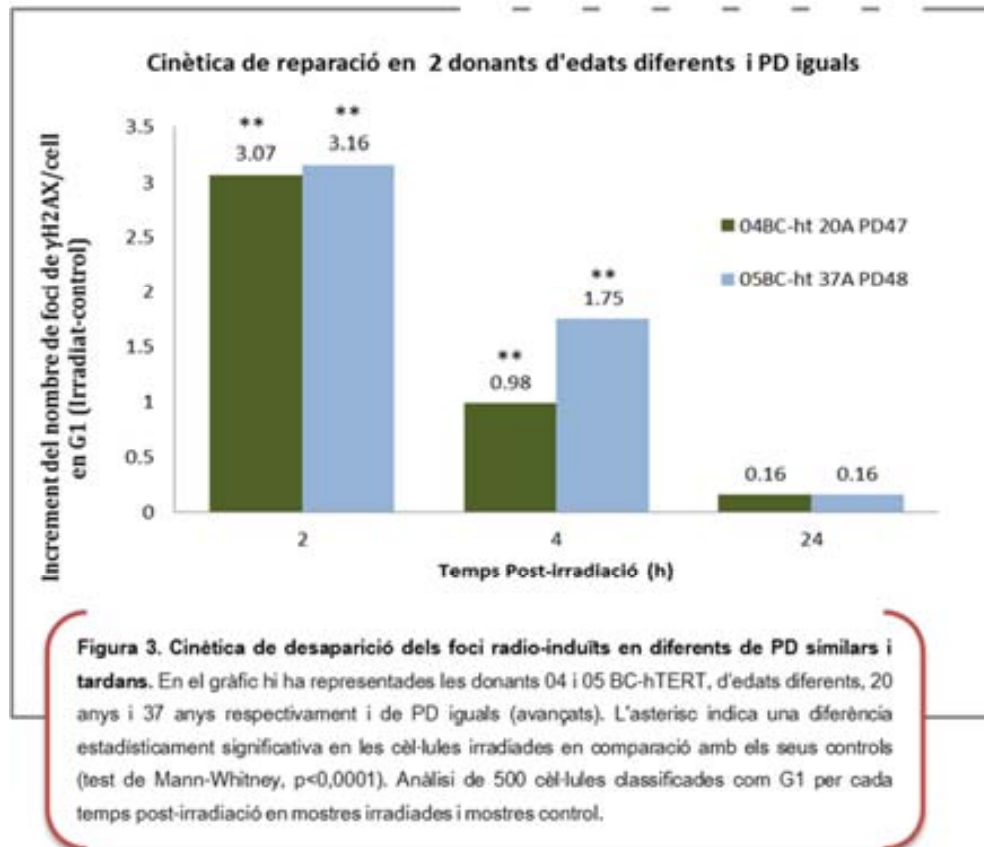
Fent ús del mètode automatitzat descrit en el **treball 2** es va poder seguir la cinètica de fosforilació i defosforilació de la histona  $\gamma$ H2AX a 2h, 4h i 24h post-irradiació en 4 donants d'edat diferents (19, 20, 37 i 53 anys). Per totes les mostres i temps post-irradiació es va utilitzar una dosi de 0,5 Gy sota una font de rajos gamma ( $^{137}\text{Cs}$ ) a una taxa de dosi de 5,45 Gy/min. La dosi escollida fou més elevada que la utilitzada en els processos de cribratge mamogràfic ja que la nostra intenció principal era veure l'efecte de l'edat en la reparació del dany en el DNA. Per a obtenir un recompte de foci més acurat, es va restringir el recompte a aquelles cèl·lules que, segons les seves característiques d'àrea i nombre de centrosomes, estaven en G1. Es van analitzar un mínim de 500 cèl·lules per cada temps post-irradiació, fent el recompte de 2 rèpliques per cada punt. Per a cada temps estudiat (2h, 4h i 24h) es va obtenir la mitjana del nombre de foci de  $\gamma$ H2AX/cèl·lula de la mostra irradiada i del seu control no irradiat. Els resultats representats per a cada donant, no mostren el total de foci que presenten les cèl·lules de mitjana, sinó que mostren la diferència o l'increment entre el control no irradiat i la mostra irradiada. Aquest valor, que representa el nombre de foci radio-induïts, va ser positiu en totes les mostres i a tots els temps estudiats. Els asteriscs en els gràfics representen la presència d'un increment estadísticament significatiu de les mostres irradiades respecte els seus "*shamirradiated*" controls (aplicant el test no-paramètric de Mann Whitney,  $p < 0.001$ ).

En primer lloc es va voler determinar si la cinètica de reparació dels DSBs s'alentia en les BPECs en relació a l'augment en el nombre de PDs de manera semblant a com s'havia observat en les HMECs (Treball 1). Per això, es va escollir la donant 05BC-hTERT (de 37 anys), i es van irradiar les cèl·lules a PD 48 i a PD 80. Es pot observar que, tot i estar transduïdes amb hTERT, en tots els temps, l'increment en el nombre de foci radio-induïts és més pronunciat en les cèl·lules de PD 80 que en les cèl·lules de PD 48. De manera rellevant, mentre les cèl·lules de PD 48 tornen a nivells pràcticament basals de dany, on no mostren diferències significatives amb els seus controls, les cèl·lules de PD 80, 24 hores post-irradiació (PI) mostren un nombre de foci significativament superior al de la mostra control (Mann Whitney,  $p < 0.001$ ) (Figura 2).



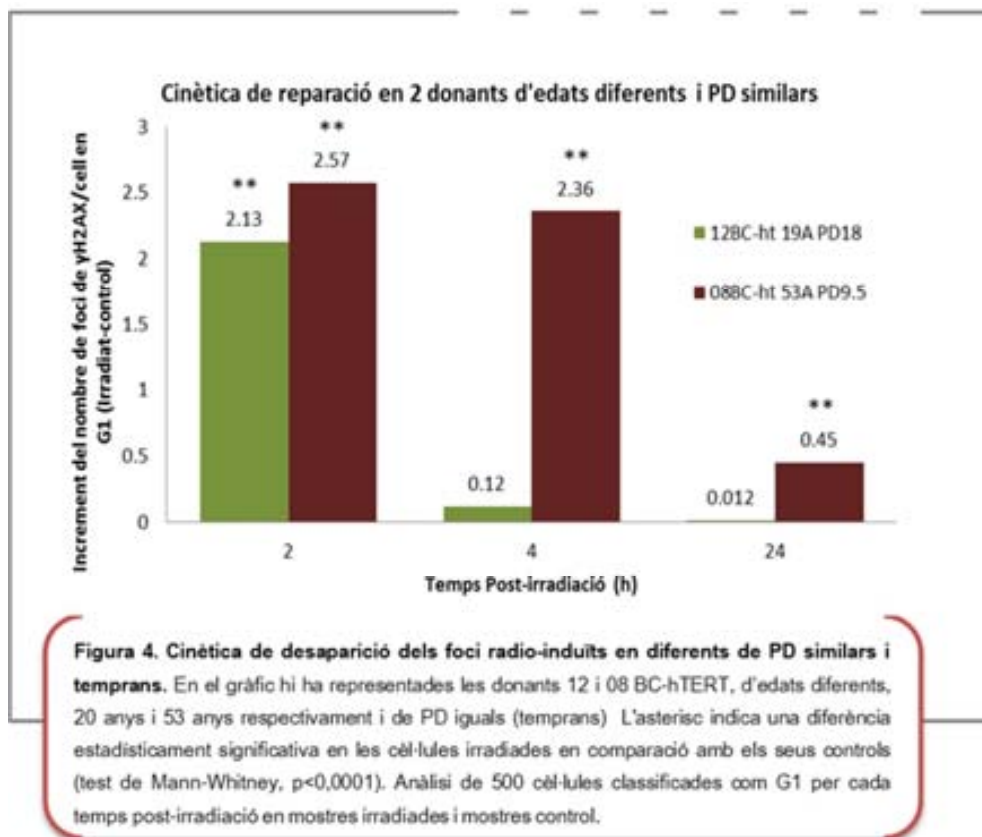
Per tant, a partir dels resultats de la donant 05BC-hTERT a diferents PDs, es va poder concloure que, com passava amb les HMECs, té lloc un alentiment en la cinètica de reparació d'acord a l'increment en el nombre de PDs. A continuació es va voler observar l'efecte de l'edat de manera independent a l'efecte de les divisions cel·lulars o PDs. Per fer-ho es va

comparar la resposta al dany radio-induït en cèl·lules de PD similars i d'edats diferents. Per aquest estudi es van aparellar les mostres segons si tenien un PD temprà o tardà. En contraposar les 04BC-hTERT (20 anys) a PD 47 a les 05BC-hTERT (37 anys) a PD 48 es va observar que a 2 h PI, en ambdues mostres, hi havia un increment significatiu del nombre de foci radio-induïts per cèl·lula. En canvi, tot i que la donant 05BC-hTERT, de més edat, mostrava un nombre major de foci radio-induïts, les diferències entre donants eren pràcticament imperceptibles. En augmentar el temps per la reparació fins a 4h PI, les diferències entre donants augmentaven, on la donant de més edat tenia gairebé 1 foci radio-induït més per cèl·lula que la donant més jove. Tot i així, la distància entre elles es tornava a



reduir a les 24h PI, moment en el que les freqüències de foci havien tornat als valors basals (Figura 3).

Per evitar que la elevada freqüència basal de foci, que s'acumula al llarg dels dies en cultiu, emmascarés alguna diferència més entre donants es van utilitzar BPECs de PDs primerencs de dues donants d'edats molt diferents. Les 08BC-hTERT derivades de la donant de més edat, 53 anys, van mostrar una cinètica molt alentida: mentre les 12BC-hTERT (19 anys) a les 4h post irradiació ja havien retornat als nivells de dany basals, les 08BC-hTERT tenien nivells de dany similars als observats 2h post-irradiació (Figura 4). A més, tot i que a 24 h post-irradiació s'havien escurçat les distàncies entre la mostra irradiada i el seu controls, les cèl·lules de la donant 08 presentaven un nombre de foci radio-induïts significativament superior al nombre de foci basal. Mostrant altre cop que l'edat de la donant influïa negativament en l'eficiència de reparació dels DSBs.



En resum, podem veure un alentiment en la velocitat de desaparició dels foci radio-induïts en BPECs tant davant l'augment en el nombre de passes en cultiu com quan augmenta l'edat de la donant. El canvi més significatiu pel que fa a l'alentiment de la cinètica que s'ha pogut observar és en la donant 08, de major edat, respecte la donant més jove quan els PD eren similars. En la majoria de mostres, al cap de 24h, hi havia un retorn a l'estat basal de dany, menys en la mostra de major *population doubling* (05BC-hTERT 37A PD80) i en la mostra derivada de la dona de major edat (08BC-hTERT 53A PD9.5).

Tots aquests resultats, dins d'un estudi molt preliminar on la n és força petita, semblen apuntar que l'alentiment en la cinètica de reparació observat en les cèl·lules envellides *in vitro*, en el treball 1, també s'observa quan es comparen cèl·lules de donants més joves amb cèl·lules de donats de major edat. Per tant, tot i que aquest treball sembla concloure que l'envelliment té un paper rellevant en el detriment de la resposta al dany al DNA, també deixa un conjunt de preguntes per resoldre: aquests DSBs que romanen més temps oberts en les cèl·lules de donants de major edat, donen lloc a un major nombre de reorganitzacions? Seria fàcil que fos així ja que la reparació alentida de DSBs causa l'acumulació de DSBS a les cèl·lules, fet que en promou la seva reunió il·legítima. Si és així, aquestes reorganitzacions provocaran un augment en la inestabilitat genòmica? És l'envelliment per tant una amenaça per la integritat del genoma?

El fet que també s'observi un alentiment quan la única variable és l'edat de la donant fa més evident l'efecte negatiu de l'edat en l'eficiència de reparació. Per acabar, de manera rellevant, la presència de hTERT, com ja passava en el treball 1, no sembla evitar l'empitjorament en l'eficiència del procés de reparació dels DSBs al llarg dels PDs. Per tant, s'obre una finestra a la necessitat de discutir sobre els efectes de l'envelliment en la reparació dels DSBs a les cèl·lules més enllà dels causats per l'erosió telomèrica. Aquesta necessitat s'intenta resoldre en el segon apartat de l'annex de resultats, on s'expliquen i es discuteixen els factors que poden estar provocant un augment de la radiosensibilitat amb l'edat.



## **2. Treball 3: “Aging and radiation sensitivity: different games, same players”**

---

### **1. Introduction**

Age at exposure to ionizing radiation is a strong factor in radiation-induced cancer. The individuals exposed at early ages are the most radiosensitive since the primary injury has a longer latent phase to evolve into a cancer outbreak. Sensitivity to radiation decreases until maturity and increases again at older ages. Meanwhile, life expectancy is also remarkably increasing. The world health organization (WHO) registered a notable increment in life expectancy over the last two decades: in 1990 a 60 year-old had a life expectancy of 21 years, and in 2011 it was 24 years. In addition, the percentage of people undergoing medical imaging procedures significantly becomes greater with age and so does the cumulative effective dose from those procedures (Fazel R et al., 2009). Therefore, understanding the age-related changes that may compromise the population safety in terms of radiation protection is becoming increasingly relevant. However, we still lack an integrated view of all the role players intervening in the relationship between aging and radiosensitivity at a cellular level.

The term radiosensitivity should always be used in combination of a well-defined endpoint. Clinically, the endpoint can be a tissue reaction after radiotherapy or the appearance of a secondary cancer. At cellular level, the endpoints can be cell death, chromosomal damage, DNA lesion, repair response or cell cycle checkpoints activation. All of them framed in terms of dose-response relationships. The study of the relationship between radiosensitivity and aging can also be approached at an epidemiological level. Epidemiological studies have measured the inter-individual differences in terms of susceptibility to radiation-induced cancer. It has been demonstrated a variation of the radiosensitivity with age, being the younger ones and the elderly the most sensitive to ionizing radiation. This last statement is sustained by different studies, for instance, the Life Span Study cohort of the Japanese atomic bomb survivors. In that study the excess relative risks (ERRs) for radiation-induced cancers as a function of age at exposure were examined (Shuryak, Sachs, & Brenner, 2010). As expected, the ERR for cancer induction was high during childhood and decreased progressively with age, but this decrease stopped at exposure ages of 30-40 years. Surprisingly, the excess risk of cancer induction increased with increasing age at exposure for most solid cancers for exposure ages higher than 40 (Shuryak et al., 2010). Radiation risks after exposure at early ages are related to initiation processes, whereas radiation risks after exposure at later ages are more associated with the promotion of preexisting premalignant cells. Richardson and Wing also found a similar tendency among the Oak Ridge Y-12 uranium processing plant workers (Richardson

& Wing, 1999). They observed that the radiation doses received after age 45 presented a stronger association with cancer mortality than those received at younger ages. All these findings suggest that the radiation-sensitivity measured in terms of carcinogenic events, after middle age, increases with age among human adults.

In this review, results obtained from different studies with different evaluation endpoints at a cellular level are integrated to provide an updated description of the association between radiosensitivity and age. We will focus our discussion on three mechanistic role players; reviewing old players like the oxidative stress system and emerging ones such as the telomere attrition and the deterioration of the DNA repair pathways towards age. Our focus will be centered on identifying how they are interconnected: defining the common changes that some cell components and pathways experience both towards aging and in an increased radiosensitivity scenario. We will try to elucidate how factors that had been proposed as aging triggers have a direct role in increasing radiosensitivity with age.

## **2. Oxidative stress**

Ionizing radiation can have various effects on the cellular level. When radiation is absorbed by the cell, damage can occur either by direct action or indirect action. In a direct action a secondary electron, which results from photon absorption, interacts and is absorbed by a molecule such as DNA, RNA or proteins. In indirect action, the ionizing radiation impairs or damages cells by creating free radicals. Free radicals may form compounds, such as hydroxyl radical or hydrogen peroxide, which could initiate harmful chemical reactions within cells. The set of these free radicals is known as Reactive Oxygen Species (ROS). They can also originate endogenously from the oxidative respiration that takes place in mitochondria. High levels of ROS can cause direct damage to macromolecules, such as lipids, nucleic acids, and proteins. Lipid peroxidation is one of the early steps of this damaging process, followed by oxidation of nitrogenated bases. Damage to the DNA, mainly strand breaks and DNA crosslinking, is a source of deletions and mutations. In addition, practically every amino acid in a protein can be oxidized by ROS. Oxidative modifications also lead to functional changes in various types of proteins, which can have substantial physiological impact (Kregel KC, Zhang HJ. *et al* 2006).

### *Lessons from the free radical aging theory*

The oldest theory that relates aging with radiation was proposed more than 50 years ago and postulates the accumulation of ROS along the lifespan as an aging trigger (Harman D *et al* 1956, Harman D *et al* 1992). These species are a persistent source of molecular damage, which is



supposed to contribute to the age-related deterioration of functions in the organism. Recently, this theory has been severely criticized by some authors who claim that the correlation between the presence of oxidative damage and the aged phenotype, even if it exists, does not imply causation (Buffenstein, Edrey, Yang, & Mele, 2008; Lapointe & Hekimi, 2010; Pérez et al., 2009). Whilst entering in this debate is beyond the scope of this article, some of theory's points are relevant to this discussion. First, contributing to aging or not, the ROS production was found to be higher in aged cells in comparison to their young counterparts (Ku et al. 1993). The free radical aging theory states that aerobic organisms are continuously producing ROS, i.e., accumulating oxidative damage over time (Harman D *et al* 1992). Secondly, in addition to the increased oxidative stress, impaired antioxidative enzymatic activities with aging have also been described (Andersen, Nielsen, Nielsen, & Grandjean, 1997; Inal, Kanbak, & Sunal, 2001). Antioxidant enzymes such as superoxide dismutase, catalase, and glutathione peroxidase showed a decline in their activities and gene expression with age. Other studies pointed out to an unbalanced pro-oxidant and antioxidant activities scenario, which is known as oxidative stress, rather than a simple deterioration of the enzymes activity (Benderitter, Pouget, & Voisin, 2003). Increased ROS production and a decreased antioxidant capacity are thought to contribute to the aging process by oxidative modification of different macromolecules, as mentioned before (Kregel & Zhang, 2007; D. Liu & Xu, 2011). In the context of DNA, oxidative damage to mitochondrial and nuclear DNA is significantly increased in different tissues in old rats and mice (Chen, Hales, & Ozanne, 2007; Hamilton et al., 2001). Levels of lipid peroxidation products are also greater as age progresses (Montine, Neely, F, & FLint, 2002; Niki, 2009). Moreover, aging-related oxidative modification of different proteins causes changes in protein structure, enzyme activities, transcriptional activities, and signal-transduction pathways (reviewed by(D. Liu & Xu, 2011), leading to age-related diseases. Therefore, is clear that aged cells contain constitutively higher amounts of ROS leading to oxidative stress and compromising cellular structure and homeostasis.

#### *Ionizing radiation increases the already high levels of ROS in aged cells*

Exposure to ionizing radiation leads to oxidizing events that alter the atomic structure through direct interactions of radiation with target macromolecules or through products of water radiolysis that result in the production of ROS. Radiation can also produce them indirectly through signaling processes that evolve in ROS release from the mitochondria. Hong *et al* (2010) found that ROS can even be produced by merely irradiating the cytoplasm. Irradiating cells that already contain an increased amount of ROS species would unequivocally help to overload the antioxidant systems which would try to eliminate the excess of oxygen metabolites (Figure 1). That would be the case of aged cells, whose redox system is impaired. In terms of radiosensitivity, some studies exemplify the

consequences of having increased levels of oxidative stress, similar to the aged cells case. For instance, knocking down cytoglobin, a vertebrate globin that scavenges ROS, makes glioma cells more sensitive to radiation (Fang et al, 2011). In the same line, *in vitro* studies have also proved that cell lines with increased amounts of radiation-induced ROS production are radiosensitive (Ki Moon Seong<sup>1</sup>, 2009). On the other hand, animal studies have shown that expressing antioxidant such as superoxide dismutase or catalase can minimize the severity of fibrosis, a common late effect of ionizing radiation. These studies represent few of many examples that show a link between radiosensitivity and alterations in the oxidative stress system. Accounting the importance of this link, we could assert that radiation can be more hazardous to the elderly, whose aged cells already contain increased amounts of ROS species contributing to the oxidative stress. One clear example of aged cells being more sensitive due to impairment in the oxidative stress system is a study on the antioxidant capacity after radiotherapy of two groups of women with different ages (Kasapovic et al., 2009). They measured the activity of different antioxidant enzymes in blood cells of the two women groups in order to estimate their capacity to eliminate H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> formed after radiotherapy. They observed that the older patientø group displayed a decreased antioxidant capacity. Interestingly they also found decreased cytosol SOD enzyme expression in progressive stages of breast carcinomas. In summary, irradiating aged cells, whose antioxidant system is already overload and which have accumulate a significant amount of ROS species, complicates their chances of dealing successfully with the excess of oxygen metabolites. When ROS production exceeds the antioxidant defense capacity of the cell, oxidative stress occurs, leading to damage to DNA, proteins and membrane lipids.

### **3. Telomeres**

Telomeres are DNA-protein structures at the end of the chromosomes protecting them from exonucleolytic degradation, homologous recombination and non-homologous end joining. Telomeres in human cells consist of tandem repetitions of the sequence TTAGGG closely associated with a six-protein complex known as shelterin that has end protection and telomeric regulation functions (reviewed in de Lange, 2005). New telomeric DNA sequences can be added to the ends of the chromosomes by the enzyme telomerase. Telomerase consists of a catalytic subunit with reverse transcriptase activity, an RNA component acting as a template for DNA synthesis. However, telomerase activity is limiting or absent in most human somatic cells. In the absence of balancing mechanisms, telomeric DNA shortens with each DNA replication due to the inability of conventional DNA polymerases to replicate the entire tip of the chromosome (end replication problem). Under these conditions, each round of replication results in loss of a repetitive sequence fragment.

### *Telomere attrition as age progresses*

Maintaining the telomere length is crucial for the chromosome end protection. In the organism, telomerase activity is basically restricted to ovaries, testes and highly proliferative tissues as activated lymphocytes and adult tissue stem cells (Colgin & Reddel, 1999). However, most somatic cells in human tissues have insufficient levels of telomerase activity. Telomere attrition thus occurs in parallel with aging in rapidly proliferating cells of the skin, gastrointestinal system and blood. Once a critical shortened telomere length is attained, a permanent growth arrest state called replicative senescence is triggered (Harley CB *et al* 1992, *exp gerontology*). Dysfunctional telomeres induce senescence by triggering a DNA damage response similar to that caused by DNA double strand breaks (døAdda di Fagagna *et al.*, 2003). Accordingly, the presence of senescent cells has been reported to increase as age progresses in many renewable mammalian tissues (Herbig, Ferreira, Condel, Carey, & Sedivy, 2006). Replicative senescence has been postulated as a tumor suppressor mechanism. In fact, malignant progression occurs when cells acquire mutations which allow cells to overcome this telomere-dependent proliferative arrest, primarily in the p53 or pRB pathways. When cells ignore the senescence-inducing signals or escape from the senescence growth arrest, their telomeres keep getting shorter and dangerously dysfunctional in terms of genomic instability. Furthermore, recently has been reported that senescent cells produce a different set of proteins that could change the homeostasis of that tissue, leading to what is recognized as ageing (Campisi J, Andersen JK, Kapahi P, 2011).

Cell proliferation beyond replicative senescence leads to uncapped chromosomes that can fuse with each other (Deng *et al*, 2004 *Oncogene*, der-Sarkisian *et al*, 2004 *Oncogene*; Soler *et al*, 2005 *Genes Chrom Cancer*) or with its sister chromatid after DNA replication (Tusell *et al*, 2008 *Cytogenet Genome Res*). The unstable chromosome configurations thus generated, namely dicentric and ring chromosomes, can set up in motion fusion-bridge-breakage cycles (BFB cycles) that are able to produce rapid and important changes in gene dosage (Lo *et al.*, 2002). BFB cycles begin with the formation of chromatin bridges between the two sets of chromosomes that are pulled to opposite poles in dividing cells. According to time-lapse imaging studies, most of anaphase bridges break during cell division when the two centromeres are pulled in different directions (Hoffelder *et al.*, 2004; Tusell, Pampalona, Soler, Frías, & Genescà, 2010). This breakage results in further fusions followed by other bridges and new breaks. This process leads to broad DNA amplification and gross chromosome rearrangements (Latre, 2003; Murnane, 2006; Soler, Genescà, Arnedo, Egozcue, & Tusell, 2005) (Murnane & Sabatier, 2004). Any of these outcomes lead to a raise in chromosome instability (CIN) (Figure 2). Why aged cells display more telomere-dependent CIN than their younger counterparts? First, as state before, telomeres shorten with age in most tissues, thus

proliferative somatic cells in the elderly would display shortened telomeres. Secondly, there might be an age-decline in the efficacy of senescence response that could lead to the proliferation of cells with critically short telomeres (Feng et al., 2007). Thus, aged cells would present more uncapped chromosomes thus providing the basis for chromosome instability.

Research evidence supports the existence of a strong relationship between the unbalanced chromosome rearrangements and chromosome number abnormalities arising from the BFB cycles and the production of rapid and widespread changes in gene dosage. Those changes are necessary to initiate epithelial carcinogenesis. In addition, BFB cycles may also generate chromosome segment amplification in human cancer cells, which are directly related to tumor progression (Gisselsson et al., 2001)(Gisselsson et al., 2000) (Hagan et al., 2002) (Meeker et al., 2004) (Artandi 2000 letters to nature). Altogether support the notion that age-dependent telomere attrition and cell cycle checkpoint relaxation contributes to human carcinogenesis. However, the causal link between telomere attrition and chromosome instability in human neoplasms is not easy to demonstrate because the necessary acquisition of telomere length maintenance mechanisms in highly proliferative cancer cells masks telomere dysfunction traces.

#### *Telomere attrition raises radiosensitivity*

Surprisingly, some studies pointed out the telomeres as preferred targets of the oxidative stress damage since telomeric repeats are rich in guanine triplets, which are remarkably sensitive. As mentioned before, such stress can arise from both ionizing radiation and age-related ROS accumulation. Cells with short telomeres are more radiosensitive than their long telomeres cell counterparts. For instance fibroblasts and lymphoblasts showed an inverse relationship between telomere length and radiosensitivity (Chem, Cells, Rubio, Kim, & Campisi, 2002)(Mcilrath et al., 2001). Actually, the relationship goes both ways: cells with dysfunctional telomeres are more radiosensitive and radiosensitive cell lines display shorter telomeres. Cell lines with shortened telomeres show increased amounts of radio-induced damage such as a greater presence of micronuclei after irradiation (Castella, Puerto, Creus, Marcos, & Surralles, 2007). The interplay between telomere shortening and radiosensitivity has also become clear when acknowledging that mice lacking telomerase are highly sensitive to ionizing radiation (Goytisolo et al., 2000; Wong et al., 2000). Furthermore, DBSs repair deficiency syndromes show accelerated telomere shortening, and relevantly for our discussion, hypersensitivity to IR (Adelfalk et al., 2001; Metcalfe JA, Parkhill J, Campbell L, Stacey M, Biggs P, Byrd PJ, 1996; Ranganathan et al., 2001)

The increased radiosensitivity of cells with short telomeres can be simply explained by considering that short dysfunctional telomeres are sensed as DSBs. Shortened telomeres provide radiation-

induced DSBs with a new joining possibility (**Figure 2**). In other words, uncapped chromosomes in aged cells offer additional re-joining opportunities that may hinder proper repair of radiation-induced breaks. The joining between an unprotected chromosome and a radiation-induced broken end results in the formation of new unstable chromosome rearrangements entering BFB cycles (Soler, Pampalona, Tusell, & Genescà, 2009). Age-dependent telomere attrition in human somatic tissues might imprint a temporal dimension onto radiation sensitivity, namely, that shortened telomeres may more easily compromise normal tissue function in older organisms. Thus, it is needless to say that genomic stability is compromised by adding radiation in this already complicated scenario of telomere shortening with age.

#### **4. DNA repair**

The DNA is constantly under the attack of both endogenous and environmental agents. Given the importance of its preservation, the cells have developed several mechanisms for fighting against these threats. They detect the DNA damage, signal its presence and mediate its repair while halting the cell cycle in order to provide time for its repair (Jackson & Bartek, 2010). These pathways are jointly known as DNA-damage response (DDR) and can lead cell cycle arrest until repair is accomplished. Otherwise, when DNA damage persists unrepaired, DDR can trigger cell death by apoptosis or senescence. DNA double-strand breaks (DSBs) are highly cytotoxic injuries that fully alert this DDR surveillance system (Bekker-Jensen & Mailand, 2010). DSBs can arise from ionizing radiation, oxidative stress, and replication of damaged DNA. Furthermore, intentional DSBs are formed during genetically programmed processes such as meiotic recombination in germ cells and V(D)J recombination in developing lymphocytes (Wyman & Kanaar, 2006). Equally important, uncapped chromosomes due to proliferation-dependent telomere attrition are recognized as DSBs (d'Adda di Fagagna et al., 2003). We focus this part of the review on the detection and repair of DSBs and the impact of aging in the proper DSB resolution (Figure 3).

##### *DNA damage response efficiency declines with age*

The DDR factors are responsible for the DSB repair, which takes place through two main pathways: non-homologous end-joining (NHEJ) (Lieber, 2008) and homologous recombination (HR) (San Filippo, Sung, & Klein, 2008). They are also responsible for the DSB signaling that leads to the recruitment of the proteins involved in such repair pathways. The signaling amplification starts with the phosphorylation of the histone variant H2AX (H2AX) by two kinases: ataxia telangiectasia mutated (ATM) and DNA-dependent protein kinase catalytic subunit (DNA-PKcs) (Rogakou, Pilch, Orr, Ivanova, & Bonner, 1998). H2AX enables the binding of additional DDR factors such as the mediator of DNA damage checkpoint 1 (MDC1), breast cancer type 1 susceptibility (BRAC1) and

p53 Binding Protein 1 (53BP1). The H2AX phosphorylation disappears at the resolution of the DSB.

Interestingly, it has been largely reported that aged cells have increased basal amounts of H2AX foci with respect younger cells (Hernández et al., 2013a; Sedelnikova et al., 2008). But most importantly, we reported that X-ray doses equivalent to the dose received at the skin surface after a single mammogram exploration resulted in increased amounts of radio-induced H2AX foci (unrepaired DSBs) in the *in vitro* aged human mammary epithelial cells, but not in their young counterparts (Hernández et al., 2013a) (Hernández et al., 2013b). In addition, the subsequent recruitment of DDR proteins into the damage site, such as 53BP1, was delayed in the *in vitro* aged cells (Hernández et al., 2013a). In the same line, Sedelnikova *et al* also reported that recruitment rates of repair proteins at DSB sites after irradiation (0,6 Gy) correlated inversely with the donor's age (Sedelnikova et al., 2008). In our previous studies we had observed that the aged cells also presented greater amounts of chromosome instability and telomere attrition (Soler et al., 2009). In order to elucidate the contribution of the telomere attrition in the delayed kinetics we transduced the cells with the hTERT component of telomerase. After transducing with hTERT the DSB resolution kinetics were still slower than their younger counterparts. We conclude that, even though hTERT transduction would prevent incorrect rejoining with the telomere free ends, would not prevent the transduced cells from slowed down repair kinetics. Thus, we hypothesized that other factors must be behind the deceleration of the repair rate.

The mechanistic basis for the delayed signaling of radiation-induced DSBs in aged cells remain unknown, but the effectiveness of the two main DSB repair pathways, NHEJ and HR, have also been reported to be affected by age. NHEJ is the major DSB repair mechanism in higher eukaryotes; importantly this pathway also plays an important role in telomere maintenance. NHEJ begins when the Ku70/80 heterodimer binds the two broken DNA ends preventing them from nucleolytic digestion (Lieber, 2010). The heterodimer recruits the DNA-PKcs generating the DNA-PK holoenzyme (Ku + DNA-PKcs), which both stabilizes and aligns the DNA ends to facilitate their rejoining. After NHEJ, the broken DNA ends are simply pieced together in an efficient but error-prone fashion. Defects in the NHEJ pathway factors lead to increased genome instability, radiosensitivity and accelerated aging phenotypes (Espejel et al., 2004); but is the NHEJ system less effective with age? The immune system seems to hold the answer. Using the plasmid ligation method, recent studies have shown that B lymphocytes from old mice had poor repair efficiency and increased misrepair of the linear plasmid (Puthiyaveetil & Caudell, 2013). Seluanov et al, 2004 also developed a sensitive approach for assessing the NHEJ efficiency in young, presenescent and senescent cells (Seluanov, Mittelman, Pereira-Smith, Wilson, & Gorbunova, 2004). They

constructed a reporter cassette containing a GFP gene interrupted by an intron. This intron could be eventually removed by a specific cut of *ISceI* endonuclease. When this cut is repaired by NHEJ the GFP activity is restored and thus becomes an indicator of NHEJ efficiency. This approach has shown that NHEJ efficiency is reduced in aged cells (both presenescent and senescent) compared with young cells. In agreement with these experiments, the same research group observed on senescent cells that the Ku heterodimer levels, a key component of the NHEJ pathway, suffered a decline with culture progression (Seluanov, Danek, Hause, & Gorbunova, 2007). Moreover, the cellular distribution of Ku in aged cells differed in comparison of young ones, disturbing its mobilization in response to the damage (Seluanov et al., 2007). Therefore, Ku availability becomes reduced and altered, which explains the observed decline of NHEJ activity with age. This diminished NHEJ effectiveness in old age can contribute to reduced immune cell repertoire and impaired immunity as a direct consequence of its involvement in the V(D)J recombination (Puthiyaveetil & Caudell, 2013). The immune system recognizes and eliminates pathogens by using its diverse antigen receptor repertoire. One of the functions of this diversity is to prevent tumor formation and progression. Since the development of the lymphocytes receptors requires the generation of DSBs, when the DSBs repair machinery does not work properly, the ability of cells to complete postcleavage DSB ligation is limited (Li, L., Zhang, L., Fan, J., Greenberg, K., Desiderio, S., Rassool, F. V., & Small, 2011). Reduced efficiency of NHEJ may also lead to persistent DSBs that in turn could lead to the joining of inappropriate ends, giving rise to genomic rearrangements. Therefore, both consequences directly lead to a carcinogenic prone environment. Accordingly, the NHEJ pathway, when its function is intact, is seen as a tumor suppressor (Woo et al., 2007).

NHEJ is the major pathway for the DSBs repair, mainly because it is not restricted to certain cell cycle phases. DSBs can also be repaired through the homologous recombination (HR) pathway which acts during the S and G2 phases when a homologous sister chromatid serves as a repair template (Holthausen, Wyman, & Kanaar, 2010). Resection is the first step of this process and generates single-stranded DNA tails. Replication protein A (RPA) binds to these ssDNA regions and is then replaced by the Receptor Associated protein 51 (RAD51). RAD51 nucleofilaments mediate the invasion of the sister chromatid to search for homology. Subsequently, the invading strand is extended by DNA polymerase and ligated to form D-loop structures (Chowdhury, Choi, & Brault, 2013). In addition to these steps, homologous recombination requires changes to chromatin around the site of damage, which is effected by DDR proteins such as ATM. Mao *et al* reported that presenescent cells displayed a severe decline in the ability to recruit RAD51, key protein of the HR pathway, to DNA damage sites after irradiation (Mao et al., 2012). Interestingly, exogenous incorporation of RAD51 rescued the repair ability in middle-aged cells but failed to do so in

presenescent cells. Which indicates that, past a certain point, additional RAD51 does not contribute to repair; therefore, there must be other causes either for the inability to recruit this repair factor or the attrition of the HR pathway. As we will discuss in the next paragraph, the age-related changes in the nuclear envelope and in the chromatin organization could be the key to understand the DDR protein difficulties to repair de DSB.

*Age-related changes in the nuclear and chromatin organization that may be hindering proper DNA repair*

Age-related changes have been found in the main components of the peripheral nuclear matrix: the nuclear lamina and the nuclear pore complexes. These changes can also indirectly originate heterochromatin reorganization and changes in their epigenetic status. Recent studies have highlighted the relevance of the nuclear matrix architecture in genomic instability and aging. In this section we intended to review the literature that relates these changes to observed repair kinetics age-decline in efficiency and fidelity.

The nuclear matrix is a protein network responsible for the chromatin organization and the maintenance of nuclear structure. It is also involved in DNA replication, transcription, RNA splicing and DNA repair ( Cremer T et al., 2000). A-type lamins are type V intermediate filaments found in the nuclear matrix and the nuclear lamina forming a meshwork throughout the nucleoplasm. Four splice variants of A type lamins are encoded by the LMNA gene whose major products are lamin A and the smaller lamin C (Lin & Worman, 1993). A-type lamins participate in many essential nuclear processes: they give shape to the nucleus, maintain an appropriate distribution of the NPCs and are implicated in nuclear envelope breakdown and assembly during mitosis. Lamin A also contributes to DNA replication and repair, gene transcription and silencing, and chromatin remodeling (Goldman et al., 2004; Horne, n.d.; Mewborn et al., 2010; Oberdoerffer & Sinclair, 2007). The relation between lamins and aging has been established through the study of laminopathies such as Hutchinson-Gilford progeria syndrome. Hutchinson-Gilford progeria syndrome is a rare condition of premature aging caused by a mutation in the LMNA gene. LMNA gene is first translated into prelamin A, which undergoes many processing steps to produce mature lamin A (Furukawa, Inagaki, & Hotta, 1994; Machiels et al., 1996). In the majority of the Hutchinson-Gilford progeria syndrome cases, the mutation generates a mutant prelamin A protein, called progerin, which cannot be normally incorporated into the nuclear lamina. There are other less common mutations that lead to a simple accumulation of the immature and no functional, prelamin A (Goldman et al., 2004). Both mutations types cause changes in gene expression, heterochromatin organization and failure of proper DNA repair (B. Liu et al., 2005). The accumulation of prelamin A, the immature form of lamin A, has also been reported in dermal fibroblasts from old individuals



(Scaffidi & Misteli, 2006) as well as in *in vitro* aged human fibroblasts (Cao, Capell, Erdos, Djabali, & Collins, 2007) and in aged *C. elegans* (Haithcock et al., 2005). Ragnauth *et al* 2013 also found a prelamin A accumulation on aged vascular smooth muscle cells and suggested that the cause was an age-related deficiency of the protein in charge of the post translational modification of prelamin A. Thus, the immature, prelamin A accumulation in normal aging may be inducing the same alterations reported in the already mentioned laminopathies such as defective DNA repair, changes in heterochromatin organization and telomere attrition.

Lamin deficiencies also lead to changes in heterochromatin and nuclear chromatin structure. The majority of eukaryotic nuclei display a conservative nuclear architecture with euchromatin mainly occupying internal nuclear regions, whereas heterochromatin primarily underlies the nuclear envelope between the nuclear pores and around the nucleolus. There are lamin A/C dependent mechanisms tethering heterochromatin to the nuclear envelope. Lamins deterioration causes the untethering of the heterochromatin domains from the periphery and also a general heterochromatin re-organization consisting of progressive loss and re-localization of condensed chromatin areas (Lattanzi et al., 2007). Lamin depletion can induce the degradation of certain heterochromatin protein 1 (HP1) isoforms by means of epigenetic changes in histone methylation also prompting the heterochromatin disassembly from the periphery (Chaturvedi & Parnaik, 2010). Confining of the repetitive elements into heterochromatin domains prevents impaired recombination. Therefore, if the heterochromatin organization is disturbed, illegitimate re-joining could take place leading to unstable chromosome rearrangements. In fact, the elevated mutation rates in heterochromatin-like domains suggest that chromatin packing may impact the DNA damage detection or repair (Schuster-Böckler & Lehner, 2012). In addition, the reported HP1 degradation can also affect the DNA damage response efficiency since it has been found that depleting cells of HP1 produced a delay in the repair of DSBs due to a reduced recruitment of BRCA1 at the DSB site (Lee, Kuo, Stark, Shih, & Ann, 2013). Thus, if cells accumulate immature form of lamina A with age, through heterochromatin reorganization, epigenetic deregulation and inefficient DNA repair, genomic instability could be compromised.

In addition to the lamins-associated changes, the age-related changes of nuclear pore complexes (NPCs) can also contribute to the DDR deterioration. The dysfunction of the nuclear pore complexes can result in the loss of proteins essential to the maintenance of the chromatin organization and DNA repair. NPCs work as gatekeepers of the nucleus, allowing the free diffusion of small molecules but tightly regulating the transport of macromolecules (Fernandez-Martinez & Rout, 2009). By using *C. elegans*, M D'Angelo *et al* reported that some of the scaffold nucleoporins were exceptionally long-lived (D'Angelo, Raices, Panowski, & Hetzer, 2009). They suggested that

the lack of turnover was responsible for their deterioration by means of age-related oxidative stress accumulation (Savas, Toyama, Xu, Yates, & Hetzer, 2012). Importantly, it has been described that the damaged NPCs are more permeable, which causes leaking of cytoplasmic proteins into the nucleus (D'Angelo et al., 2009). The leakiness of the pores resulted in the accumulation of cytoplasmic tubulin which have been described in many mammals and linked to the aging process as well as to neurodegenerative diseases (D'Angelo et al., 2009)(Woulfe, 2007). To sum up, with age progression, the role of the nuclear lamina as a chromatin organizer is prone to be compromised and so are the nuclear pore complexes which became more permeable, putting at risk the genome integrity.

*Ionizing radiation: increases the number of lesions and corrodes the already oxidized DNA repair tools*

All the age-related changes described above such as the lamins deficiency, the heterochromatin reorganization, the epigenetic deregulation, the leaking pores and the subsequent inefficient DNA repair obstruct the proper repair of the radio-induced lesions. Thus, the increased radiosensitivity of aged cells may be consequence of already dysfunctional systems trying to cope with the damage raised by IR.

In addition, the mechanisms that must be defending the cells from the radiation attack are not only affected by the age progression but the radiation itself impedes the correct development of their tasks (Figure 4). Ionizing radiation does not only induce an increased number of DSBs but also disturbs the nuclear organization by means of ROS production. Lamins and NPC, as proteins, could be functionally modified by the free radicals that can emerge from both accumulation with age and IR. Indeed, both the nuclear pores and the lamins have an interesting interplay with the oxidative stress system. In the damaged nuclear pores, the nucleoporins that were lost with age presented a significant increase in the levels of protein carboxyl groups, indicative of oxidative protein damage (D'Angelo et al., 2009). Indeed, increased amounts of these groups were found in the old nuclei versus the young nuclei and at the same time, the number of leaky pores increased. As it has been proposed, if aged cells present deteriorated NPC, irradiating them would definitely promote further protein oxidation and compromising of the nuclear envelope barrier. In turn, when lamins suffer chronic or highly acute oxidative stress, irreversible oxidative damage is induced to their conserved cysteine residues and the loss of their function (Pekovic et al., 2011; Sieprath, Darwiche, & De Vos, 2012).

Thus, in terms of allowing a correct DNA repair, the aged cells may be doubly disadvantaged in response to radiation since the tools required for repair are deteriorated with age and because of radiation itself. Studies in LMNA null fibroblast in mice reported a compromised efficiency of the NHEJ and HR pathways, by affecting both DDR proteins and telomere structure and function (Gonzalez-Suarez et al., 2009). In this line, other studies proved that MEF as well as MCF-7 lamins-deficient cells displayed increased radiosensitivity in comparison with their controls cells (Redwood et al., 2011). They established that A-type lamins are responsible for the stabilization of the pRb family (pRb, p107, and p130), as well as 53BP1, preventing them from their degradation by the proteasome (Redwood et al., 2011). Lamin depletion may cause 53BP1 degradation, impeding the accumulation of 53BP1 at the DSB which results in a compromised NHEJ pathway (B. Liu et al., 2005; Redwood et al., 2011). The lamin loss also leads to defects in the HR pathway due to a formation of p130/E2F4 complexes which bind RAD51 and BRCA1 gene promoters inhibiting their transcription (Haithcock et al., 2005; Redwood et al., 2011). These studies demonstrated that A-type lamins promote genomic integrity by maintaining the levels of key proteins involved in DNA repair mechanisms óHR and NHEJó and in cell cycle regulation óRb family membersó. If we relate this data with our studies on *in vitro* aged HMECs which displayed a delayed activation of the repair system we might postulate that our cells could also have suffered the consequences of age-related changes on nuclear organization. The observed delay had consequences in terms of chromosome instability: after irradiating the aged cells, the number of radio-induced micronuclei was greater than in young cells (Hernández et al., 2013). We can conclude that the aging process, which is a multifactorial process, induces a decline on repair and, when taking chromosome instability as an endpoint, such decline makes aged cells become more radiosensitive.

## 5. Conclusions

There are many factors at a cellular level involved in the relationship between radiation sensitivity and age. These factors provide a plausible explanation of the increased carcinogenic risk of radiation in the elderly as reported by epidemiological studies in different cohorts. In brief, the ageing process makes difficult to repair the radiation-induced lesions, which remain unrepaired and constitute a platform for genomic instability that can lead to the carcinogenic events that we see in the population.

As summarized in this article, radiation is more of a threat to the genome integrity of the aged cells; however several relevant questions concerning molecular underlying mechanisms existing behind this effect remain unsolved. After reviewing some of the most recent works is possible to summarize that the age-related oxidative stress accumulation disturbs the nuclear organization,

which in turn may impede a proper repair. As nuclear organization is also disturbed by ionizing radiation, aged cells, with their cell fitness already compromised, become an easy target for suffering enhanced effects after irradiation. Therefore, despite needing further investigation on this field with respect to mammalian cells, age-related changes in nuclear organization can provide an explanation for the inefficient repair extensively reported in aged cells with respect to their young counterparts. This DDR deterioration results in the accumulation of genomic rearrangements contributing to the loss of tissue functionality and the increased incidence of tumorigenesis that was reported by different epidemiological studies. The intricate interplay between these aging-related defects acts as a confounding factor making very difficult to study a factor in an independent manner. Thus, studies that provide an integrated view are necessary for a better understanding and improvement of the experiments design.

In summary, any barrier that impedes or delays the proper radio-induced DSBs repair constitutes a first step on the road to genomic instability. During normal aging many barriers are lifted: increasing amount of ROS species, progressive telomere shortening, deleterious DNA repair and changes in the nuclear and chromatin organization. Thus, in this complicated scenario, radiation is another bump in the road of preserving genome integrity. As radiosensitivity increases with age, the radiation protection measures also need to be greater to ensure that, in spite of the increasing life expectancy, the elderly keep being protected.

## **References**

- Adelfalk, C., Lorenz, M., Serra, V., von Zglinicki, T., Hirsch-Kauffmann, M., & Schweiger, M. (2001). Accelerated telomere shortening in Fanconi anemia fibroblasts--a longitudinal study. *FEBS letters*, 506(1), 2266.
- Andersen, H. R., Nielsen, J. B., Nielsen, F., & Grandjean, P. (1997). Antioxidative enzyme activities in human erythrocytes. *Clinical chemistry*, 43(4), 56268.
- Bekker-Jensen, S., & Mailand, N. (2010). Assembly and function of DNA double-strand break repair foci in mammalian cells. *DNA repair*, 9(12), 1219628.  
doi:10.1016/j.dnarep.2010.09.010
- Benderitter, M., Pouget, J. P., & Voisin, P. (2003). The Cell Membrane as a Biosensor of Oxidative Stress Induced by Radiation Exposure : A Multiparameter Investigation The Cell Membrane as a Biosensor of Oxidative Stress Induced by Radiation Exposure : A Multiparameter Investigation. *Radiation Research Society*, 159(4), 4716483.

- Buffenstein, R., Edrey, Y. H., Yang, T., & Mele, J. (2008). The oxidative stress theory of aging: embattled or invincible? Insights from non-traditional model organisms. *Age (Dordrecht, Netherlands)*, 30(2-3), 996109. doi:10.1007/s11357-008-9058-z
- Campisi J, Andersen JK, Kapahi P, M. S. (2011). Cellular senescence: a link between cancer and age-related degenerative disease? *Semin Cancer Biol.*, 21(6), 3546359. doi:10.1016/j.semcancer.2011.09.001.Cellular
- Cao, K., Capell, B. C., Erdos, M. R., Djabali, K., & Collins, F. S. (2007). A lamin A protein isoform overexpressed in Hutchinson-Gilford progeria syndrome interferes with mitosis in progeria and normal cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(12), 4949654. doi:10.1073/pnas.0611640104
- Castella, M., Puerto, S., Creus, a, Marcos, R., & Surralles, J. (2007). Telomere length modulates human radiation sensitivity in vitro. *Toxicology letters*, 172(1-2), 29636. doi:10.1016/j.toxlet.2007.05.012
- Chem, J. B., Cells, H., Rubio, M. A., Kim, S., & Campisi, J. (2002). DNA : REPLICATION REPAIR AND RECOMBINATION : Reversible Manipulation of Telomerase Expression and Telomere Length : IMPLICATIONS FOR THE IONIZING RADIATION RESPONSE AND Miguel A . Rubio , Sahn-Ho Kim and Judith Reversible Manipulation of Telomerase Expres. doi:10.1074/jbc.M203747200
- Chen, J.-H., Hales, C. N., & Ozanne, S. E. (2007). DNA damage, cellular senescence and organismal ageing: causal or correlative? *Nucleic acids research*, 35(22), 7417628. doi:10.1093/nar/gkm681
- Chowdhury, D., Choi, Y. E., & Brault, M. E. (2013). Charity begins at home: non-coding RNA functions in DNA repair. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 14(3), 18169. doi:10.1038/nrm3523
- Colgin, L. M., & Reddel, R. R. (1999). Telomere maintenance mechanisms and cellular immortalization. *Current opinion in genetics & development*, 9(1), 976103.
- døAdda di Fagagna, F., Reaper, P. M., Clay-Farrace, L., Fiegler, H., Carr, P., Von Zglinicki, T., í Jackson, S. P. (2003). A DNA damage checkpoint response in telomere-initiated senescence. *Nature*, 426(6963), 19468. doi:10.1038/nature02118
- DøAngelo, M. a, Raices, M., Panowski, S. H., & Hetzer, M. W. (2009). Age-dependent deterioration of nuclear pore complexes causes a loss of nuclear integrity in postmitotic cells. *Cell*, 136(2), 284695. doi:10.1016/j.cell.2008.11.037
- De Lange, T. (2005). Shelterin: the protein complex that shapes and safeguards human telomeres. *Genes & development*, 19(18), 2100610. doi:10.1101/gad.1346005
- Espejel, S., Martín, M., Klatt, P., Martín-Caballero, J., Flores, J. M., & Blasco, M. a. (2004). Shorter telomeres, accelerated ageing and increased lymphoma in DNA-PKcs-deficient mice. *EMBO reports*, 5(5), 50369. doi:10.1038/sj.embor.7400127
- Feng, Z., Hu, W., Teresky, A. K., Hernando, E., Cordon-Cardo, C., & Levine, A. J. (2007). Declining p53 function in the aging process: a possible mechanism for the increased tumor

incidence in older populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(42), 1663368. doi:10.1073/pnas.0708043104

Fernandez-Martinez, J., & Rout, M. P. (2009). Nuclear pore complex biogenesis. *Current opinion in cell biology*, 21(4), 603612. doi:10.1016/j.ceb.2009.05.001

Gisselsson, D., Jonson, T., Petersén, a, Strömbeck, B., Dal Cin, P., Höglund, M., í Mandahl, N. (2001). Telomere dysfunction triggers extensive DNA fragmentation and evolution of complex chromosome abnormalities in human malignant tumors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(22), 1268368. doi:10.1073/pnas.211357798

Gisselsson, D., Pettersson, L., Höglund, M., Heidenblad, M., Gorunova, L., Wiegant, J., í Mandahl, N. (2000). Chromosomal breakage-fusion-bridge events cause genetic intratumor heterogeneity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(10), 5357662. doi:10.1073/pnas.090013497

Goldman, R. D., Shumaker, D. K., Erdos, M. R., Eriksson, M., Goldman, A. E., Gordon, L. B., í Collins, F. S. (2004). Accumulation of mutant lamin A causes progressive changes in nuclear architecture in Hutchinson-Gilford progeria syndrome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(24), 896368. doi:10.1073/pnas.0402943101

Goytisolo, F. a, Samper, E., Martín-Caballero, J., Fannon, P., Herrera, E., Flores, J. M., í Blasco, M. a. (2000). Short telomeres result in organismal hypersensitivity to ionizing radiation in mammals. *The Journal of experimental medicine*, 192(11), 1625636.

Hagan, C. O., Chang, S., Maser, R. S., Mohan, R., Artandi, S. E., Chin, L., & Depinho, R. A. (2002). Telomere dysfunction provokes regional amplification and, 2(August), 1496155.

Haithcock, E., Dayani, Y., Neufeld, E., Zahand, A. J., Feinstein, N., Mattout, A., í Liu, J. (2005). Age-related changes of nuclear architecture in *Caenorhabditis elegans*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(46), 1669065. doi:10.1073/pnas.0506955102

Hamilton, M. L., Van Remmen, H., Drake, J. a, Yang, H., Guo, Z. M., Kewitt, K., í Richardson, a. (2001). Does oxidative damage to DNA increase with age? *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(18), 10469674. doi:10.1073/pnas.171202698

Herbig, U., Ferreira, M., Condel, L., Carey, D., & Sedivy, J. M. (2006). Cellular senescence in aging primates. *Science (New York, N.Y.)*, 311(5765), 1257. doi:10.1126/science.1122446

Hernández, L., Terradas, M., Martín, M., Feijoo, P., Soler, D., Tusell, L., & Genescà, A. (2013a). Increased mammogram-induced DNA damage in mammary epithelial cells aged in vitro. *PloS one*, 8(5), e63052. doi:10.1371/journal.pone.0063052

Hernández, L., Terradas, M., Martín, M., Feijoo, P., Soler, D., Tusell, L., & Genescà, A. (2013b). Increased mammogram-induced DNA damage in mammary epithelial cells aged in vitro. *PloS one*, 8(5), e63052. doi:10.1371/journal.pone.0063052

Hoffelder, D. R., Luo, L., Burke, N. a, Watkins, S. C., Gollin, S. M., & Saunders, W. S. (2004). Resolution of anaphase bridges in cancer cells. *Chromosoma*, 112(8), 389697. doi:10.1007/s00412-004-0284-6

- Holthausen, J. T., Wyman, C., & Kanaar, R. (2010). Regulation of DNA strand exchange in homologous recombination. *DNA repair*, 9(12), 1264672. doi:10.1016/j.dnarep.2010.09.014
- Horne, M. C. (n.d.). Cell Cycle Analysis by DNA Flow Cytometry DNA Flow Cytometry : Analysis of Cellular Growth , Proliferation , Cell Cycle Distribution , and Apoptotic Cell Death in a Population Flow Cytometry and Cell Sorting : An Introduction ò FACS ò has become a generic, 1622.
- Inal, M. E., Kanbak, G., & Sunal, E. (2001). Antioxidant enzyme activities and malondialdehyde levels related to aging. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*, 305(1-2), 75680.
- Jackson, S. P., & Bartek, J. (2010). The DNA-damage response in human biology and disease. *Nature*, 461(7267), 107161078. doi:10.1038/nature08467.The
- Kregel, K. C., & Zhang, H. J. (2007). An integrated view of oxidative stress in aging: basic mechanisms, functional effects, and pathological considerations. *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology*, 292(1), R18636. doi:10.1152/ajpregu.00327.2006
- Lapointe, J., & Hekimi, S. (2010). When a theory of aging ages badly. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*, 67(1), 168. doi:10.1007/s00018-009-0138-8
- Latre, L. (2003). Shortened telomeres join to DNA breaks interfering with their correct repair. *Experimental Cell Research*, 287(2), 2826288. doi:10.1016/S0014-4827(03)00134-4
- Lattanzi, G., Columbaro, M., Mattioli, E., Cenni, V., Camozzi, D., Wehnert, M., í Capanni, C. (2007). Pre-Lamin A processing is linked to heterochromatin organization. *Journal of cellular biochemistry*, 102(5), 1149659. doi:10.1002/jcb.21467
- Lee, Y.-H., Kuo, C.-Y., Stark, J. M., Shih, H.-M., & Ann, D. K. (2013). HP1 promotes tumor suppressor BRCA1 functions during the DNA damage response. *Nucleic acids research*, 41(11), 5784698. doi:10.1093/nar/gkt231
- Li, L., Zhang, L., Fan, J., Greenberg, K., Desiderio, S., Rassool, F. V., & Small, D. (2011). Defective nonhomologous end joining blocks B-cell development in FLT3/ITD mice. *Defective nonhomologous end joining blocks B-cell development in FLT3/ITD mice*, 117(11), 313163139.
- Lieber, M. R. (2010). NHEJ and its backup pathways in chromosomal translocations. *Nature structural & molecular biology*, 17(4), 39365. doi:10.1038/nsmb0410-393
- Lin, F., & Worman, H. J. (1993). Structural organization of the human gene encoding nuclear lamin A and nuclear lamin C. *The Journal of biological chemistry*, 268(22), 1632166.
- Liu, B., Wang, J., Chan, K. M., Tjia, W. M., Deng, W., Guan, X., í Zhou, Z. (2005). Genomic instability in laminopathy-based premature aging. *Nature medicine*, 11(7), 78065. doi:10.1038/nm1266
- Liu, D., & Xu, Y. (2011). p53, Oxidative Stress, and Aging, 15(6).

- Lo, A. W. I., Sabatier, L., Fouladi, B., Pottier, G., Ricoul, M., & Murnane, J. P. (2002). DNA amplification by breakage/fusion/bridge cycles initiated by spontaneous telomere loss in a human cancer cell line. *Neoplasia (New York, N.Y.)*, 4(6), 53168. doi:10.1038/sj.neo.7900267
- Mao, Z., Tian, X., Meter, M. Van, Ke, Z., Gorbunova, V., & Seluanov, A. (2012). Sirtuin 6 ( SIRT6 ) rescues the decline of homologous recombination repair during replicative senescence. *PNAS*, 6(29), 11800611805. doi:10.1073/pnas.1200583109/-/DCSupplemental.www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1200583109
- Mcilrath, J., Bouffler, S. D., Samper, E., Cuthbert, A., Wojcik, A., Szumiel, I., & Newbold, R. F. (2001). Telomere Length Abnormalities in Mammalian Radiosensitive Cells Advances in Brief Telomere Length Abnormalities in Mammalian Radiosensitive Cells 1, 9126915.
- Meeker, A. K., Hicks, J. L., Iacobuzio-donahue, C. A., Montgomery, E. A., Westra, W. H., Chan, T. Y., & Marzo, A. M. De. (2004). Telomere Length Abnormalities Occur Early in the Initiation of Epithelial Carcinogenesis Telomere Length Abnormalities Occur Early in the Initiation of Epithelial Carcinogenesis, 331763326.
- Metcalf JA, Parkhill J, Campbell L, Stacey M, Biggs P, Byrd PJ, T. A. (1996). Accelerated telomere shortening in ataxia telangiectasia.
- Mewborn, S. K., Puckelwartz, M. J., Abuisneineh, F., Fahrenbach, J. P., Zhang, Y., MacLeod, H., & McNally, E. (2010). Altered chromosomal positioning, compaction, and gene expression with a lamin A/C gene mutation. *PloS one*, 5(12), e14342. doi:10.1371/journal.pone.0014342
- Montine, T. J., Neely, D., F, Q. J., & Flint, B. (2002). LIPID PEROXIDATION IN AGING BRAIN AND ALZHEIMER'S DISEASE THOMAS. *Free Radical Biology & Medicine*, 33(5), 6206626.
- Murnane, J. P. (2006). Telomeres and chromosome instability. *DNA repair*, 5(9-10), 1082692. doi:10.1016/j.dnarep.2006.05.030
- Murnane, J. P., & Sabatier, L. (2004). Chromosome rearrangements resulting from telomere dysfunction and their role in cancer. *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology*, 26(11), 1164674. doi:10.1002/bies.20125
- Niki, E. (2009). Lipid peroxidation: physiological levels and dual biological effects. *Free radical biology & medicine*, 47(5), 469684. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2009.05.032
- Oberdoerffer, P., & Sinclair, D. a. (2007). The role of nuclear architecture in genomic instability and ageing. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 8(9), 6926702. doi:10.1038/nrm2238
- Pekovic, V., Gibbs-Seymour, I., Markiewicz, E., Alzoughaibi, F., Benham, A. M., Edwards, R., & Hutchison, C. J. (2011). Conserved cysteine residues in the mammalian lamin A tail are essential for cellular responses to ROS generation. *Aging cell*, 10(6), 1067679. doi:10.1111/j.1474-9726.2011.00750.x
- Pérez, V. I., Bokov, A., Van Remmen, H., Mele, J., Ran, Q., Ikeno, Y., & Richardson, A. (2009). Is the oxidative stress theory of aging dead? *Biochimica et biophysica acta*, 1790(10), 1005614. doi:10.1016/j.bbagen.2009.06.003



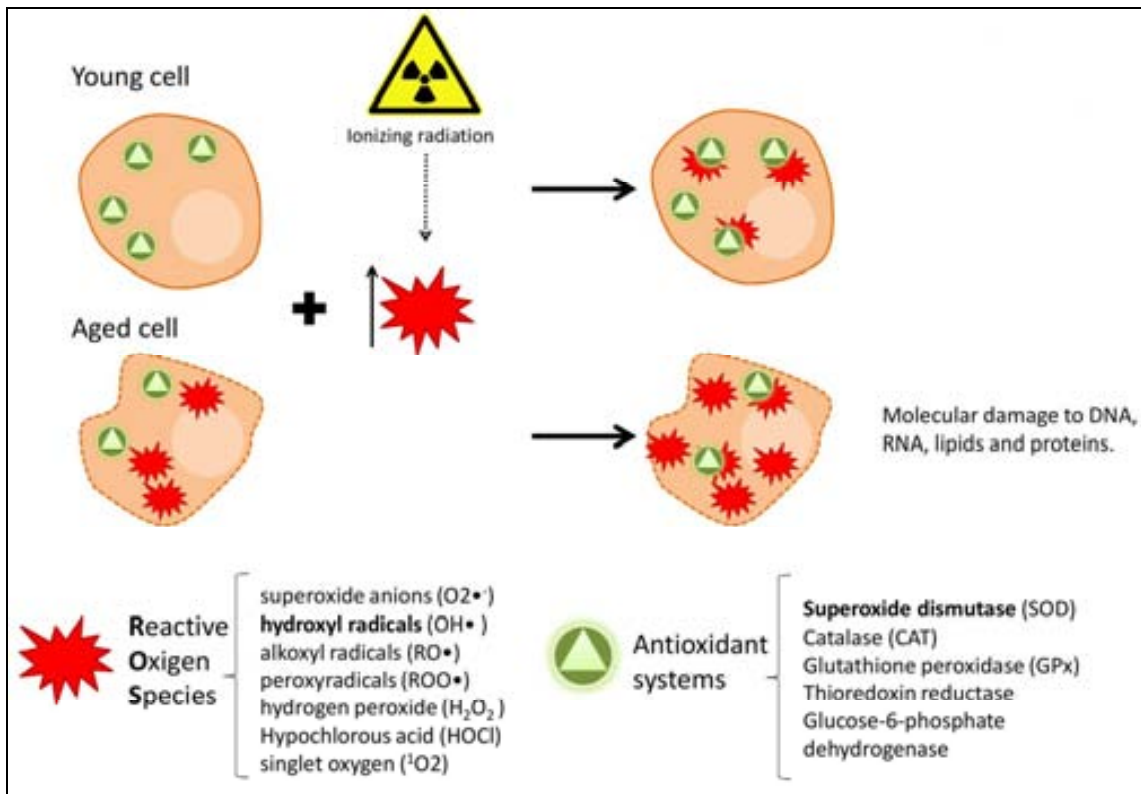
- Puthiyaveetil, A. G., & Caudell, D. L. (2013). Non homologous end joining-mediated DNA break repair is impaired in B lymphocytes of aging mice. *Molecular immunology*, 53(1-2), 79687. doi:10.1016/j.molimm.2012.07.001
- Ranganathan, V., Heine, W. F., Ciccone, D. N., Rudolph, K. L., Wu, X., Chang, S., & Weaver, D. T. (2001). Rescue of a telomere length defect of Nijmegen breakage syndrome cells requires NBS and telomerase catalytic subunit. *Current biology : CB*, 11(12), 96266.
- Richardson, D. B., & Wing, S. (1999). Greater sensitivity to ionizing radiation at older age : follow-up of workers at Oak Ridge National Laboratory through 1990, 4286436.
- Rogakou, E. P., Pilch, D. R., Orr, A. H., Ivanova, V. S., & Bonner, W. M. (1998). DNA Double-stranded Breaks Induce Histone H2AX Phosphorylation on Serine 139 \*, 273(10), 585865868.
- Savas, J. N., Toyama, B. H., Xu, T., Yates, J. R., & Hetzer, M. W. (2012). Extremely long-lived nuclear pore proteins in the rat brain. *Science (New York, N.Y.)*, 335(6071), 942. doi:10.1126/science.1217421
- Scaffidi, P., & Misteli, T. (2006). Lamin A-Dependent Nuclear Defects in Human Aging. *Science*, 312(5776), 105961063.
- Sedelnikova, O. a, Horikawa, I., Redon, C., Nakamura, A., Zimonjic, D. B., Popescu, N. C., & Bonner, W. M. (2008). Delayed kinetics of DNA double-strand break processing in normal and pathological aging. *Aging cell*, 7(1), 896100. doi:10.1111/j.1474-9726.2007.00354.x
- Seluanov, A., Danek, J., Hause, N., & Gorbunova, V. (2007). Changes in the level and distribution of Ku proteins during cellular senescence. *DNA Repair*, 6(12), 174061748. doi:10.1016/j.dnarep.2007.06.010.Changes
- Seluanov, A., Mittelman, D., Pereira-Smith, O. M., Wilson, J. H., & Gorbunova, V. (2004). DNA end joining becomes less efficient and more error-prone during cellular senescence. *PNAS*, 101(20), 762469. doi:10.1073/pnas.0400726101
- Shuryak, I., Sachs, R. K., & Brenner, D. J. (2010). Cancer risks after radiation exposure in middle age. *Journal of the National Cancer Institute*, 102(21), 1628636. doi:10.1093/jnci/djq346
- Sieprath, T., Darwiche, R., & De Vos, W. H. (2012). Lamins as mediators of oxidative stress. *Biochemical and biophysical research communications*, 421(4), 63569. doi:10.1016/j.bbrc.2012.04.058
- Soler, D., Genescà, A., Arnedo, G., Egozcue, J., & Tusell, L. (2005). Telomere dysfunction drives chromosomal instability in human mammary epithelial cells. *Genes, chromosomes & cancer*, 44(4), 339650. doi:10.1002/gcc.20244
- Soler, D., Pampalona, J., Tusell, L., & Genescà, A. (2009). Radiation sensitivity increases with proliferation-associated telomere dysfunction in nontransformed human epithelial cells. *Aging cell*, 8(4), 414625. doi:10.1111/j.1474-9726.2009.00488.x
- T. Cremer\* (1, 2), G. Kreth (3, 2+), H. Koester (4), R.H.A. Fink (5), R. Heintzmann (3), M. Cremer (1), I. Solovei (1), D. Zink (1), C. Cremer\* (3, 2). (2000). NUCLEAR MATRIX : AN INTEGRATED VIEW OF THE FUNCTIONAL NUCLEAR, 2000, 1669.

- Tusell, L., Pampalona, J., Soler, D., Frías, C., & Genescà, A. (2010). Different outcomes of telomere-dependent anaphase bridges. *Biochemical Society transactions*, 38(6), 16986703. doi:10.1042/BST0381698
- Wong, K. K., Chang, S., Weiler, S. R., Ganesan, S., Chaudhuri, J., Zhu, C., & DePinho, R. a. (2000). Telomere dysfunction impairs DNA repair and enhances sensitivity to ionizing radiation. *Nature genetics*, 26(1), 8568. doi:10.1038/79232
- Woo, Y., Wright, S. M., Maas, S. a, Alley, T. L., Caddle, L. B., Kamdar, S., & Mills, K. D. (2007). The nonhomologous end joining factor Artemis suppresses multi-tissue tumor formation and prevents loss of heterozygosity. *Oncogene*, 26(41), 6010620. doi:10.1038/sj.onc.1210430
- Wyman, C., & Kanaar, R. (2006). DNA double-strand break repair: all's well that ends well. *Annual review of genetics*, 40, 363683. doi:10.1146/annurev.genet.40.110405.090451

### **Figure legends**

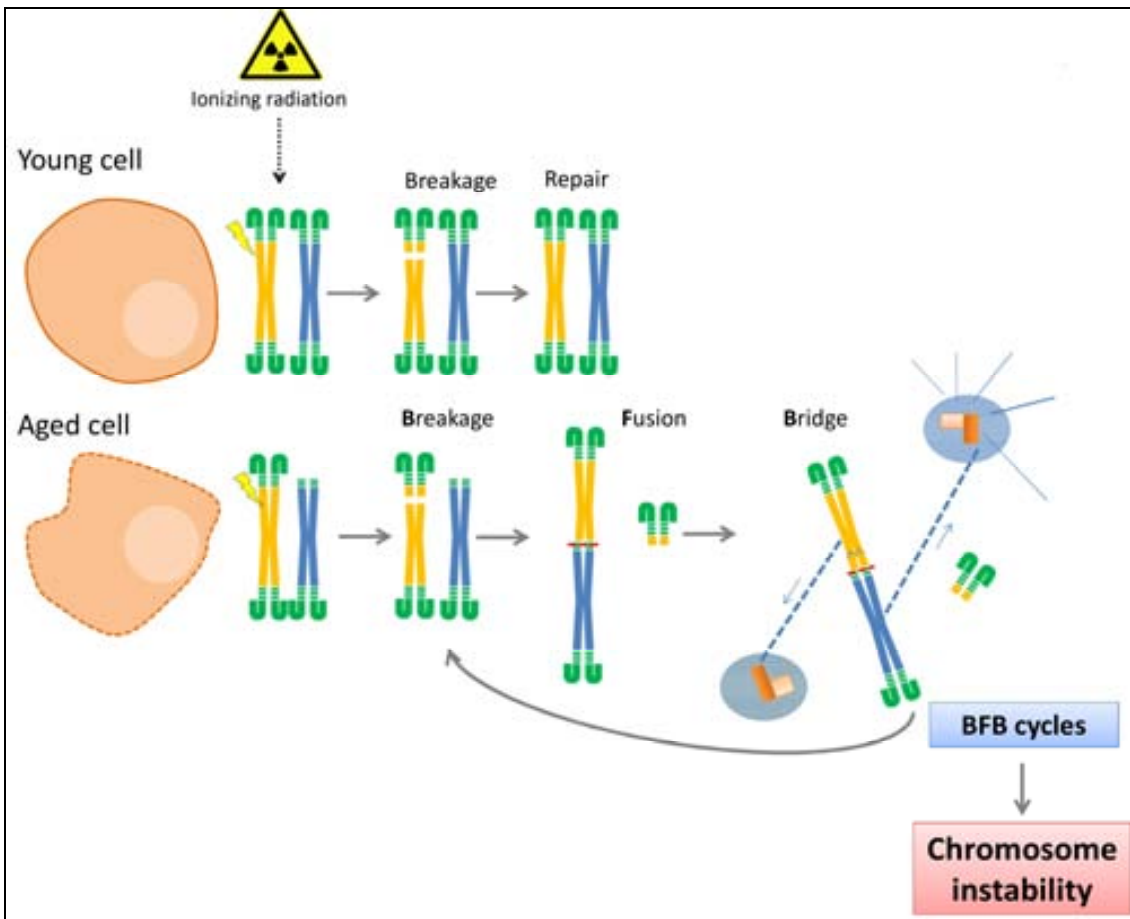
#### **FIGURE 1**

**Schematic representation of the oxidative stress accumulation with age and the synergic effect of ionizing radiation.** ROS production is greater in aged cells in comparison to their young counterparts; in addition, in those cells the antioxidant system is also compromised. This scenario leads to the accumulation of high levels of ROS in aged cells. When adding ionizing radiation into this equation, the system becomes oversaturated resulting in increased amounts of cell damage in aged cells. Red stars represent the reactive oxygen species (ROS) and the green triangles the antioxidant systems/enzymes.



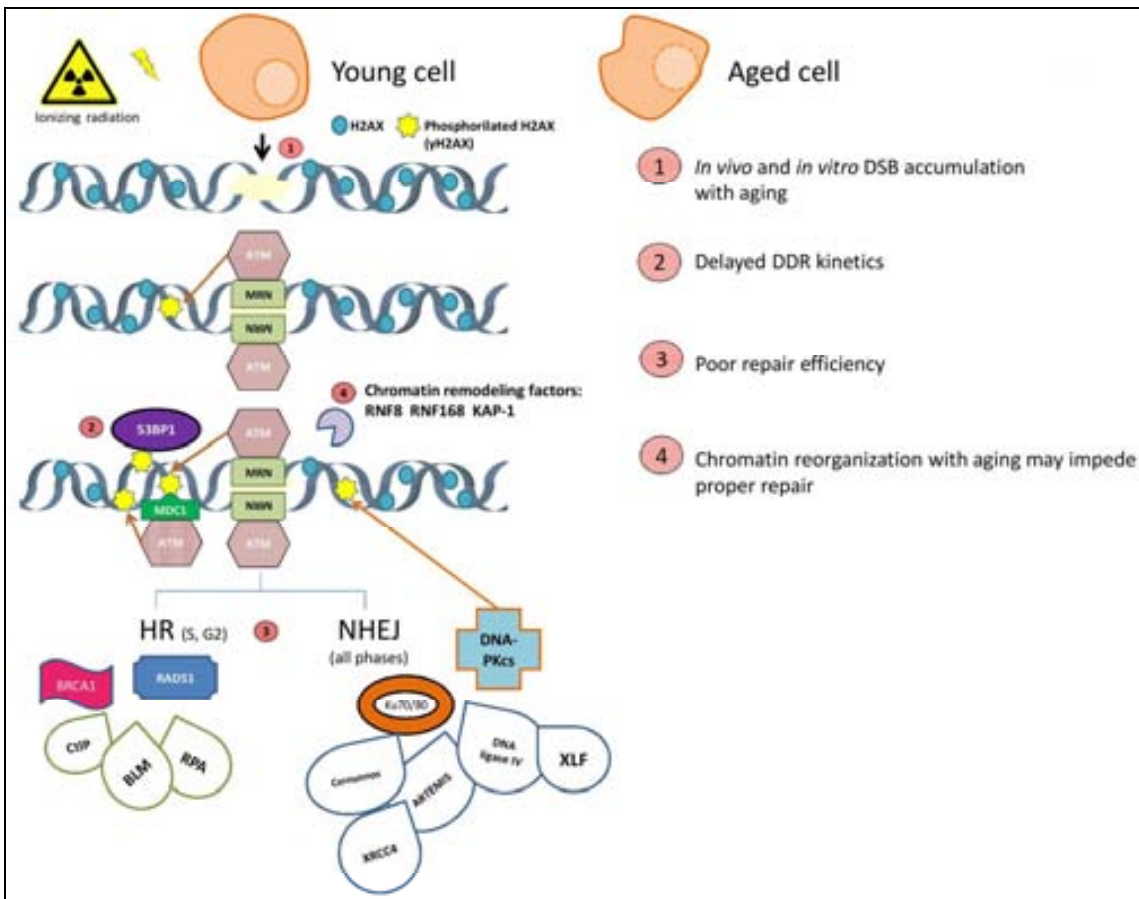
**FIGURE 2**

**Effects of telomere attrition and radiation on aged cells.** Ionizing radiation induces new DSBs and thus, new opportunities for the uncapped chromosomes to undergo unfaithful repair. As aged cells display a greater number of dysfunctional telomeres their chances to suffer rearrangements are higher. They can suffer end-to-end fusions and DSB-end fusions (as represented in the scheme) between different chromosomes. When the two centromeres are pulled in different directions, dicentric chromosome can break and this breakage results in further fusions followed by other bridges and, again, new breaks will arise. This process is known as the Breakage-Fusion-Bridge cycle (BFB cycles), which leads to broad DNA amplification and progressive terminal deletions, until the chromosome becomes stable. Once it does, it has different outcomes: chromosome gains or losses and further rearrangements. Any of these outcomes lead to a raise in chromosome instability.



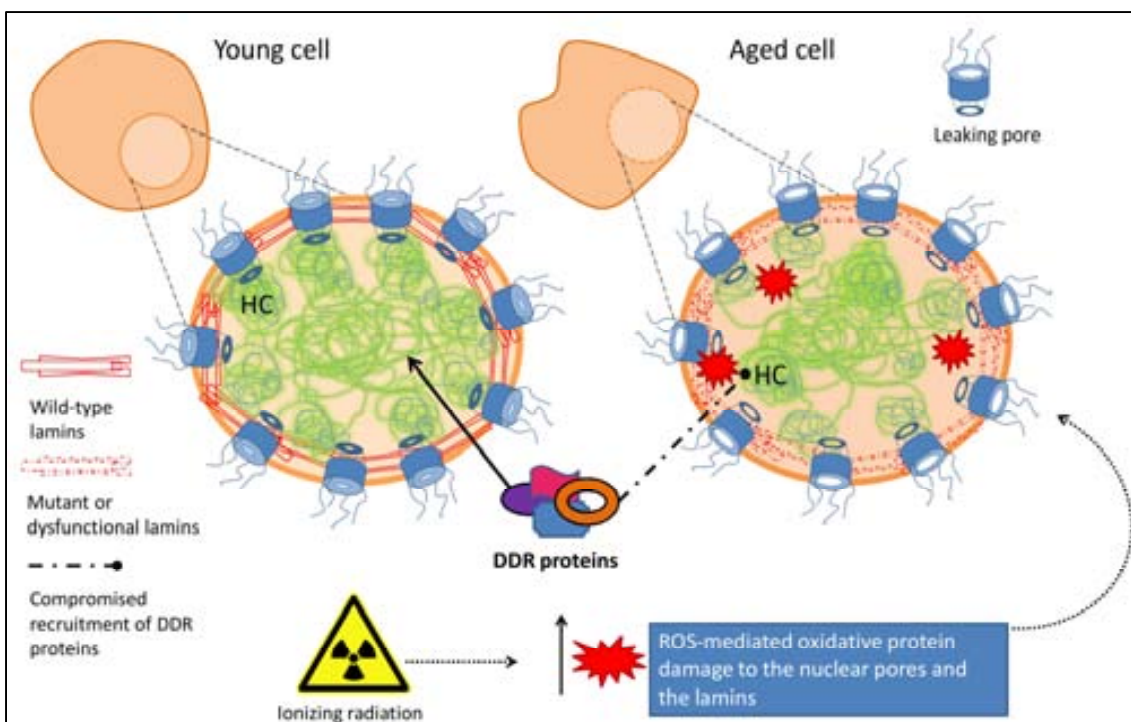
**FIGURE 3**

**Scheme of the activation of the DDR following a DSBs induction on young and aged cells.** The signaling pathway starts with the MRN complex recruitment and continues with ATM phosphorylating H2AX (to form  $\gamma$ -H2AX) in DSB-flanking chromatin to trigger MDC1 and 53BP1 assembly and subsequent binding of ubiquitin ligase RNF8 and other chromatin remodeling factors. Proteins from both the NHEJ and HR pathways are also recruited at the damage site in order to repair the DSB. Aged cells suffer a decline on the DDR efficiency at different points of this response, in the scheme these points are represented by numbers (1-4). (For further details see the text)



**FIGURE 4**

**Scheme of the age related defects in nuclear reorganization.** The ageing process entails changes at the nuclear organization level that may be compromising the DDR proteins recruitment to the nucleus: accumulation of a premature and dysfunctional prelamin A, untethering of the heterochromatin (HC) domains and increased presence of leaking pores. The addition of radiation by means of ROS production also hinders their functionality.







# Discussió general

---

*We will not rise to criticize someone else's idea unless we are prepared to offer an alternative idea of our own.*  
*Anonymous*





## 1. Baixes dosis de radiació

---

El càncer de mama és el tipus de tumor més incident en la població de dones de Catalunya representant un 28% del total de casos diagnosticats entre els anys 2003 i 2007. S'han descrit diversos factors de risc en relació al desenvolupament d'aquesta malaltia: l'exposició única o fraccionada a dosis altes de radiació ionitzant, certes mutacions hereditàries, el nombre de vegades que s'ha donat llum, l'edat al primer part, l'obesitat i l'ús d'anticonceptius orals, entre d'altres. Alguns procediments de diagnòstic (especialment les mamografies) s'han relacionat amb un increment en el risc de partir càncer de mama, tot i que els estudis epidemiològics que van examinar aquesta relació no han estat conclouents. Alimentant així els debats pel que fa a la relació entre el benefici i el risc dels programes de cribratge mamogràfic. Per això, aquest treball es va plantejar amb l'objectiu de valorar de manera concreta l'efecte de les mamografies sobre cèl·lules epitelials mamàries humanes, omplint el buit d'informació que deixen els estudis epidemiològics que no tenen el poder estadístic suficient per determinar els riscos de dosis tant baixes de radiació. Evitant així extrapolar els riscos des de dosis altes de radiació o des de qualitats de radiació diferents. En el moment que vàrem iniciar l'experimental hi havia força estudis que havien investigat els efectes de les dosis baixes de radiació (**taula 1**). La conclusió principal dels estudis recollits en la taula 1 són que la RBE (*relative biological effectiveness*) incrementa quan l'energia dels rajos X disminueix, determinant que els rajos X emesos a baixes energies poden infligir una quantitat de dany major. S'arriba a aquesta conclusió des de paràmetres d'estudi diferents; l'assaig de la co-localització d' $\gamma$ H2AX i 53BP1, l'anàlisi d'aberracions cromosòmiques, assaig de micronuclis i avaluació de la capacitat de transformació neoplàsica. Però, tot i que és inqüestionable la riquesa de les aportacions d'aquests estudis, en la majoria d'aquests l'energia utilitzada i el tipus cel·lular no eren els més adequats per examinar la resposta cel·lular al dany radio-induït per un mamografia. Per a fer una estimació realista i per una implementació en els càlculs dels riscos a nivell de radioprotecció cal que els paràmetres d'estudi, les dosis i els models cel·lular s'aproximin al màxim a les situacions clíniques reals. Fins aquell moment, els que feien una

aproximació més òptima, irradiaven les cèl·lules amb 0.5 Gy, amb una energia de 25 kV i amb cèl·lules epitelials mamàries humanes transformades o immortalitzades (Beyreuther, Dörr, Lehnert, Lessmann, & Pawelke, 2009)

Referència	Cèl·lules	Dosi (Gy)	Energia aplicada (raigs X)	Paràmetres d'estudi	Conclusions de l'estudi
Beyreuther et al. (2009a)	Epitelials humanes immortalitzades 184A1 i MCF-10A	0,5 - 6	10kV, 25 kV	Co-localització de H2AX i 53BP1.	Incrementa la RBE quan l'energia dels raig X disminueix.
Beyreuther et al. (2009b)	Epitelials humanes immortalitzades 184A1 i MCF-12A	0,5 - 6	10kV, 25 kV	Nombre de trencaments cromosòmics i aberracions.	Incrementa la RBE quan l'energia dels raig X disminueix.
Lehnert et al. (2008)	Humanes immortalitzades MCF-12A	0,5-10	10kV	Assaig de MN i de clonogèricitat.	Incrementa la RBE quan l'energia dels raig X disminueix.
Lehnert et al. (2006)	Humanes immortalitzades MCF-12A	0,5-10	25 kV	Assaig de MN i de clonogèricitat.	El valor de la RBE és superior a 1.
Heyes and Mill (2004)	Híbrid HeLa X fibroblast humà línia cel·lular CGL1	<0,5	29 kVp	Transformació neoplàsica.	Conclouen que la RBE és 5 vegades més gran que en el cas d'utilitzar 200 kVp.
Ko et al. (2004)	Híbrid HeLa X fibroblast de pell línia cel·lular CGL1	0,0005-0,220	28 kVp	Transformació neoplàsica.	Taxa de transformació major en dosis > 11 mGy i menor a dosis <11mGy
Slonina et al. (2003)	HEK primàries humanes	1-5	25 kVp	Assaig de MN.	RBE més gran que 1.
Schmid et al. (2002)	Linfòcits humans d'una donant	0,114-0,2194	29 kVp	Inducció de trencaments de DNA i recompte d'aberracions cromosòmiques.	Incrementa la RBE quan l'energia dels raig X disminueix.

\*RBE *Relative biological effectiveness*

\*\*kVp on la p vol dir que l'aparell emet al nombre màxim assenyalat però també emet raigs X d'energies per sobre i per sota d'aquell nombre

Per això, els nostres estudis volien respondre a la necessitat d'estudiar què passava quan l'energia utilitzada provenia d'un mamògraf i quan les cèl·lules eren epitelials mamàries humanes no transformades i obtingudes de dones sanes. Així doncs, es va escollir com a dosi mínima d'irradiació la dosi rebuda per la superfície de la mama en una sola exploració mamogràfica (0.01Gy per dispar, mínim dos dispars efectuats) (**Treball 1**). Per poder monitoritzar els efectes del dany radio-induït per les mamografies també es va optar per assajos com el seguiment de la fosforilació de H2AX o la presència de micronuclis, prou sensibles com per detectar dany causat a dosis baixes o molt baixes de radiació. Així, es va

poder distingir la presència de dany en les mostres irradiades, fins i tot quan només havien rebut la quantitat de radiació equivalent a una sola exploració mamogràfica (0.02 Gy).

El nostre plantejament inicial era assegurar-nos que, tot i treballar amb dosis molt baixes, s'activaven els sistemes de resposta de la DDR. Rothkman i Löbrich, van observar que després de la inducció del dany a dosis molt baixes els sistemes de resposta de la DDR no eren activats i que, per aquest motiu, un nombre més gran de DSB es quedaven oberts, sense ser reparats (Rothkamm & Löbrich, 2003). Aquestes observacions es feien a dosis molt baixes de radiació (0.0012 Gy), el nostre estudi va confirmar que després d'una irradiació amb 0.02 Gy, 2 hores post irradiació les HMECs donaven resposta al dany de manera efectiva. Així doncs, es va confirmar que les dosis utilitzades mitjançant l'ús d'un aparell mamogràfic generaven DSBs en les cèl·lules epitelials mamàries i que aquestes iniciaven de manera efectiva una resposta. A partir d'aquí vàrem centrar el nostre interès en el fet que aquesta resposta no era igual d'efectiva en cèl·lules joves que en cèl·lules que havien envellit en cultiu.

## **2. Alentiment de la resposta al dany en el DNA en les cèl·lules envellides *in vitro***

---

L'anàlisi de la presència de DSBs radio-induïts va mostrar, que, dues hores després de la irradiació, les cèl·lules de *population doublings* més avançats mostraven una quantitat de dany radio-induït més elevada que les cèl·lules de *population doublings* inicials (**Treball 1**). Aquest augment es podia observar després de 10 dispars (0.1 Gy) amb l'aparell mamogràfic i sorprenentment, després d'únicament 2 dispars (0.02 Gy). Considerant que els DSBs radio-induïts inicialment havien estat els mateixos en unes mostres i en les altres, aquest augment només es podia explicar en base a un alentiment en la reparació dels trencaments de doble cadena. En aquest sentit, el seguiment de les proteïnes que són reclutades en els punts de trencament, com 53BP1, era essencial per avaluar la nostra hipòtesi. Si les cèl·lules de PD més avançats mostraven un retard en l'aparició de 53BP1 en els DSBs, com va ser el cas, es podria concloure que les cèl·lules envellides *in vitro* presentaven una cinètica de reclutament de la proteïna al lloc de la lesió més lenta que les joves. Aquest alentiment explicava la persistència

de DSBs no reparats durant temps més llargs post-irradiació. Per tant el treball realitzat fa una aportació essencialment diferent als estudis fets fins al moment: l'envelliment *in vitro* suposava un augment de la radiosensibilitat en termes de lentitud en la reparació. Per tant, per una banda observàvem que un sola exploració era suficient per infligir prou dany com per activar la DDR, però s'afegia un nou factor a tenir en compte: l'envelliment de les cèl·lules.

Cal afegir que Collin i col·laboradors l'any 2011 van publicar un estudi on, per primera vegada, s'avaluaven els efectes de les mamografies sobre cèl·lules epitelials mamàries no transformades (fent ús de la dosi equivalent a la rebuda a la glàndula mamària 0.002 Gy) en 30 dones classificades segons el risc de patir càncer de mama. Situant-les en un grup d'alt risc quan tenien un historial familiar rellevant de risc de patir càncer de mama o d'ovaris o bé quan donaven positiu per alguna mutació susceptible de desencadenar un càncer de mama (Colin et al., 2011). La tècnica emprada també fou el seguiment de la fosforilació de  $\gamma$ H2AX 10 min i 24 h post irradiació, observant un augment en el nombre de cèl·lules amb foci tant en els 10 min després de la irradiació com al cap de 24h en les mostres irradiades. Aquest augment era més rellevant en les mostres de les donants amb historial de risc de càncer de mama que en les donants de risc menor. Així doncs, malgrat els seus experiments es van realitzar amb dosis més baixes de radiació que les utilitzades en el nostre estudi, també van detectar l'activació de la DDR en forma de fosforilació de  $\gamma$ H2AX en el lloc del dany. De manera significativa cal destacar que les cèl·lules de les donants de més risc mostraven un alentiment en la desaparició dels foci radio-induïts. De manera significativa, aquest alentiment nosaltres l'observem en les cèl·lules envellides *in vitro*. En canvi en el seu estudi especifiquen que la diferència entre donants d'edats diferents no és significativa: no es detecten diferències en el nombre de foci en relació amb l'edat de la donant. Cal remarcar que, tot i treballar en un rang ampli d'edat (de 20 anys a 68 anys), la mitjana d'edat de les donants estudiades és de gairebé 46 anys i l'estudi no comprèn una població gaire representativa de donants de menors de 30 anys. També és important tenir en compte que per veure l'efecte edat agrupen les donants d'alt i baix risc de patir càncer de mama. En definitiva, tant la manca de representativitat de

les donants joves en les donants estudiades per Collin i col·laboradors com l'agrupament d'aquestes donants per estudiar l'efecte de l'edat fan difícil comparar els resultats del seu estudi amb els nostres. No obstant això, cal fer una reflexió sobre l'ús de la pròpia tècnica de seguiment de la fosforilació de la histona H2AX. S'entén que la desaparició d'un foci és equivalent a la reparació d'un DSB, això ens pot dur a pensar, erròniament, que si aquests acaben desapareixent, és igual si ho fan en 2 o en 24 hores. A partir dels nostres estudis podem afirmar que aquelles cèl·lules que reparaven més lentament els DSBs mostraven un increment en el nombre de micronuclis, com en el cas de les HMECs de PDs avançats després de l'exposició a dos dispars sota el mamògraf (0.02 Gy). En canvi, fent ús de la mateixa dosi, quan la resposta de la DDR era més ràpida no es veia augment del nombre de micronuclis per cèl·lula. En resum, escollint dos únics punts d'anàlisi de la presència de dany es pot perdre informació respecte a l'efectivitat de la resposta.

### **3. Descartant la contribució de la disfunció telomèrica en l'alentiment de la DDR de les cèl·lules envellides**

---

Davant dels resultats, basats en el seguiment de 53BP1, que mostraven un alentiment de la DDR en les cèl·lules de PD més avançats i per tant, amb una major erosió telomèrica, es va voler determinar si la disfunció telomèrica contribuïa a aquesta resposta. Estudis previs al nostre treball havien determinat que hi havia un augment en la radiosensibilitat degut a la disfunció telomèrica però que les vies de reparació dels DSBs no quedaven afectades per aquest. Wong i col·laboradors van determinar que els ratolins amb els telòmers més curts eren més radiosensibles, alhora van demostrar que l'estatus funcional dels telòmers no tenia una influència determinant en l'eficàcia del procés de reparació per la via NHEJ (Wong et al., 2000). Goytisolo i col·laboradors en un estudi similar també observen aquest increment en la radiosensibilitat dels ratolins que havien patit un escurçament telomèric i corroboren que les vies de reparació HR i NHEJ funcionen de manera correcta (Goytisolo et al., 2000). En el nostre laboratori i en altres, es va anar un pas més enllà demostrant que aquest increment en el nombre d'aberracions era degut a la fusió dels DSBs radio-induïts amb els telòmers

desprotegits de les cèl·lules de PDs més avançats. Aquest fet es va determinar mesurant l'augment en la inducció d'aberracions cromosòmiques (nombre de cromosomes dicèntrics i fragments acèntrics) després d'irradiar amb 1 Gy en les HMECs amb els telòmers més curts (Soler, Pampalona, Tusell, & Genescà, 2009).

Per altra banda, Drissi i col·laboradors també havien observat que l'escurçament telomèric alterava la cinètica de la DDR després de la irradiació (0,4 Gy); observant, mitjançant el seguiment dels foci d'histona, que en les cèl·lules de major PD mostraven una velocitat de reparació inferior que les cèl·lules més joves (Drissi, Wu, Hu, Bockhold, & Dome, 2011). En el seu estudi, realitzat en cèl·lules Hela, van determinar que després de transduir amb hTERT, es solucionava el problema de la cinètica alentida de reparació dels foci d'histona: les cinètiques de reparació tornaven a ser com les de PDs inicials.

En el nostre estudi es van voler tenir en compte tant els estudis que descartaven la relació entre els telòmers i les vies de reparació com els que sostenien que la transducció amb hTERT podia revertir el fenotip alentit de reparació de les cèl·lules envellides *in vitro*. Per fer-ho, es van transduir les HMECs de PDs avançats amb la subunitat hTERT de la telomerasa i es analitzar la seva cinètica de reparació. Després de transduir les cèl·lules de PD avançats, no es va observar una recuperació de la velocitat de desaparició dels foci d'histona. Segurament si s'hagués valorat la inducció d'aberracions cromosòmiques d'aberracions en les nostres cèl·lules abans i després de la transducció, el nombre d'aquestes s'hagués vist reduït amb el guany de longitud telomèrica. En el nostre estudi, però, només es va voler valorar si velocitat de reparació del DSBs augmentava amb la transducció amb hTERT i la conclusió és que no es recupera. El fet que els nostres resultats no coincideixin amb Dressi i col·laboradors pot raure en l'ús d'un tipus cel·lular o un altre; es coneix que no tots els teixits tenen el mateix grau de radiosensibilitat, i de fet, el teixit mamari és especialment radiosensible. D'altra banda, també és important recordar que les cèl·lules HeLa són tumorals i poden haver desenvolupat mecanismes que permeten una major eficiència de la DDR que les cèl·lules HMECs no tumorals. També es podria plantejar la possibilitat que la discrepància en els resultats sigui a causa del moment en que es va realitzar la transducció ja que les cèl·lules obtingues en el

treball 1 es van transduir a PDs avançats i que les cèl·lules utilitzades en el nostre estudi estiguin més estressades degut a haver estat més temps en cultiu i que això doni lloc a una DDR deficient. Com es discuteix en el proper apartat, els resultats en BPECs de diferents donants semblen descartar que l'estrès en cultiu sigui la única causa de l'alentiment.

#### **4. Mesurant les diferències interindividuais de radiosensibilitat causades per l'edat**

---

Per poder determinar l'efecte de l'envelliment cel·lular en la DDR de manera independent al estrès acumulat al llarg dels PDs del cultiu es va treballar amb les BPEC de donants d'edats diferents transduïdes amb hTERT a PDs molt inicials. Concretament, es volia esbrinar si hi havia diferències interindividuais de sensibilitat a la radiació entre donants i si l'edat tenia una influència en aquestes. Es van comparar les cèl·lules de les diferents donants a PD similars, per evitar que l'envelliment del cultiu influís en la cinètica de reparació. Per fer-ho va ser essencial la posta a punt d'una tècnica automatitzada i sensible de seguiment de la fosforilació de H2AX, degut al elevat nombre de mostres i temps post-irradiació a analitzar. L'ús d'aquesta tècnica va permetre establir, que la lentitud en la reparació dels DSBs, no només apareixia a mesura que augmentaven el nombre de passes en cultiu, sinó que també augmentava amb l'edat de la donant. El resultat obtingut, molt preliminar degut al nombre reduït de mostres estudiades, mostrava que en augmentar l'edat de la donant disminuïa la seva capacitat de reparar els trencaments de cadena doble. Indicant que el procés normal d'envelliment també podria estar limitant aquesta capacitat.

L'establiment d'aquesta tècnica automatitzada de recompte també ens va duu a recollir els elements a tenir en compte per fer un seguiment dels foci d'histona en l'estudi de la radiosensibilitat. Com figura en l'apartat 3.2 de la introducció, hi ha diferents tècniques per seguir la fosforil·lació i desfosforil·lació dels foci d'histona. Al llarg de l'experimental es va treballar amb les 3 tècniques esmentades. La principal conclusió de l'ús d'aquestes per la detecció de la  $\gamma$ H2AX és que tant la tècnica de western blot com la tècnica de citometria de flux són molt menys sensibles que el recompte de foci mitjançant microscòpia de

fluorescència. Així com 0,02 Gy són suficients per veure diferències entre les mostres irradiades i les mostres control quan els visualitzem en el microscopi, cal irradiar amb un mínim de 0,5 Gy per observar diferències en els temps post irradiació analitzats quan s'utilitzen tècniques de western blot o de citometria de flux. En el cas del western blot, l'increment en el nombre de foci radio-induïts podria quedar emmascarat darrera els canvis en la intensitat de la senyal de  $\gamma$ H2AX deguts a les variacions del cicle cel·lular indistingibles fent ús d'aquesta tècnica. Quan en podem distingir la fase del cicle cel·lular, com en la tècnica de citometria de flux, s'observa que les cèl·lules irradiades tenen una major permeabilitat que les cèl·lules control. Provocant una eliminació de l'excés de anticòs secundari més efectiva en les cèl·lules irradiades, fent que les cèl·lules control mostrin una fluorescència de base més elevada que les cèl·lules irradiades. Malgrat aquesta variació es pot corregir avaluant l'emissió de fluorescència de l'anticòs secundari sol en cadascuna de les mostres, creiem que és un dels motius de la menor sensibilitat de la tècnica. L'altre desavantatge és que es perd informació pel que fa al nombre de foci per cèl·lula. Per altra banda la tècnica de recompte manual de foci en el microscopi també té les seves desavantatges: implica una inversió de temps molt gran, l'investigador pot fer un recompte esbiaixat i davant de foci de diferents mides (molt característics de la detecció de  $\gamma$ H2AX) és complex definir el llindar de recompte. Per això l'establiment de mètodes automatitzats de recompte de foci pot ser molt útil: la sensibilitat de la tècnica és manté intacte, hi ha una bona correlació amb els resultats obtinguts manualment i, si es defineixen paràmetres de cicle cel·lular mitjançant marcadors com la pericentrina, es pot realitzar el recompte en una fase en que els canvis de d'intensitat de H2AX dependents de fase no afectin al resultat. A més, el temps dedicat per part de l'investigador, així com el biaix que pugui introduir, es redueixen de manera molt notable.

## **5. Possibles causes de l'alentiment de la DDR amb l'envelliment i qüestions per resoldre**

---

Després d'arribar a la conclusió que en protegir les cèl·lules HMEC i les BPEC de l'escurçament telomèric no s'evitava el deteriorament de la DDR ens vàrem preguntar quins



altres canvis patia una cèl·lula en el seu procés d'envelliment i per extensió, al llarg dels seus population doublings en el cultiu in vitro, que n'augmentaven la seva radiosensibilitat. Per respondre aquesta pregunta es va revisar de manera exhaustiva la bibliografia sobre els sistemes cel·lulars que poden patir un detriment amb l'edat, centrada en els factors rellevants alhora d'explicar l'increment en la radiosensibilitat que hi trobem associat. La revisió va donar lloc al treball 3 (Apartat 2 de l'Annex de resultats) on s'estructura una explicació que convergeix en el fet que les cèl·lules envellides perden la capacitat de reparar correctament. Es poden agrupar els factors influents en la relació entre la radiosensibilitat i l'edat segons si contribueixen a l'aparició de trencaments de cadena doble, com són l'augment en l'estrès oxidatiu o l'erosió telomèrica, o si en dificulten la seva reparació com passa amb els canvis en l'estructura nuclear que comporten el deteriorament de la DDR. Aquests factors i les relacions que s'estableixen entre ells acaben suposant una amenaça a la integritat genòmica de les cèl·lules envellides. La conclusió més general d'aquest treball és que la relació entre la radiosensibilitat i l'edat és multifactorial.

Un estudi com aquest respon moltes de les preguntes plantejades a l'inici del projecte i en el transcurs d'aquest, però alhora deixa obertes moltes qüestions. Tots els estudis tenen les seves limitacions, en el nostre la pregunta que ha quedat sense resposta ha estat: existeix una equivalència entre els PD en cultiu i l'edat de la donant?. Mentre que aquesta pregunta es queda sense resposta, amb l'estudi realitzat en donants d'edats diferents, veiem que fixant el population doubling i valorant la diferència en l'eficàcia de reparació entre donants d'edats diferents continuem apreciament aquesta lentitud en la DDR. Així, a falta de poder determinar aquesta relació entre el PD de les cèl·lules en cultiu i l'edat de la donant si que sembla, que l'edat de la donant podria disminuir la capacitat de reparació de les lesions.

També ens preguntem, seguint el fil de l'article de revisió, quina és la influència dels canvis en l'organització a nivell nuclear relacionats amb l'edat en les cèl·lules utilitzades? Caldria revisar si en les línies cel·lulars on s'ha observat un detriment de la DDR amb l'edat també hi tenen lloc els canvis en l'estructura nuclear descrits en la literatura: pèrdua de la funcionalitat

de la lamina A o augment de la permeabilitat dels porus nuclear. Es podria estudiar si hi ha una acumulació de la forma immadura de la lamina A en les cèl·lules que porten més temps en cultiu i quina relació s'estableix amb els elements de la DDR que han de ser reclutats en els DSBs. En aquest sentit s'han realitzat estudis preliminars amb marcadors de nucleoporines i de lamina B, on s'intentava veure tant els efectes de la radiació com els efectes de l'envelliment en seva organització i disposició en la membrana nuclear. Tot i que encara no s'ha determinat com quantificar aquests canvis, s'ha pogut observar una disminució en la densitat de les nucleoporines després de dosis altes de radiació. S'hauria de poder establir si en el procés d'envelliment de les cèl·lules també hi ha una pèrdua de les nucleoporines dels porus nuclears. Si aquesta pèrdua té lloc caldria esbrinar quines conseqüències té l'augment de la permeabilitat de la membrana nuclear alhora d'infligir dany en el DNA i de reparar-lo.

Per altra banda, també hagués estat interessant fer una comparativa entre les dues fonts emissores utilitzades (l'aparell mamogràfic i la font emissora de rajos gamma) fent ús d'una mateixa dosi. Així es podria determinar l'existència de diferències en l'eficàcia de la reparació o si el tipus de lesió és més complexa en el cas d'irradiar amb un mamògraf. També s'hauria pogut determinar si les cèl·lules amb les que hem treballat després de rebre dosis tant baixes de radiació, equivalents a 2 o a 10 dispars amb un mamògraf, tenien la capacitat d'aturar el cicle cel·lular en el punt de control G2. Els nostres experiments no han avaluat aquesta aturada i per tant, no podem saber si el dany a nivell cromosòmic és més elevat en les cèl·lules velles degut a la falta temps per reparar sumat a la lentitud de la resposta, es podria especular que és així, però caldria comprovar-ho. Tindria sentit fer l'estudi d'aquesta aturada en les cèl·lules que han mostrat un reclutament alentit de 53BP1 si es té en compte que hi ha estudis, en cèl·lules deficientes en 53BP1 que mostren defectes en el punt de control G2/M després de dosis baixes de radiació i no després de dosis més elevades (Fernandez-Capetillo et al., 2002; Nakamura et al., 2006).

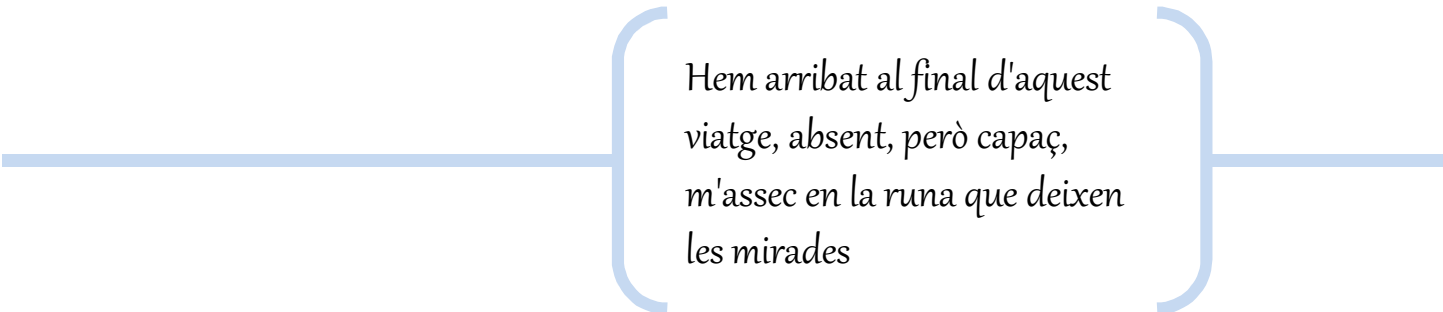
Per últim, caldria augmentar el nombre de mostres del treball realitzat amb donants de diferents edats per veure si es manté la relació entre l'augment de la radiosensibilitat amb

l'edat de la donant. Si és així, caldrà fer una reflexió en dos sentits diferents. Primer caldrà reflexionar sobre quins models cel·lulars s'estan utilitzant per avaluar l'efecte de l'envelliment. En el nostre treball de revisió hem pogut certificar que el terme "aged cells" s'utilitza tant per parlar de cèl·lules senescentes com per parlar de cèl·lules pre-senescentes. Aquestes darreres serien equivalents a les que nosaltres anomenem de PDs tardans. Estrictament el terme està ben utilitzat ja que totes són cèl·lules envellides però cal preguntar-se si és el mateix fer un estudi en cèl·lules senescentes, i que per tant no proliferen, que en cèl·lules que han patit un procés d'envelliment però que encara no són senescentes? Sovint la recerca es centra en les cèl·lules senescentes perquè s'ha vist que poden canviar l'ambient de les cèl·lules que les envolten i influir tant en el seu envelliment com en la carcinogènesi (Campisi J, Andersen JK, Kapahi P, 2011). També és important estudiar-les perquè, com ja hem vist, la seva presència en els organismes que envelleixen és creixent (Herbig, Ferreira, Condel, Carey, & Sedivy, 2006). Davant dels resultats que hem obtingut creiem que és igualment rellevant, o fins i tot més, estudiar l'envelliment amb models proliferatius que emulin els patrons d'envelliment dels organismes. Aquesta idea es veuria encara més reforçada si els resultats obtinguts amb les cèl·lules BPEC es reproduïssin en un nombre major de donants. Això ens portaria a reflexionar sobre la necessitat que en les equacions que estableixen els risc derivats de l'exposició a radiacions ionitzants es tingués en compte el factor de l'edat. Tot i que per fer-ho, caldria acabar de definir en més profunditat la relació entre la manca d'integritat genòmica en el procés de l'envelliment, la possible transformació neoplàstica que se'n derivés i el paper de les radiacions de energia baixa i d'alta RBE, com són les mamografies, en aquesta transformació. Aquesta reflexió també hauria de conduir, en termes de radioprotecció, a polítiques més estandarditzades en els programes de cribratge mamogràfic on la balança entre el benefici i el risc sempre estigués inclinada cap al benefici.





# Conclusions



*Hem arribat al final d'aquest  
viatge, absent, però capaç,  
m'assec en la runa que deixen  
les mirades*



## Conclusions

---

Des de la preocupació envers els riscos derivats dels programes de cribratge mamogràfic en la població i la impossibilitat d'estimar-los de manera completa a partir d'estudis epidemiològics, es va estudiar la radiosensibilitat de les cèl·lules epitelials mamàries arribant a les següents conclusions:

- Les dosis de radiació utilitzades en el transcurs d'aquest treball mitjançant l'ús d'un aparell mamogràfic generen un increment significatiu en el nombre de DSBs en les cèl·lules epitelials mamàries. En les HMECs envellides *in vitro* aquest increment s'observa després d'irradiar les cèl·lules amb únicament 2 dispars de raigs X al mamògraf.
- S'observa un augment significatiu del dany a nivell citogenètic després d'irradiar les HMECs amb 10 dispars. De manera rellevant però, després de 2 dispars de raigs X únicament les HMECs envellides *in vitro*, i no en les joves, presenten un increment significatiu en el nombre de DSBs radio-induïts.
- En les cèl·lules epitelials mamàries envellides *in vitro*, HMECs i BPECs, s'observa un alentiment en la resposta al dany en el DNA, que pot contribuir a la seva radiosensibilitat. La introducció exògena del gen hTERT a les cèl·lules envellides no reverteix l'alentiment en la resposta al dany en el DNA. Això indica que aquest alentiment és causat pel propi envelliment *in vitro* de les cèl·lules més que per l'erosió telomèrica.
- El mètode automatitzat de recompte de foci de  $\gamma$ H2AX posat a punt pel seguiment DDR en cèl·lules epitelials mamàries de diferents donants ha demostrat ser més ràpid però igual de sensible que el recompte manual. A més, és una eina fiable pel recompte de foci radio-induïts que alhora proporciona informació essencial sobre la fase del cicle cel·lular. Els resultats

obtinguts amb aquesta metodologia en BPECs de diferents donants apunta a que alentiment en la DDR no només apareix a mesura que augmenta el nombre de passes en cultiu, sinó que també augmenta amb l'edat de la donant.

- Tenint en compte els nostres resultats i els publicats per altres investigadors podem concloure que existeix una relació multifactorial entre la radiosensibilitat i l'edat. Destacant que la capacitat de les cèl·lules de fer front al dany en el DNA es veu reduïda amb l'envelliment i que aquesta reducció podria contribuir a explicar l'augment dels riscos carcinogènics de l'exposició a radiacions en edats més avançades revelats pels estudis epidemiològics.





# Bibliografia

---

*Words can be like X-rays if you use them properly -- they'll go through anything. You read and you're pierced.*

*Aldous Huxley, Brave New World*



## A

---

- Ahnesorg, P., Smith, P., & Jackson, S. P. (2006). XLF interacts with the XRCC4-DNA ligase IV complex to promote DNA nonhomologous end-joining. *Cell*, 124(2), 301–13. doi:10.1016/j.cell.2005.12.031
- Anderson, R. M., Stevens, D. L., & Goodhead, D. T. (2002). M-FISH analysis shows that complex chromosome aberrations induced by alpha -particle tracks are cumulative products of localized rearrangements. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(19), 12167–72. doi:10.1073/pnas.182426799
- Armanios, M., Alder, J. K., Parry, E. M., Karim, B., Strong, M. a, & Greider, C. W. (2009). Short telomeres are sufficient to cause the degenerative defects associated with aging. *American journal of human genetics*, 85(6), 823–32. doi:10.1016/j.ajhg.2009.10.028
- Artandi, S., Chang, S., Lee, S., & Alson, S. (2000). Telomere dysfunction promotes non-reciprocal translocations and epithelial cancers in mice. *Nature*, 20070(1999), 641–645.

## B

---

- Bailey, C., Giles, A., Czarnota, G. J., & Stanisiz, G. J. (2009). Detection of apoptotic cell death in vitro in the presence of Gd-DTPA-BMA. *Magnetic resonance in medicine: official journal of the Society of Magnetic Resonance in Medicine / Society of Magnetic Resonance in Medicine*, 62(1), 46–55. doi:10.1002/mrm.21972
- Bennardo, N., Cheng, A., Huang, N., & Stark, J. M. (2008). Alternative-NHEJ is a mechanistically distinct pathway of mammalian chromosome break repair. *PLoS genetics*, 4(6), e1000110. doi:10.1371/journal.pgen.1000110
- Berrington de González, a, & Reeves, G. (2005). Mammographic screening before age 50 years in the UK: comparison of the radiation risks with the mortality benefits. *British journal of cancer*, 93(5), 590–6. doi:10.1038/sj.bjc.6602683
- Beyreuther, E., Dörr, W., Lehnert, A., Lessmann, E., & Pawelke, J. (2009). Relative biological effectiveness of 25 and 10 kV X-rays for the induction of chromosomal aberrations in two human mammary epithelial cell lines. *Radiation and Environmental Biophysics*, 48(3), 333–340. doi:10.1007/s00411-009-0221-4
- Bhatia S, Robison LL, Oberlin O, Greenberg M, Bunin G, Fossati-Bellani F, M. A. (1996). BREAST CANCER AND OTHER SECOND NEOPLASMS AFTER CHILDHOOD HODGKIN' S DISEASE. *The New England Journal of Medicine*, 334(12), 746–751.

- Bhatia, S., Yasui, Y., Robison, L. L., Birch, J. M., Bogue, M. K., Diller, L., ... Meadows, A. T. (2003). High risk of subsequent neoplasms continues with extended follow-up of childhood Hodgkin's disease: report from the Late Effects Study Group. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 21(23), 4386–94. doi:10.1200/JCO.2003.11.059
- Blackburn, E. H. (2001). Switching and signaling at the telomere. *Cell*, 106(6), 661–673.
- Blackburn, Elizabeth H, Greider, C. W., & Szostak, J. W. (2006). Telomeres and telomerase: the path from maize, Tetrahymena and yeast to human cancer and aging. *Nature medicine*, 12(10), 1133–8. doi:10.1038/nm1006-1133
- Blasco, M. a, Lee, H. W., Hande, M. P., Samper, E., Lansdorp, P. M., DePinho, R. a, & Greider, C. W. (1997). Telomere shortening and tumor formation by mouse cells lacking telomerase RNA. *Cell*, 91(1), 25–34.
- Boice, J. D., Land, C. E., Shore, R. E., Norman, J. E., & Tokunaga, M. (n.d.). Risk of breast cancer following low-dose radiation exposure.
- Boice Jr, J. D., Preston, D., Davis, F. G., & Monson, R. R. (1991). Frequent Chest X-Ray Fluoroscopy and Breast Cancer Incidence among Tuberculosis Patients in Massachusetts. *Radiation research*, 125(2), 214–222.
- Boonekamp, J. J., Simons, M. J. P., Hemerik, L., & Verhulst, S. (2013). Telomere length behaves as biomarker of somatic redundancy rather than biological age. *Aging cell*, 12(2), 330–2. doi:10.1111/accel.12050
- Buck, D., Malivert, L., de Chasseval, R., Barraud, A., Fondanèche, M.-C., Sanal, O., ... Revy, P. (2006). Cernunnos, a novel nonhomologous end-joining factor, is mutated in human immunodeficiency with microcephaly. *Cell*, 124(2), 287–99. doi:10.1016/j.cell.2005.12.030

## C

---

- Campisi, J., & d'Adda di Fagagna, F. (2007). Cellular senescence: when bad things happen to good cells. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 8(9), 729–40. doi:10.1038/nrm2233
- Cardis, A. E., Vrijheid, M., Blettner, M., Gilbert, E., Hakama, M., Hill, C., ... Cardis, E. (2007). The 15-Country Collaborative Study of Cancer Risk among Radiation Workers in the Nuclear Industry : Estimates of Radiation-Related Cancer Risks The 15-Country Collaborative Study of Cancer Risk among Radiation Workers in the Nuclear Industry : Estimates o.

- Chiu, C., Dragowska, W., Kim, W., Vaziri, H., Yui, J., Thomas, T. E., ... Lansdorp, M. (1996). Rapid Communication Differential Expression of Telomerase Activity in Hematopoietic Progenitors from Adult Human Bone Marrow, 239–248.
- Chowdhury, D., Choi, Y. E., & Brault, M. E. (2013). Charity begins at home: non-coding RNA functions in DNA repair. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 14(3), 181–9. doi:10.1038/nrm3523
- Ciccia, A., & Elledge, S. J. (2010). The DNA damage response: making it safe to play with knives. *Molecular cell*, 40(2), 179–204. doi:10.1016/j.molcel.2010.09.019
- Colin, C., Devic, C., Noël, A., Rabilloud, M., Zobot, M.-T., Pinet-Isaac, S., ... Foray, N. (2011). DNA double-strand breaks induced by mammographic screening procedures in human mammary epithelial cells. *International journal of radiation biology*, 87(11), 1103–12. doi:10.3109/09553002.2011.608410
- Collins, K., & Mitchell, J. R. (2002). Telomerase in the human organism, 564–579. doi:10.1038/sj/onc/1205083

## D

---

- d'Adda di Fagagna, F., Reaper, P. M., Clay-Farrace, L., Fiegler, H., Carr, P., Von Zglinicki, T., ... Jackson, S. P. (2003). A DNA damage checkpoint response in telomere-initiated senescence. *Nature*, 426(6963), 194–8. doi:10.1038/nature02118
- De Lange, T. (2005). Shelterin: the protein complex that shapes and safeguards human telomeres. *Genes & development*, 19(18), 2100–10. doi:10.1101/gad.1346005
- Deckbar, D., Jeggo, P. a, & Löbrich, M. (2011). Understanding the limitations of radiation-induced cell cycle checkpoints. *Critical reviews in biochemistry and molecular biology*, 46(4), 271–83. doi:10.3109/10409238.2011.575764
- DeFazio, L. G., Stansel, R. M., Griffith, J. D., & Chu, G. (2002). Synapsis of DNA ends by DNA-dependent protein kinase. *The EMBO journal*, 21(12), 3192–200. doi:10.1093/emboj/cdf299

## F

---

- Fazel, R., Krumholz, H. M., Wang, Y., Ross, J. S., Chen, J., Ting, H., ... Nallamothu, B. (2009). Exposure to Low-Dose Ionizing Radiation from Medical Imaging Procedures. *The New England Journal of Medicine*, 361(9), 849–857.

- Fenech, M., & Morley, A. A. (1985). Measurement of micronuclei in lymphocytes. *Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects*, 147(1), 29–36.
- Franken, N. a P., ten Cate, R., Krawczyk, P. M., Stap, J., Haveman, J., Aten, J., & Barendsen, G. W. (2011). Comparison of RBE values of high-LET  $\alpha$ -particles for the induction of DNA-DSBs, chromosome aberrations and cell reproductive death. *Radiation oncology (London, England)*, 6(1), 64. doi:10.1186/1748-717X-6-64
- Fumagalli, M., Rossiello, F., Clerici, M., Barozzi, S., Cittaro, D., Kaplunov, J. M., ... d'Adda di Fagagna, F. (2012). Telomeric DNA damage is irreparable and causes persistent DNA-damage-response activation. *Nature cell biology*, 14(4), 355–65. doi:10.1038/ncb2466

## G

---

- Gisselsson, D., Jonson, T., Petersén, a, Strömbeck, B., Dal Cin, P., Höglund, M., ... Mandahl, N. (2001). Telomere dysfunction triggers extensive DNA fragmentation and evolution of complex chromosome abnormalities in human malignant tumors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(22), 12683–8. doi:10.1073/pnas.211357798
- Gisselsson, D., Pettersson, L., Höglund, M., Heidenblad, M., Gorunova, L., Wiegant, J., ... Mandahl, N. (2000). Chromosomal breakage-fusion-bridge events cause genetic intratumor heterogeneity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(10), 5357–62. doi:10.1073/pnas.090013497
- Gorbunova, V., Seluanov, A., & Pereira-Smith, O. M. (2003). Evidence that high telomerase activity may induce a senescent-like growth arrest in human fibroblasts. *The Journal of biological chemistry*, 278(9), 7692–8. doi:10.1074/jbc.M212944200
- Goytisolo, F. a, Samper, E., Martín-Caballero, J., Finnon, P., Herrera, E., Flores, J. M., ... Blasco, M. a. (2000). Short telomeres result in organismal hypersensitivity to ionizing radiation in mammals. *The Journal of experimental medicine*, 192(11), 1625–36.
- Greider, C. W., & Blackburn, E. H. (1985). Identification of a specific telomere terminal transferase activity in Tetrahymena extracts. *Cell*, 43(2), 405–413.

## H

---

- Hagan, C. O., Chang, S., Maser, R. S., Mohan, R., Artandi, S. E., Chin, L., & Depinho, R. A. (2002). Telomere dysfunction provokes regional amplification and, 2(August), 149–155.
- Hartlerode, A., & Scully, R. (2009). Mechanisms of double-strand break repair in somatic mammalian cells. *Biochem. J*, 423(2), 157–168. doi:10.1042/BJ20090942.Mechanisms
- Hayflick, L., & Moorhead, P. S. (1961). The serial cultivation of human diploid cell strains. *Experimental cell research*, 25(3), 585–621.
- Heddle, J. ., & Carrano, A. . (1977). The DNA content of micronuclei induced in mouse bone marrow by  $\gamma$ -irradiation: evidence that micronuclei arise from acentric chromosomal fragments. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 44(1), 63–69.
- Herbig, U., Jobling, W. A., Chen, B. P. C., Chen, D. J., & Sedivy, J. M. (2004). Telomere Shortening Triggers Senescence of Human Cells through a Pathway Involving ATM, p53, and p21CIP1, but Not p16INK4a. *Molecular cell*, 14, 501–513.
- Herrera, E., Samper, E., Martín-Caballero, J., Flores, J. M., Lee, H. W., & Blasco, M. a. (1999). Disease states associated with telomerase deficiency appear earlier in mice with short telomeres. *The EMBO journal*, 18(11), 2950–60. doi:10.1093/emboj/18.11.2950
- Heyes, G. J., & Mill, a J. (2004). The neoplastic transformation potential of mammography X rays and atomic bomb spectrum radiation. *Radiation research*, 162(2), 120–7.
- Holthausen, J. T., Wyman, C., & Kanaar, R. (2010). Regulation of DNA strand exchange in homologous recombination. *DNA repair*, 9(12), 1264–72. doi:10.1016/j.dnarep.2010.09.014
- Huen, M., Grant, R., Manke, I., Minn, K., & Yu, X. (2007). The E3 ubiquitin ligase RNF8 transduces the DNA damage signal via an ubiquitin-dependent signaling pathway. *Cell*, 131(5), 901–914.
- Huen, M. S. Y., Sy, S. M. H., & Chen, J. (2010). BRCA1 and its toolbox for the maintenance of genome integrity. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 11(2), 138–48. doi:10.1038/nrm2831

## J

---

- Jackson, S. P., & Bartek, J. (2010). UKPMC Funders Group The DNA-damage response in human biology and disease, 461(7267), 1071–1078. doi:10.1038/nature08467.The

## K

---

- Kolas, N., Chapman, J., & Nakada, S. (2007). Orchestration of the DNA-damage response by the RNF8 ubiquitin ligase. *Science*, 318(5856), 1637–1640. doi:10.1126/science.1150034.Orchestration
- Krempler, A., Deckbar, D., Jeggo, P. a, & Löbrich, M. (2007). An imperfect G2M checkpoint contributes to chromosome instability following irradiation of S and G2 phase cells. *Cell cycle (Georgetown, Tex.)*, 6(14), 1682–6.
- krueger SA, Collins SJ, Joiner MC, Wilson GD, M. B. (2007). Transition in Survival From Low-Dose Hyper-Radiosensitivity to Increased Radioresistance Is Independent of Activation of ATM SER1981 Activity. *Journal of Radiation Oncology\* Biology\* Physics*, 69(4), 1262–1271.

## L

---

- Latre, L., Tusell, L., Martin, M., Miró, R., Egozcue, J., Blasco, M., & Genescà, A. (2003). Shortened telomeres join to DNA breaks interfering with their correct repair. *Experimental Cell Research*, 287(2), 282–288. doi:10.1016/S0014-4827(03)00134-4
- Lengauer, C., Kinzler, K. W., & Vogelstein, B. (1998). Genetic instabilities in human cancers. *Nature*, 396(6712), 643–9. doi:10.1038/25292
- Lieber, M. R. (2008). The mechanism of human nonhomologous DNA end joining. *The Journal of biological chemistry*, 283(1), 1–5. doi:10.1074/jbc.R700039200
- Lieber, M. R. (2010). NHEJ and its backup pathways in chromosomal translocations. *Nature structural & molecular biology*, 17(4), 393–5. doi:10.1038/nsmb0410-393
- Little, M. P., & Boice Jr, J. D. (1999). Comparison of breast cancer incidence in the Massachusetts tuberculosis fluoroscopy cohort and in the Japanese atomic bomb survivors. *Radiation research*, 151(2), 218–224.
- Little, Mark P, Wakeford, R., Tawn, E. J., Bouffler, S. D., & Berrington de Gonzalez, A. (2009). Risks associated with low doses and low dose rates of ionizing radiation: why linearity may be (almost) the best we can do. *Radiology*, 251(1), 6–12. doi:10.1148/radiol.2511081686
- Lowndes, N. F. (2010). The interplay between BRCA1 and 53BP1 influences death, aging, senescence and cancer. *DNA repair*, 9(10), 1112–6. doi:10.1016/j.dnarep.2010.07.012



Lynch, A. M., & Parry, J. M. (1993). The cytochalasin-B micronucleus/kinetochore assay in vitro: studies with 10 suspected aneugens. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 287(1), 71–86.

## M

---

Mailand, N., Bekker-Jensen, S., Faustrup, H., Melander, F., Bartek, J., Lukas, C., & Lukas, J. (2007). RNF8 ubiquitylates histones at DNA double-strand breaks and promotes assembly of repair proteins. *Cell*, 131(5), 887–900. doi:10.1016/j.cell.2007.09.040

Martínez, A., Coleman, M., Romero-Talamás, C. A., & Frias, S. (2010). An assessment of immediate DNA damage to occupationally exposed workers to low dose ionizing radiation by using the comet assay. *Revista de investigación clínica; organo del Hospital de Enfermedades de la Nutrición*, 62(1), 23–30.

Martínez, P., & Blasco, M. a. (2011). Telomeric and extra-telomeric roles for telomerase and the telomere-binding proteins. *Nature reviews. Cancer*, 11(3), 161–76. doi:10.1038/nrc3025

McIlwraith, M. J., McIlwraith, M. J., Vaisman, A., Liu, Y., Fanning, E., Woodgate, R., & West, S. C. (2005). Human DNA polymerase eta promotes DNA synthesis from strand invasion intermediates of homologous recombination. *Molecular cell*, 20(5), 783–92. doi:10.1016/j.molcel.2005.10.001

Meeker, A. K., Hicks, J. L., Iacobuzio-donahue, C. A., Montgomery, E. A., Westra, W. H., Chan, T. Y., ... Marzo, A. M. De. (2004). Telomere Length Abnormalities Occur Early in the Initiation of Epithelial Carcinogenesis. *Cancer Research*, 64(10), 3317–3326.

Mills, K. D., Ferguson, D. O., & Alt, F. W. (2003). The role of DNA breaks in genomic instability and tumorigenesis. *Immunological reviews*, 194, 77–95.

## N

---

Nakano, M., Kodama, Y., Ohtaki, K., Itoh, M., Delongchamp, R., Awa, a a, & Nakamura, N. (2001). Detection of stable chromosome aberrations by FISH in A-bomb survivors: comparison with previous solid Giemsa staining data on the same 230 individuals. *International journal of radiation biology*, 77(9), 971–7. doi:10.1080/09553000110050065

Nelyudova, A., & Aksenov, N. (2007). By blocking apoptosis, Bcl-2 in p38-dependent manner promotes cell cycle arrest and accelerated senescence after DNA damage and serum withdrawal. *Cell Cycle*, 6(17), 2171–2177.

## P

---

Panganiban, R.-A. M., Snow, A. L., & Day, R. M. (2013). Mechanisms of radiation toxicity in transformed and non-transformed cells. *International journal of molecular sciences*, 14(8), 15931–58. doi:10.3390/ijms140815931

Pazolli, E., & Stewart, S. A. (2008). Senescence: the good the bad and the dysfunctional. *Current Opinion in Genetics & Development*, 18, 42–47. doi:10.1016/j.gde.2007.12.002

Preston, D. L., Pierce, D. A., Shimizu, Y., Cullings, H. M., Fujita, S., & Funamoto, S.Kodama, K. (2004). Effect of Recent Changes in Atomic Bomb Survivor Dosimetry on Cancer Mortality Risk Estimates. *Radiation research*, 162(4), 377–389.

## R

---

Richardson, D. B., & Wing, S. (1999). Radiation and mortality of workers at Oak Ridge National Laboratory: positive associations for doses received at older ages. *Environmental health perspectives*, 107(8), 649–56.

Ronckers, C. M., Land, C. E., Miller, J. S., Stovall, M., Lonstein, J. E., & Doody, M. M. (2010). Cancer mortality among women frequently exposed to radiographic examinations for spinal disorders. *Radiation research*, 174(1), 83–90.

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*, 100(9), 5057–62. doi:10.1073/pnas.0830918100

Rudolph, K. L., Chang, S., Lee, H. W., Blasco, M., Gottlieb, G. J., Greider, C., & DePinho, R. a. (1999). Longevity, stress response, and cancer in aging telomerase-deficient mice. *Cell*, 96(5), 701–12.

## S

---

- San Filippo, J., Sung, P., & Klein, H. (2008). Mechanism of eukaryotic homologous recombination. *Annual review of biochemistry*, 77, 229–57. doi:10.1146/annurev.biochem.77.061306.125255
- Schmid, W. (1975). The micronucleus test. *Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects*, 31(1), 9–15.
- Sedelnikova, O. a, Horikawa, I., Redon, C., Nakamura, A., Zimonjic, D. B., Popescu, N. C., & Bonner, W. M. (2008). Delayed kinetics of DNA double-strand break processing in normal and pathological aging. *Aging cell*, 7(1), 89–100. doi:10.1111/j.1474-9726.2007.00354.x
- Seluanov, A., Gorbunova, V., Falcovitz, A., Sigal, A., Milyavsky, M., Zurer, I., ... Rotter, V. (2001). Change of the Death Pathway in Senescent Human Fibroblasts in Response to DNA Damage Is Caused by an Inability To Stabilize p53, 21(5), 1552–1564. doi:10.1128/MCB.21.5.1552
- Shuryak, I., Sachs, R. K., & Brenner, D. J. (2010). Cancer risks after radiation exposure in middle age. *Journal of the National Cancer Institute*, 102(21), 1628–36. doi:10.1093/jnci/djq346
- Simsek, D., Brunet, E., Wong, S. Y.-W., Katyal, S., Gao, Y., McKinnon, P. J., ... Jasin, M. (2011). DNA ligase III promotes alternative nonhomologous end-joining during chromosomal translocation formation. *PLoS genetics*, 7(6), e1002080. doi:10.1371/journal.pgen.1002080
- Sjögren, C., & Nasmyth, K. (2001). Sister chromatid cohesion is required for postreplicative double-strand break repair in *Saccharomyces cerevisiae*. *Current biology: CB*, 11(12), 991–5.
- Soler, D., Pampalona, J., Tusell, L., & Genescà, A. (2009). Radiation sensitivity increases with proliferation-associated telomere dysfunction in nontransformed human epithelial cells. *Aging cell*, 8(4), 414–25. doi:10.1111/j.1474-9726.2009.00488.x
- Symington, L. S., & Gautier, J. (2011). Double-strand break end resection and repair pathway choice. *Annual review of genetics*, 45, 247–71. doi:10.1146/annurev-genet-110410-132435

## T

---

- Tanaka, K., Kohda, A., Toyokawa, T., Ichinohe, K., & Oghiso, Y. (2008). Chromosome aberration frequencies and chromosome instability in mice after long-term exposure

to low-dose-rate gamma-irradiation. *Mutation research*, 657(1), 19–25. doi:10.1016/j.mrgentox.2008.09.006

Tokunaga, M., Land, C. E., Tokuoka, S., Nishimori, I., Soda, M., & Akiba, S. (1994). Incidence of Female Breast Cancer among Atomic Bomb Survivors, 1950-1985. *Radiation research*, 138(2), 209–223.

Tomás-Loba, A., Flores, I., Fernández-Marcos, P. J., Cayuela, M. L., Maraver, A., Tejera, A., ... Blasco, M. a. (2008). Telomerase reverse transcriptase delays aging in cancer-resistant mice. *Cell*, 135(4), 609–22. doi:10.1016/j.cell.2008.09.034

Truong, L. N., Li, Y., Shi, L. Z., Hwang, P. Y.-H., He, J., Wang, H., ... Wu, X. (2013). Microhomology-mediated End Joining and Homologous Recombination share the initial end resection step to repair DNA double-strand breaks in mammalian cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(19), 7720–5. doi:10.1073/pnas.1213431110

Tubiana, M., Feinendegen, L. E., & Kaminski, J. M. (2009). The Linear No-Threshold Relationship Is Inconsistent Experimental Data 1, 251(1).

Tusell, L., Pampalona, J., Soler, D., Frías, C., & Genescà, A. (2010). Different outcomes of telomere-dependent anaphase bridges. *Biochemical Society transactions*, 38(6), 1698–703. doi:10.1042/BST0381698

## V

---

Valdiglesias, V., Giunta, S., Fenech, M., Neri, M., & Bonassi, S. (2013).  $\gamma$ H2AX as a marker of DNA double strand breaks and genomic instability in human population studies. *Mutation research*, 753(1), 24–40. doi:10.1016/j.mrrev.2013.02.001

Vermes, I., Haanen, C., Steffens-Nakken, H., & Reutelingsperger, C. (1995). A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. *Journal of immunological methods*, 184(1), 39–51.

Vicencio, J. M., Galluzzi, L., Tajeddine, N., Ortiz, C., Criollo, A., Tasdemir, E., ... Kroemer, G. (2008). Senescence, apoptosis or autophagy? When a damaged cell must decide its path--a mini-review. *Gerontology*, 54(2), 92–9. doi:10.1159/000129697

## W

---

- Walker, J. R., Corpina, R. a, & Goldberg, J. (2001). Structure of the Ku heterodimer bound to DNA and its implications for double-strand break repair. *Nature*, *412*(6847), 607–14. doi:10.1038/35088000
- Weng, N. P., Hathcock, K. S., & Hodes, R. J. (1998). Regulation of telomere length and telomerase in T and B cells: a mechanism for maintaining replicative potential. *Immunity*, *9*(2), 151–157.
- Wong, K. K., Chang, S., Weiler, S. R., Ganesan, S., Chaudhuri, J., Zhu, C., ... DePinho, R. a. (2000). Telomere dysfunction impairs DNA repair and enhances sensitivity to ionizing radiation. *Nature genetics*, *26*(1), 85–8. doi:10.1038/79232
- Wright, W. E., Piatyszek, M. A., Rainey, W. E., Byrd, W., & Shay, J. W. (1996). Telomerase activity in human germline and embryonic tissues and cells. *Developmental genetics*, *18*(2), 1973–1979.
- Wykes, A. S. M., Piasentin, E., Joiner, M. C., Wilson, G. D., Marples, B., & Wykes, S. M. (2006). Low-Dose Hyper-radiosensitivity is not Caused by a Failure to Recognize DNA Double-Strand Breaks Low-Dose Hyper-radiosensitivity is not Caused by a Failure to Recognize DNA Double-Strand Breaks, *165*(5), 516–524.

## Z

---

- Zhang, J. (2013). The role of BRCA1 in homologous recombination repair in response to replication stress: significance in tumorigenesis and cancer therapy. *Cell & bioscience*, *3*(1), 11. doi:10.1186/2045-3701-3-11
- Zimmermann, M., & de Lange, T. (2013). 53BP1: pro choice in DNA repair. *Trends in cell biology*, (Figure 1), 1–10. doi:10.1016/j.tcb.2013.09.003





