




Universitat Autònoma de Barcelona

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

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

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



Contribució de BRCA1 i 53BP1
a la reparació dels trencaments
del DNA: efecte de l'edat

Teresa Anglada Pons

Contribució de BRCA1 i 53BP1 a la reparació dels trencaments del DNA: efecte de l'edat

Teresa Anglada Pons

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

Tesi Doctoral inscrita en el Departament de Biologia Cel·lular, de
Fisiologia i d'Immunologia de la Universitat Autònoma de Barcelona

Directores:

Dra. Marta Martín Flix

Dra. Anna Genescà Garrigosa

Bellaterra, novembre de 2018

La **Dra. Marta Martín Flix**, titular del Departament de Biologia Cel·lular,
de Fisiologia i d'Immunologia de la Universitat Autònoma de Barcelona,

i la **Dra. Anna Genescà Garrigosa**, catedràtica del Departament de Biologia
Cel·lular, de Fisiologia i d'Immunologia a la Universitat Autònoma de Barcelona,

CERTIFIQUEN:

Que **Teresa Anglada Pons** ha realitzat sota la seva direcció el treball d'investigació que
s'exposa a la memòria titulada "**Contribució de BRCA1 i 53BP1 a la reparació dels
trencaments del DNA: efecte de l'edat**" per optar al grau de Doctora
per la Universitat Autònoma de Barcelona.

Que aquest treball s'ha dut a terme a la Unitat de Biologia Cel·lular del Departament de
Biologia Cel·lular, de Fisiologia i d'Immunologia de la Universitat Autònoma de Barcelona.

I perquè així consti, firmen el present certificat.

Bellaterra, 13 de novembre de 2018

Dra. Marta Martín Flix

Dra. Anna Genescà Garrigosa

Teresa Anglada Pons

Aquesta tesi s'ha desenvolupat amb el finançament de:

- Consejo de Seguridad Nuclear
- Institut de la Salut de la dona Dexeus
- Ajuts de la Generalitat de Catalunya per donar suport a les activitats dels grups de recerca (referències: 2014 SGR-524 i 2017 SGR-503)

Teresa Anglada Pons ha estat beneficiària dels següents ajuts:

- Ajut per a la contractació de personal investigador en formació (PIF-UAB 2014-2015)
- Ajut per a la contractació de personal investigador novell (FI-DGR 2015-2017)
Convocatòria cofinançada pel Fons Social Europeu



Índex

RESUM	1
SUMMARY	3
ABREVIATURES	5
INTRODUCCIÓ	11
1. Lesions al DNA i mecanismes de reparació	13
1.1. Inducció de dany al DNA	13
1.2. Resposta al dany al DNA	15
1.2.1. Detecció dels DSBs i amplificació del senyal	17
1.2.2. Elecció de la via de reparació dels DSBs: 53BP1 i BRCA1	18
53BP1	20
BRCA1	21
L'antagonisme entre 53BP1 i BRCA1	23
1.2.3. Mecanismes de reparació de DSBs	25
La via de reparació c-NHEJ	25
La via de reparació HR	27
La via de reparació Alt-EJ	28
2. L'envelliment	30
2.1. Característiques de l'envelliment	30
2.2. Inestabilitat genòmica	32
2.3. Els mecanismes de reparació del DNA i el procés d'envelliment	34
2.3.1. Mutacions de proteïnes de reparació del DNA i envelliment prematur	36
2.3.2. Disminució en l'eficiència de les vies de reparació amb l'edat	37
3. Model cel·lular d'envelliment: les HMECs <i>pre-stasis</i>	38
3.1. Derivació i cultiu de les HMECs	39
3.2. Cultiu de les HMECs <i>pre-stasis</i> en medi M87A+X	42

<u>HIPÒTESI I OBJECTIUS</u>	<u>47</u>
Hipòtesi de l'estudi	49
Objectius	49
<u>RESULTATS</u>	<u>51</u>
Treball 1: Delayed γ H2AX foci disappearance in mammary epithelial cells from aged women reveals an age-associated DNA repair defect	53
Treball 2: Deficient recruitment of 53BP1 to DNA double-strand breaks in G1 cells from aged women directs repair to BRCA1/CtIP-mediated end resection	83
<u>DISCUSSIÓ</u>	<u>123</u>
1. Valoració del model cel·lular d'envelliment	125
2. Deficiència en el reclutament de 53BP1 associada a l'edat	126
2.1. Origen del defecte en el reclutament de 53BP1	128
3. El reclutament de BRCA1 a G2 no es troba alterat amb l'envelliment	131
4. L'antagonisme 53BP1/BRCA1 en l'elecció de la via de reparació dels DSBs i el seu paper en l'envelliment	132
<u>CONCLUSIONS</u>	<u>139</u>
<u>BIBLIOGRAFIA</u>	<u>143</u>

Resum

Els organismes han desenvolupat mecanismes eficients per reparar les lesions que es generen constantment al DNA. No obstant això, la freqüència d'anomalies potencialment oncogèniques, com ara els trencaments de doble cadena (DSBs; *Double-Strand Breaks*) o les reorganitzacions cromosòmiques, es veu incrementada en les persones de més edat. Alguns autors apunten a que l'acumulació de lesions al DNA amb l'edat podria estar relacionada amb una deficiència en el funcionament de les vies de reparació dels DSBs. Tanmateix, la falta d'evidències que estableixin una causalitat directa i la desconeixença del mecanisme molecular associat han dificultat arribar a una conclusió al respecte.

En aquesta tesi s'ha comparat l'eficiència de reparació dels DSBs en cèl·lules epitelials mamàries humanes (HMECs; *Human Mammary Epithelial Cells*) provinents de teixits no tumorals de donants joves (<27 anys) i grans (>60 anys). En primer lloc s'ha mesurat la cinètica d'inducció i reparació dels DSBs mitjançant la quantificació del nombre de foci de γ H2AX després d'irradiar les cèl·lules. Les cèl·lules de donants grans van presentar una freqüència basal de foci de γ H2AX superior a la de les joves, i un major nombre de foci a tots els temps post-irradiació analitzats (1h, 2h i 24h). La modelització matemàtica de les dades obtingudes va permetre concloure que les cèl·lules derivades de donants joves i grans reparaven els DSBs a una velocitat similar, però que aquestes últimes presentaven un retard en l'inici de la reparació dels DSBs.

Per tal d'aprofundir en el mecanisme responsable d'aquest retard en l'inici de la reparació en les HMECs de donants grans, s'ha avaluat l'activitat de les dues vies principals de reparació dels DSBs: la HR (*Homologous Recombination*) i la c-NHEJ (*canonical Non-Homologous End-Joining*). Les HMECs es van transfectar amb uns plàsmids reporters específicament dissenyats per mesurar l'eficiència d'aquestes vies. Les cèl·lules de donants grans van presentar una disminució en l'activitat, tant de la c-NHEJ com de la HR. Mitjançant l'assaig de western blot es va descartar que aquesta disminució fos deguda a una reducció en la quantitat de les principals proteïnes implicades.

A continuació, es va analitzar l'eficiència del reclutament de les proteïnes involucrades en la tria de la via de reparació del DSBs: BRCA1 i 53BP1, responsables de dirigir la

reparació cap a la via de la HR i de la c-NHEJ, respectivament. Es va analitzar el reclutament de BRCA1 als DSBs en cèl·lules CENPF positives, ja que la HR només és activa durant les fases S/G2, i no es van observar diferències relacionades amb l'edat de les donants. En mesurar el reclutament de 53BP1 als DSBs, al llarg de tota la interfase, les cèl·lules provinents de donants grans van presentar una reducció significativa en el reclutament de 53BP1 als DSBs radioinduits. L'absència de 53BP1 en aquestes cèl·lules afavoreix la formació ectòpica de foci de BRCA1, CtIP i RPA a la fase G1, indicant que alguns dels DSBs estant patint una resecció extensa. Aquest fenomen és especialment perillós en aquesta fase del cicle perquè els trencaments processats no podran ser dirigits a la HR i, en canvi, seran probablement reparats per vies de reparació alternatives que són altament mutagèniques.

En definitiva, el reclutament deficient de 53BP1 en HMECs provinents de donants d'edat avançada comporta una disminució en la reparació dels DSBs per la c-NHEJ i permet el reclutament de BRCA1 i la resecció dels extrems trencats del DNA a la fase G1 per vies alternatives a la c-NHEJ. Això es tradueix en un retard en l'inici de la reparació dels DSBs que probablement promou la formació de reorganitzacions cromosòmiques potencialment oncogèniques.

Summary

Organisms have developed mechanisms to efficiently repair the lesions that are continuously induced in their DNA. However, it has been described an increased frequency of potentially oncogenic abnormalities, such as DNA double-strand breaks (DSBs) and genome rearrangements, in older individuals. Related to this, some authors have pointed out that a deficiency in the DNA repair mechanisms could be responsible for the observed accumulation of DNA damage with age. Nonetheless, direct causality remains elusive and lack of knowledge of the molecular mechanisms underlying the age-associated repair defect makes it difficult to draw conclusions.

In this thesis, the efficiency of DSB repair has been analyzed in Human Mammary Epithelial Cells (HMECs) derived from non-tumoral tissues from young (<27 years old) and aged (>60 years old) donors. First, the kinetics of DSB induction and repair have been evaluated by quantifying the number of γ H2AX foci after irradiation. Cells from aged donors showed an increased basal frequency of γ H2AX foci, and the number of γ H2AX foci was higher than in young donors' cells at all times after irradiation analyzed (1h, 2h and 24h). Mathematical modelling of the data obtained allowed us to conclude that although the speed of DSB repair is similar for aged and young donors, the former elicit a delay in the firing of the DSB repair mechanisms.

In order to explore the mechanisms underlying the delay in DSB repair firing in HMECs from aged donors, the activity of the two main DSB repair pathways -the HR (Homologous Recombination) and the c-NHEJ (canonical Non-Homologous End-Joining)- has been evaluated. To do so, HMECs were transfected with reporter plasmids that are specifically designed to measure the efficiency of these two repair pathways. Cells from aged donors showed a decreased efficiency of both c-NHEJ and HR. Western blot analysis discarded that this decrease was related to reduced levels of the main proteins involved in DSB repair.

Next, we analyzed the recruitment efficiency of the proteins involved in DSB repair pathway choice: BRCA1 and 53BP1, primary responsible to direct the repair to the HR and the c-NHEJ, respectively. Because the HR is only active during S/G2 phases, analysis of the recruitment of BRCA1 to DSBs was restricted to CENPF positive cells, and showed no age-associated differences. Instead, 53BP1 recruitment to DSBs was analyzed during

the whole interphase and cells from aged donors showed a significant reduction in the recruitment of 53BP1 to radiation-induced DSBs. Absence of 53BP1 favoured the ectopic formation of BRCA1, CtIP and RPA foci, indicating that a fraction of the DSBs in G1 cells from aged donors suffer an extensive end resection. This entails a considerable threat, because the repair of these extensively processed DNA breaks during G1 can no longer be directed to the c-NHEJ nor to the HR repair. Instead, these DSBs would probably be repaired by highly mutagenic alternative pathways.

In conclusion, the deficient recruitment of 53BP1 in HMECs from aged donors leads to a decreased repair by the c-NHEJ. Also, it permits the recruitment of BRCA1 to some DSBs while in G1, that results in extensive DNA end resection. Thus, repair of these DSBs must be accomplished by alternative mechanisms other than c-NHEJ. This is translated into a delayed initiation of DSB repair which in turn, probably promotes the generation of potentially oncogenic genome rearrangements with age.

Abreviatures

A	albúmina sèrica bovina
Alt-EJ	reparació no homòloga alternativa (<i>Alternative End-Joining</i>) També coneguda com: <ul style="list-style-type: none"> · altNHEJ o aNHEJ (<i>alternative NHEJ</i>) · MMEJ (<i>microhomology-mediated end joining</i>) · B-NHEJ (<i>backup NHEJ</i>) · TMEJ (<i>polimerase theta mediated end joining</i>)
ALT	mecanisme d'elongació dels telòmers basat en la recombinació homòloga (<i>Alternative Lengthening of Telomeres</i>)
c-NHEJ	reparació no homòloga canònica (<i>canonical Non-Homologous End-Joining</i>)
CDK	cinasa dependent de ciclina (<i>Cyclin-Dependent Kinase</i>)
CSR	recombinació del canvi de classe (<i>Class-Switch Recombination</i>)
DDR	resposta al dany en el DNA (<i>DNA Damage Response</i>)
DNA	àcid desoxiribonucleic (<i>Deoxyribonucleic acid</i>)
DSB	trencament de doble cadena (<i>Double-Strand Break</i>)
FADU	detecció fluorimètrica del desenrotllament del DNA en condicions alcalines (<i>Fluorimetric detection of Alkaline DNA Unwinding</i>)
GFP	proteïna fluorescent verda (<i>Green Fluorescent Protein</i>)
Gln	glutamina
HMEC	cèl·lula epitelial mamària humana (<i>Human Mammary Epithelial Cell</i>)
HR	recombinació homòloga (<i>Homologous Recombination</i>)
IF	immunofluorescència
IR	radiació ionitzant (<i>Ionising Radiation</i>)
IRIF	foci radioinduïts (<i>Ionizing Radiation Induced Foci</i>)
LEP	fenotip luminal (<i>Luminal Epithelial Phenotype</i>)
LET	transferència lineal d'energia (<i>Linear Energy Transfer</i>)
MEP	fenotip mioepitelial (<i>Myoepithelial Phenotype</i>)
MRN	MRE11-RAD50-NBS1

P	teixit perifèric no tumoral provinent d'una mastectomia (<i>Peripheral non-tumor containing mastectomy tissue</i>)
PD	duplicació de la població (<i>Population Doubling</i>)
pIR	després de l'exposició a radiació ionitzant (<i>post-Ionizing Radiation</i>)
RBE	efectivitat biològica relativa (<i>Relative Biological Effectiveness</i>)
RING	<i>Really Interesting New Gene</i>
RM	reducció mamoplàstica (<i>Reduction Mammoplasty</i>)
ROS	espècies reactives d'oxigen (<i>Reactive Oxygen Species</i>)
Ser	serina
SSA	<i>Single Strand Annealing</i>
stasis	senescència induïda per estrès o senyalització aberrant (<i>stress or aberrant signalling-induced senescence</i>)
Thr	treonina
UDR	<i>Ubiquitylation-Dependent Recruitment</i>
X	oxitocina

Llistat de proteïnes¹ i modificacions post-traduccionals de les histones

53BP1	<i>p53-binding protein 1</i>
APLF	<i>aprataxin and PNK-like factor</i>
ATM	<i>ataxia-telangiectasia mutated</i>
ATR	<i>ataxia telangiectasia and rad3-related</i>
BACH1	<i>transcription regulator protein BACH1</i>
BARD1	<i>BRCA1 associated RING domain protein 1</i>
BLM	<i>Bloom syndrome protein</i>
BRCA_	<i>breast cancer type _ susceptibility protein</i>

¹ Font: **UniProt: the universal protein knowledgebase**. Nucleic Acids Res. 45: D158-D169 (2017).

BRCT	<i>BRCA1 carboxy-terminal</i>
CD10	<i>nepriylsin, també coneguda com common acute lymphocytic leukemia antigen (CALLA)</i>
CD227	<i>mucin-1 (MUC-1), també coneguda com tumor-associated epithelial membrane antigen (EMA)</i>
CtIP	<i>CtBP-interacting protein</i>
DNA-PKcs	<i>DNA-dependent protein kinase catalytic subunit</i>
DNA2	<i>DNA replication ATP-dependent helicase/nuclease DNA2</i>
EXO1	<i>exonuclease 1</i>
FEN1	<i>flap endonuclease 1</i>
H2AK13ub	<i>ubiquitinació de la H2A a la lisina 13</i>
H2AK15ub	<i>ubiquitinació de la H2A a la lisina 15</i>
H4K16ac	<i>acetilació de la H4 a la lisina 16</i>
H4K20me2	<i>dimetilació de la H4 a la lisina 20</i>
HDAC_	<i>histone deacetylase</i>
K_	<i>Keratin o Cytokeratin</i>
Ku70	<i>X-ray repair cross-complementing protein 6, també coneguda com 70 kDa subunit of Ku antigen</i>
Ku80	<i>X-ray repair cross-complementing protein 5, també coneguda com 86 kDa subunit of Ku antigen</i>
MDC1	<i>mediator of DNA damage checkpoint 1</i>
MRE11	<i>meiotic recombination 11</i>
NBS1	<i>Nijmegen breakage syndrome 1</i>
p53	<i>cellular tumor antigen p53</i>
PALB2	<i>partner and localizer of BRCA2</i>
PARP1	<i>poly [ADP-ribose] polymerase 1</i>
PAXX	<i>paralog of XRCC4 and XLF</i>
PCNA	<i>proliferating cell nuclear antigen</i>
PIKK	<i>phosphatidylinositol 3-kinase-like protein kinase</i>

Pol _	<i>DNA polymerase</i>
PP4C	<i>serine/threonine-protein phosphatase 4 catalytic subunit</i>
RAD50	<i>DNA repair protein RAD50</i>
RAD51	<i>DNA repair protein RAD51 homolog 1</i>
RAD54	<i>DNA repair and recombination protein RAD54-like</i>
RAP80	<i>receptor-associated protein 80</i>
Rb	<i>retinoblastoma-associated protein</i>
RecQ	<i>ATP-dependent DNA helicase Q</i>
RIF1	<i>rap1-interacting factor 1 homolog</i>
RNF_	<i>ring finger protein</i>
RPA	<i>replication protein A</i>
SIRT_	<i>sirtuin</i>
TOPBP1	<i>DNA topoisomerase 2-binding protein 1</i>
WRN	<i>Werner syndrome ATP-dependent helicase</i>
XLF	<i>XRCC4-like factor, també coneguda com Cernunnos</i>
XRCC_	<i>X-ray repair cross-complementing protein</i>
γH2AX	<i>fosforilació de la variant X de la histona H2A a la serina 139</i>

Introducció

1. Lesions al DNA i mecanismes de reparació

1.1. Inducció de dany al DNA

La integritat del DNA es veu contínuament amenaçada tant per agents endògens com exògens, i les lesions originades varien en funció de la naturalesa de l'agent inductor (Figura 1) (Hoeijmakers 2001; Shiloh 2003).

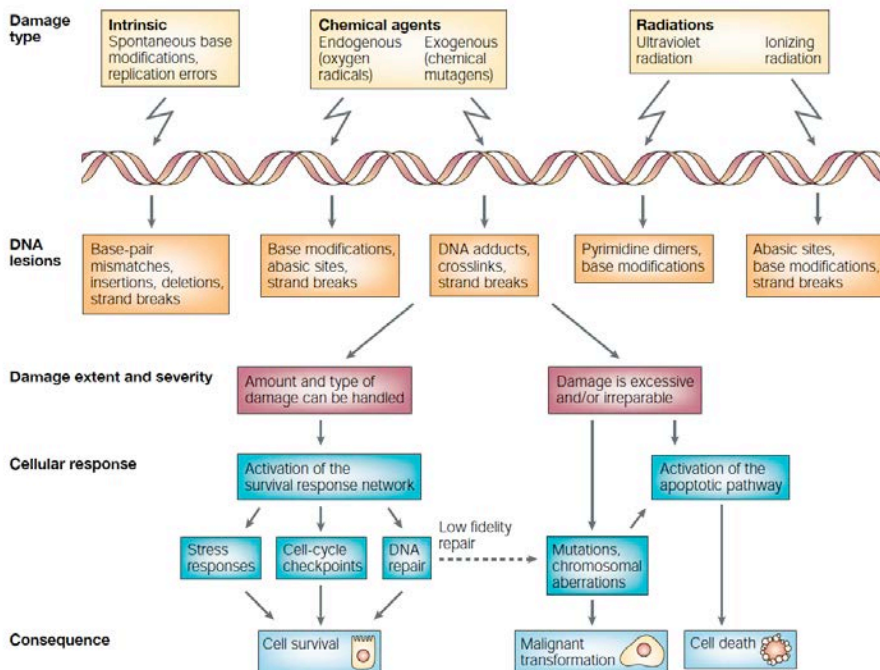


Figura 1. Agents inductors de dany al DNA i resposta cel·lular. A la part superior es detallen els factors endògens i exògens que poden originar els diferents tipus de lesions al DNA. A la part inferior s'esquematitza la resposta cel·lular en funció del tipus i de la quantitat i severitat de les lesions així com les conseqüències cel·lulars que se'n deriven. Figura reproduïda de Shiloh 2003 (Copyright © 2003) amb el permís de Springer Nature.

Els **agents endògens** són aquells provinents del propi metabolisme cel·lular. Les lesions poden originar-se de manera espontània, com en el cas de les depurinacions o deaminacions, que resulten en canvis a nivell de base. També poden ser resultat de processos cel·lulars, com la respiració oxidativa i la peroxidació dels lípids en que es generen espècies reactives, o dels errors que ocorren durant la replicació del DNA (Griffiths et al. 2000). Per altra banda, els **agents exògens** són factors ambientals, com ara les substàncies químiques mutagèniques o la radiació ionitzant (IR; *Ionising Radiation*) (Caixa 1).

Caixa 1. La radiació

La radiació es pot classificar en dos tipus en funció de la seva naturalesa:

- La **radiació corpuscular** comprèn les partícules nuclears, que consten de massa i càrrega. Aquestes provenen de la desintegració d'un àtom inestable que pot donar lloc a les partícules alfa, beta i als neutrons (Figura 2).

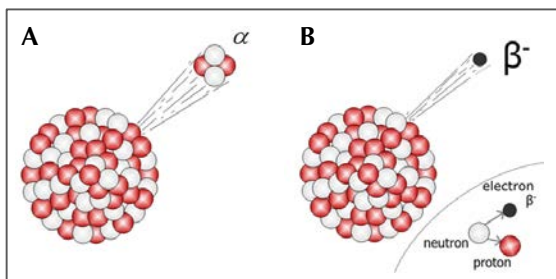


Figura 2. La radiació corpuscular. Generació de (A) partícules alfa i (B) partícules beta a partir de la desintegració d'un àtom.

- La **radiació electromagnètica** és energia sense massa ni càrrega. Es comporta com una ona de component tant elèctric com magnètic i, alhora, conté uns paquets d'energia anomenats fotons. En funció de la quantitat d'energia d'aquests fotons, podem distingir diferents tipus de radiació electromagnètica, entre els quals s'hi troben la llum visible, la llum ultraviolada, els rajos X i gamma, l'infraroig, les microones i les ones de ràdio (Figura 3).

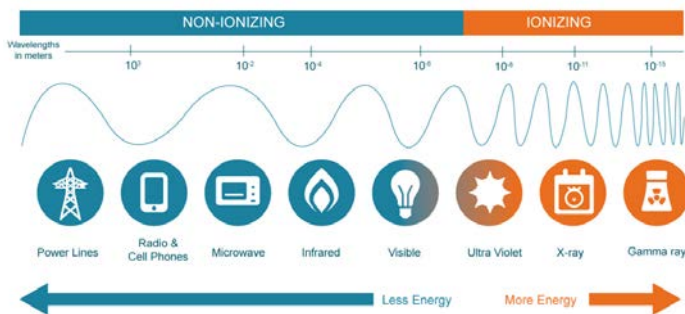


Figura 3. La radiació electro-magnètica. Diferents tipus ordenats en funció de la longitud d'ona i l'energia, que són inversament proporcionals (<https://www.mirion.com/introduction-to-radiation-safety/what-is-radiation/>).

Els diferents tipus de radiació també es poden classificar en funció de la seva capacitat d'ionitzar la matèria, és a dir, de si la seva l'energia és suficient perquè en interaccionar amb la matèria provoqui l'alliberació d'almenys un electró de l'àtom sobre el qual ha incidit, modificant així la seva estructura (Dance et al. 2014). Es consideren radiació ionitzant les partícules corpusculars i la radiació electromagnètica amb elevada energia (rajos gamma, rajos X i llum ultraviolada d'alta energia), originant cadascuna d'elles diferents tipus de lesions en proporció variable.

Pel que fa a la radiació ionitzant, el tipus de dany originat en el DNA així com la quantitat, la distribució i la complexitat d'aquest, depèn de la transferència lineal d'energia (LET; *Linear Energy Transfer*), és a dir, de la quantitat d'energia que la partícula ionitzant diposita per unitat de distància (Höglund et al. 2000; Stenerlöw et al. 2000). D'aquesta manera, les radiacions de baixa LET, com els rajos X i gamma, penetren fàcilment la matèria, però dipositen poca energia al llarg de la seva trajectòria. En canvi, les radiacions d'alta LET, com les partícules alfa i beta, dipositaran una gran quantitat d'energia en poca distància, generant clústers de dany. La LET està molt relacionada amb l'efectivitat biològica relativa (RBE; *Relative Biological Effectiveness*), ja que la complexitat i distribució de la lesió determinaran la dificultat per reparar-la així com el mecanisme requerit per a la seva correcta reparació (Hunter i Muirhead 2009; Franken et al. 2011). En definitiva, el tipus de dany generat al DNA depèn de la naturalesa de l'agent inductor i en funció del tipus de lesió, la quantitat i la complexitat del dany, la cèl·lula activarà una cascada de senyalització que aturarà el cicle cel·lular i activarà mecanismes de reparació amb l'objectiu de restaurar la integritat genòmica.

1.2. Resposta al dany al DNA

Quan es genera una lesió al DNA s'activa una cascada de senyalització cel·lular, coneguda com la DDR (*DNA Damage Response*), per tal de detectar el dany, senyalitzar-lo i promoure una correcta reparació de manera coordinada (Ciccia i Elledge 2010; Jackson i Bartek 2009). En funció de la naturalesa de les lesions, es donarà una resposta o una altra a nivell cel·lular (Figura 1). En la majoria dels casos, l'aturada transitòria del cicle cel·lular depenent de p53 permet guanyar temps per al reclutament de les proteïnes necessàries per a la reparació del trencament. Tanmateix, quan el dany és massiu o irreparable, l'aturada persistent de la transcripció i la replicació posa en perill la viabilitat cel·lular i s'indueix la mort de la cèl·lula per apoptosi o senescència (Ou i Schumacher 2018).

La resposta al dany es dona de manera molt organitzada (Figura 4). En primer lloc actuen els **sensors** de dany, que s'encarreguen de la detecció de la lesió i de l'activació dels **mediadors**. Aquests, al seu torn, amplifiquen el senyal i recluten els **efectors** que, o bé induiran l'aturada del cicle cel·lular i repararan el trencament, o bé conduiran la cèl·lula a la mort programada.

Per tal de poder processar els diferents tipus de lesions que es poden originar, les cèl·lules han desenvolupat mecanismes de reparació altament especialitzats (revisió detallada a Iyama i Wilson 2013). Una de les lesions al DNA més perilloses són els trencaments de doble cadena (DSBs; *Double-Strand Breaks*) ja que en el trencament s'hi veuen implicades les dues cadenes del DNA i per tant es dificulta el restabliment de la seqüència original sense pèrdua o canvi d'informació genètica. Els DSBs tenen una elevada rellevància tant en el càncer (Khanna i Jackson 2001; Aparicio et al. 2014) com en l'envelliment (Gorbunova i Seluanov 2016; White i Vijg 2016), ja que la lligació d'extremes il·legítics pot donar lloc a reorganitzacions cromosòmiques, que poden inactivar gens supressors de tumors o activar oncogenes, essent doncs una de les principals fonts d'inestabilitat genòmica (Hoeijmakers 2001; Shiloh 2003).

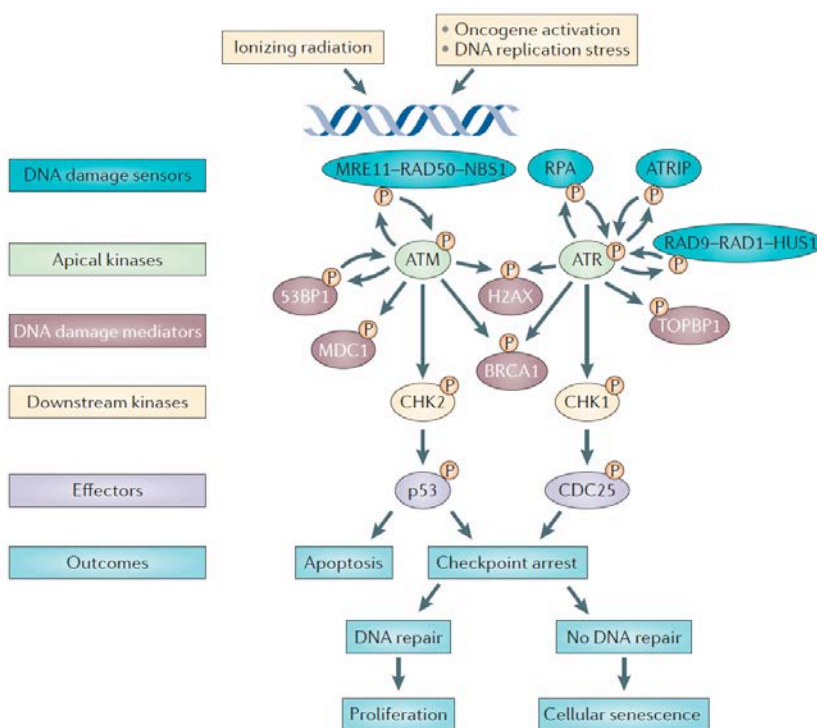


Figura 4. Resposta al dany al DNA. La resposta a les lesions al DNA per part de la DDR està altament jerarquizada i les proteïnes involucrades es poden classificar en 3 categories: sensors, mediadors i efectors. Figura reproduïda de Sulli et al. 2012 (Copyright © 2012) amb el permís de Springer Nature.

1.2.1. Detecció dels DSBs i amplificació del senyal

Quan es genera un DSB el complex sensor del dany MRN, format per les proteïnes MRE11 (*meiotic recombination 11*), RAD50 (*receptor associated protein 50*) i NBS1 (*Nijmegen breakage syndrome 1*) és ràpidament reclutat al lloc del dany (Figura 5a).

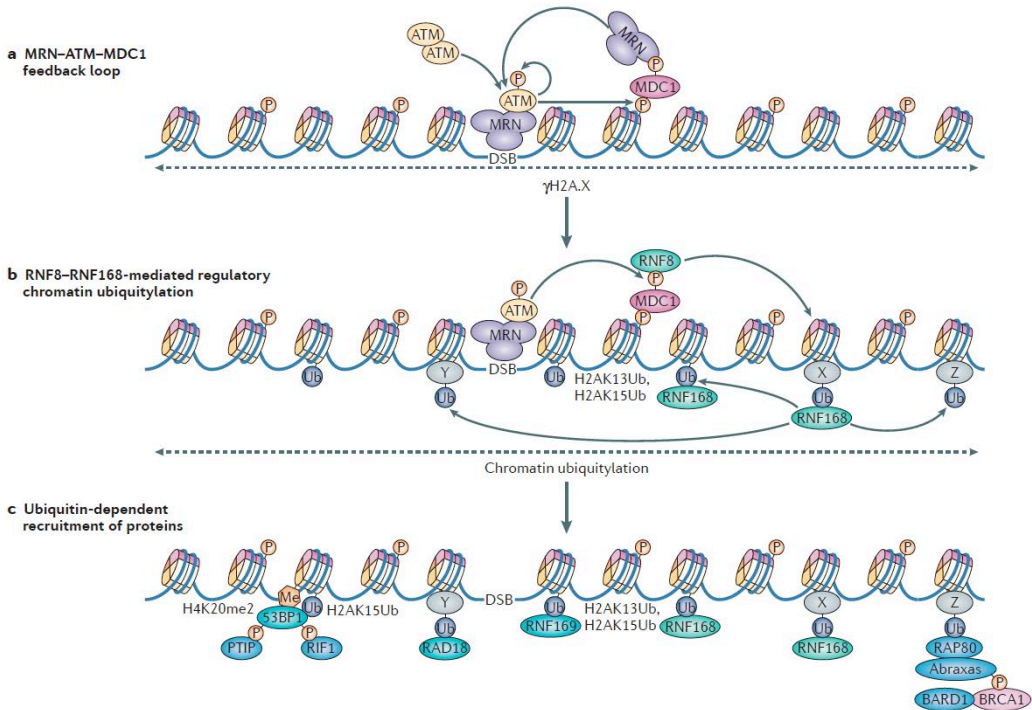


Figura 5. Cascada de senyalització dels DSBs. Figura reproduïda de Panier i Durocher 2013 (Copyright © 2013) amb el permís de Springer Nature.

MRN activa la proteïna cinasa ATM (*ataxia-telangiectasia mutated*) que juga un paper clau en la regulació de la cascada d'amplificació del senyal de dany a la cromatina. ATM pertany a una família de proteïnes altament conservada que reben el nom de PIKKs (*phosphatidylinositol 3-kinase-like protein kinases*) i que també inclou ATR (*ataxia telangiectasia and rad3-related*) i DNA-PKcs (*DNA-dependent protein kinase catalytic subunit*), totes elles amb activitat serina/treonina cinasa (Shiloh 2003; Paull 2015; Guleria i Chandna 2016; Blackford i Jackson 2017). D'entre els diversos substrats d'ATM un dels principals és la histona H2AX en la seva serina 139 que, un cop fosforilada, passa a anomenar-se γ H2AX (Rogakou et al. 1998) i permet el reclutament de MDC1 (*mediator of DNA damage checkpoint 1*). El complex γ H2AX-MDC1 interacciona amb NBS1 i promou un *feedback* positiu per ATM per tal de fosforilar la H2AX circumdant i amplificar així el senyal (Figura 5a) (Stucki et al. 2005; Jungmichel i Stucki 2010). És

d'aquesta manera que la fosforilació de la H2AX s'estén varies megabases al voltant del trencament, donant lloc a una plataforma que servirà per al reclutament de les proteïnes efectores (Rogakou et al. 1999; Paull et al. 2000; Nakamura et al. 2010). De fet, tant la pròpia γ H2AX com l'acumulació focal de proteïnes al lloc del trencament dona lloc a la formació de foci que es coneixen com IRIF (*Ionizing Radiation Induced Foci*), que poden visualitzar-se al microscopi quan les proteïnes allí concentrades són detectades amb els anticossos pertinents (Rothkamm et al. 2015).

MDC1 continua la senyalització del DSB amb el reclutament de la E3 ubiquitina lligasa RNF8 (*ring finger protein 8*), que al seu torn recluta la E3 ubiquitina lligasa RNF168 (*ring finger protein 168*) i juntes desencadenen una cascada d'ubiquitinacions necessàries per al reclutament dels factors de reparació (Figura 5b) (Polo i Jackson 2011; Doil et al. 2009; Mattioli et al. 2012). D'entre aquestes modificacions, les ubiquitinacions de la H2A a les lisines 13 (H2AK13ub) i 15 (H2AK15ub) serveixen per amplificar el senyal, ja que són reconegudes per la pròpia RNF168 (Panier et al. 2012).

1.2.2. Elecció de la via de reparació dels DSBs: 53BP1 i BRCA1

A partir d'aquest punt, en funció de les proteïnes que reconeixin les modificacions de la histona H2A es determinarà la via per la qual es repararà el trencament. En cèl·lules eucariotes existeixen dos mecanismes principals de reparació dels DSBs: la via de la c-NHEJ (*canonical Non-Homologous End-Joining*) i la via de la HR (*Homologous Recombination*). La c-NHEJ reuneix els extrems del DNA trencat després d'un processament mínim dels mateixos. En canvi, la HR requereix d'una resecció més extensiva de la zona del trencament, ja que necessita un *overhang* de cadena senzilla que pugui envair una cromàtide germana per copiar i restaurar la seqüència de DNA original.

La tria de la via de reparació dels DSBs és un punt clau per tal de mantenir la integritat genòmica, i és per aquest motiu que es troba altament regulada. El moment del cicle cel·lular juga un paper determinant: la c-NHEJ pot actuar al llarg de tot el cicle cel·lular amb l'excepció de la fase M i és la via predominant a G1, mentre que la HR només és activa des de mitjans de la fase S fins al final de G2, que és quan la presència de la cromàtide germana li proporciona l'homologia que necessita (Her i Bunting 2018; Hustedt i Durocher 2017; Chapman et al. 2012b). L'estructura del trencament i l'estat de la cromatina també són factors que influeixen en aquesta elecció (Figura 6) (Her i Bunting 2018; Beucher et al. 2009).

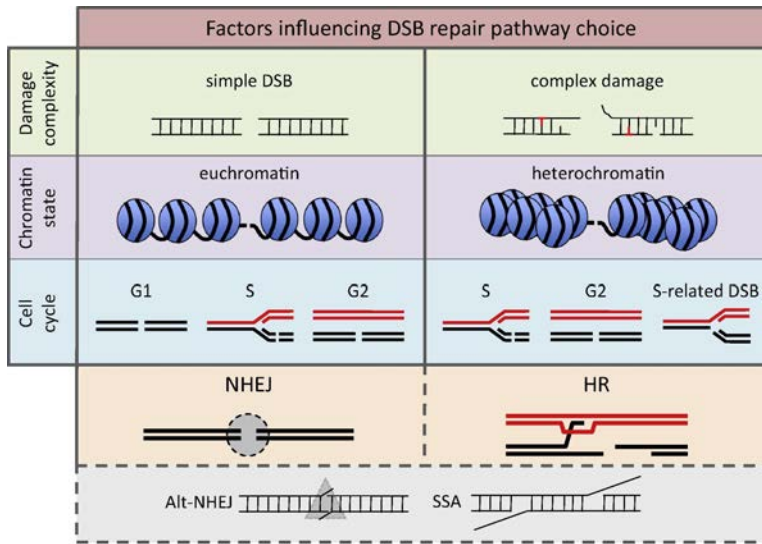


Figura 6. Factors que modulen l'elecció de la via de reparació dels DSBs. En funció de la complexitat de la lesió, l'estat de la cromatina i la fase del cicle cel·lular la reparació dels DSBs serà dirigida a la c-NHEJ o a la HR. Quan la c-NHEJ o la HR són deficientes, la reparació pot ser redirigida d'una via cap a l'altra, o poden actuar vies de reparació alternatives com la Alt-EJ o la SSA. Figura reproduïda de Vignard et al. 2013 (Copyright © 2013) amb el permís d'Elsevier.

A nivell molecular hi ha dos factors implicats en la tria de la via de reparació. Per una banda, 53BP1 (*p53-binding protein 1*) reconeix selectivament la H2AK15ub així com la dimetilació de la H4 a la lisina 20 (H4K20me2) i serveix de plataforma per al reclutament d'efectors que dirigiran la reparació cap a la via de la c-NHEJ (Figura 5c) (Fradet-Turcotte et al. 2013; Panier i Boulton 2014). Per altra banda, la H2AK15ub també és reconeguda per RAP80 (*receptor-associated protein 80*) i forma un complex amb Abraxas que permet la fosforilació i el reclutament de BRCA1 (*breast cancer type 1 susceptibility protein*) (Figura 5c) (Wang et al. 2007). BRCA1 promou la resecció dels extrems trencats del DNA i dirigeix la reparació principalment cap a la via de la HR.

Diversos treballs han demostrat que l'equilibri entre les proteïnes 53BP1 i BRCA1 és determinant en la regulació de l'elecció de la via de reparació del DSB. Així, la relació antagònica entre aquestes dues proteïnes determina el processament de la zona trencada del DNA, condicionant el mecanisme de reparació que hi pot actuar. Mentre que el posicionament de 53BP1 dirigeix la reparació cap a la c-NHEJ, el reclutament de BRCA1 a S/G2 promou la resecció del DNA dirigint la reparació cap a la HR (Figura 7) (Chapman et al. 2012b; Escribano-Díaz et al. 2013).

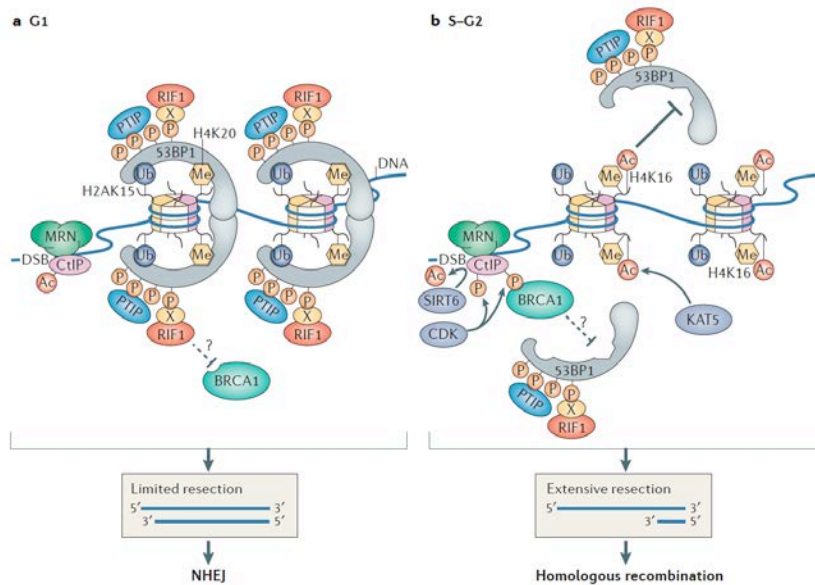


Figura 7. Competència entre 53BP1 i BRCA1 per la reparació dels DSBs. Figura reproduïda de Panier i Boulton 2014 (Copyright © 2014) amb el permís de Springer Nature.

53BP1

53BP1 és una proteïna de 1.972 aminoàcids estructurada en diversos elements entre els quals destaquen les repeticions BRCT (*BRCA1 carboxy-terminal*), els dominis Tudor en tàndem, el motiu UDR (*ubiquitylation-dependent recruitment*) adjacent al domini Tudor i els 28 llocs serina/treonina-glutamina (Ser/Thr-Gln) amino-terminals (Figura 8) (Panier i Boulton 2014).

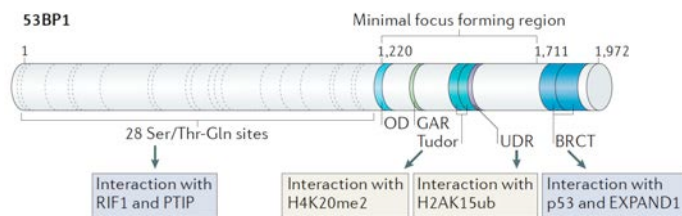


Figura 8. Estructura de 53BP1. Figura reproduïda de Panier i Boulton 2014 (Copyright © 2014) amb el permís de Springer Nature.

En resposta a la detecció dels DSBs, 53BP1 es ràpidament reclutada al lloc del trencament (Schultz et al. 2000; Anderson et al. 2001; Rappold et al. 2001). El seu reclutament i estabilització al lloc del trencament requereixen de la cascada d'ubiquitinacions mediatas per RNF8 i RNF168 (Stewart et al. 2009; Doil et al. 2009; Al-Hakim et al. 2010) i són independents de la fosforilació del seu domini N-terminal per 20

part d'ATM (Harding i Bristow 2012). A través del motiu UDR, 53BP1 reconeix directament la H2AK15ub. Tanmateix aquesta unió no és suficient per a l'acumulació de 53BP1 de manera focal, sinó que també requereix del reconeixement selectiu de la H4K20me2 per mitjà del domini Tudor. L'afinitat de la unió de 53BP1 amb H4K20me2 és modulada per l'acetilació de la H4 a la lisina 16 (H4K16ac) (Tang et al. 2013; Hsiao i Mizzen 2013). De fet, en resposta al dany, les desacetilases d'histones HDAC1 i HDAC2 (*histone deacetylase 1 and 2*) desacetilen la H4K16 afavorint el reconeixement de la H4K20me2 per part de 53BP1 (Miller et al. 2010).

Un cop 53BP1 està unida de manera estable al DNA en el lloc del trencament, requereix del reclutament de RIF1 (*rap1-interacting factor 1 homolog*). RIF1 interacciona amb 53BP1 mitjançant la unió al domini N-terminal que conté múltiples llocs Ser/Thr-Gln fosforilats per ATM. La presència del complex 53BP1/RIF1 al DSB bloqueja la resecció del DNA, per mecanismes encara desconeguts, promovent per tant la reparació per la c-NHEJ (Chapman et al. 2013; Escribano-Díaz et al. 2013; Zimmermann et al. 2013; Di Virgilio et al. 2013; Feng et al. 2013). Donat que tant la deleció de 53BP1 com la de RIF1 en línies cel·lulars es tradueix en un defecte en la c-NHEJ, sembla clar que les dues proteïnes tenen un paper determinant inhibint de la resecció i dirigint la reparació cap a la c-NHEJ (Chapman et al. 2013).

BRCA1

BRCA1 és una proteïna multifuncional involucrada en diversos mecanismes cel·lulars que afavoreixen el manteniment de l'estabilitat genòmica. A part de participar en el control del cicle cel·lular, l'organització de la cromatina i la transcripció, BRCA1 també juga un paper determinant en la reparació del DNA (Silver i Livingston 2012). Aquesta proteïna té 1.863 aminoàcids i està formada per un domini de repetició en tàndem BRCT a l'extrem C-terminal, un domini *coiled-coil* i un domini *RING* a l'extrem N-terminal (Figura 9) (Savage i Harkin 2015; Her et al. 2016).

El domini *RING* interacciona amb BARD1 (*BRCA1 associated RING domain protein 1*) donant lloc a l'heterodímer BRCA1/BARD amb activitat E3 ubiquitina lligasa (Hashizume et al. 2001), que actua sobre diferents substrats. A més, BRCA1 es troba formant part d'almenys quatre complexos diferents (A-D) (Savage i Harkin 2015; Her et al. 2016). Per un costat, el complex **BRCA1-B**, format per la interacció amb TOPBP1 (*DNA topoisomerase 2-binding protein 1*) i BACH1 (*transcription regulator protein BACH1*),

actua principalment en el punt de control de la fase S (Mäkineniemi et al. 2001), tot i que també es troba involucrat en la HR (Cantor et al. 2001). Per altra banda, el complex **BRCA1-A** s'encarrega del reclutament de BRCA1 cap al lloc del DSB. De tots els elements que formen aquest complex, RAP80 reconeix les marques d'ubiquitinació d'RNF168 a la zona que flanqueja el DSB i, a través de la interacció amb Abraxas, s'uneix al domini BRCT de BRCA1 (Wang et al. 2007; Her et al. 2016). Un cop BRCA1 és reclutada als DSBs, interacciona amb CtIP (*CtBP-interacting protein*) de manera dependent de CDKs (*Cyclin-Dependent Kinases*) formant així el complex **BRCA1-C** (Huertas i Jackson 2009; Yu i Chen 2004). Aquest és un dels esdeveniments principals en la tria de la via de reparació, donat que afavoreix la resecció del DNA. Tot i que BRCA1 no és indispensable per a la resecció per part de CtIP, la interacció d'ambdues incrementa l'eficiència d'aquest procés (Reczek et al. 2013; Polato et al. 2014; Cruz-García et al. 2014). El complex BRCA1/CtIP no només afavoreix la resecció del DNA al lloc del DSB, sinó que a més, impedeix el reclutament de RIF1 als DSBs i, per tant, inhibeix la c-NHEJ (Escribano-Díaz et al. 2013). Finalment, BRCA1 participa en el reclutament de PALB2 (*partner and localizer of BRCA2*), BRCA2 (*breast cancer type 2 susceptibility protein*) i RAD51 (*DNA repair protein RAD51 homolog 1*), formant el complex **BRCA1-D**, involucrat en el reemplaçament d'RPA (*replication protein A*) per RAD51 en el procés de recerca d'homologia i d'invasió de la cromàtide germana durant la HR (Zhang et al. 2009; Sy et al. 2009).

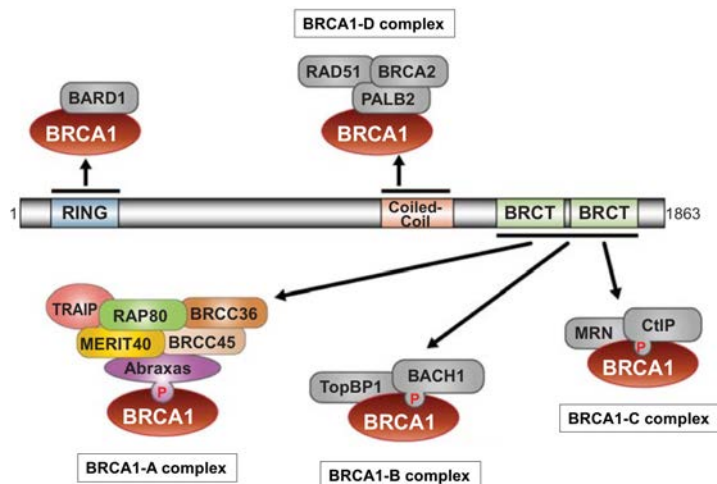


Figura 9. Estructura de BRCA1. Complexos proteics en els que es troba involucrada BRCA1 i les diverses funcions que se li associen a cada cas. Figura modificada de Her et al. 2016 (Copyright © 2016) amb el permís d'Oxford University Press.

L'antagonisme entre 53BP1 i BRCA1

L'acumulació focal de 53BP1 i BRCA1 a la zona del DSB es dona via RNF168. No obstant, el reclutament d'una o altra proteïna dona lloc a un producte processat per vies diferents. En resposta al dany, 53BP1 és ràpidament posicionada al lloc del trencament, on promou una primera temptativa de reparació del DSB per la via de la c-NHEJ (Chanut et al. 2016; Shibata et al. 2011; Shibata et al. 2014). El reclutament de l'efector RIF1 és el que impedeix el posicionament de BRCA1 al DSB durant la fase G1 del cicle cel·lular. S'ha descrit que aquesta inhibició no és deguda a la competició pel lloc d'unió, sinó que hi ha una regió de RIF1 que s'ocuparia de bloquejar la unió de BRCA1 al DNA (Figura 10) (Escribano-Díaz et al. 2013). La deleció de RIF1 en línies cel·lulars es tradueix en l'acumulació de foci de γ H2AX sense reparar i en la persistència de foci de 53BP1. A més, la regulació negativa de RIF1 comporta una disminució en l'activitat de la via de la c-NHEJ, indicant que juga un paper fonamental en aquesta via de reparació (Chapman et al. 2013).

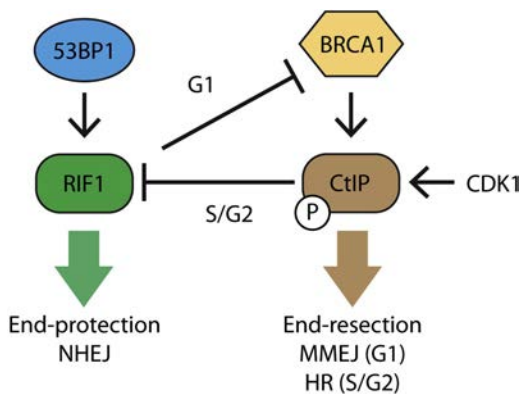


Figura 10. Antagonisme entre 53BP1/RIF1 i BRCA1/CtIP per a l'elecció de la via de reparació en diferents fases del cicle cel·lular. Figura reproduïda d'Escribano-Díaz et al. 2013 (Copyright © 2013) amb el permís d'Elsevier.

Durant la transició de S/G2, les CDKs estimulen la formació i activació del complex BRCA1/CtIP, que bloqueja el reclutament de RIF1 (Figura 10) (Huertas i Jackson 2009). Tot i el ràpid posicionament de 53BP1 al DSB, si no es produeix la reparació hi ha un canvi cap a la reparació per la HR, prèvia resecció del DNA. Per fer-ho, BRCA1 promou el reposicionament de 53BP1 des de el centre cap a la perifèria del focus, deixant així accessible la zona central del trencament a les proteïnes de la HR (Chapman et al. 2012a; Kakarougkas et al. 2013). Recentment s'ha descrit que BRCA1 pot promoure l'acció de la fosfatasa PP4C (*serine/threonine-protein phosphatase 4 catalytic subunit*), que desfosforilaria 53BP1 amb el consegüent alliberament de RIF1 i el reposicionament de 53BP1 (Isono et al. 2017), permetent així l'accés de BRCA1 al DSB.

Un cop BRCA1 està situada al lloc del trencament, CtIP promou la resecció del DNA (Sartori et al. 2007), bloquejant així la reparació per la via de la c-NHEJ. En una primera fase de resecció, coneguda com *'end clipping'* CtIP, juntament amb MRE11, processa uns pocs parells de bases (Figura 11). A continuació, es genera una resecció més extensa per part de EXO1 (*exonuclease 1*) i BLM (*Bloom syndrome protein*) fins a formar una llarga cadena de DNA de cadena senzilla (ssDNA), que és ràpidament recoberta per RPA i dirigida a la reparació per la via de la HR (Shibata et al. 2014; Symington 2016).

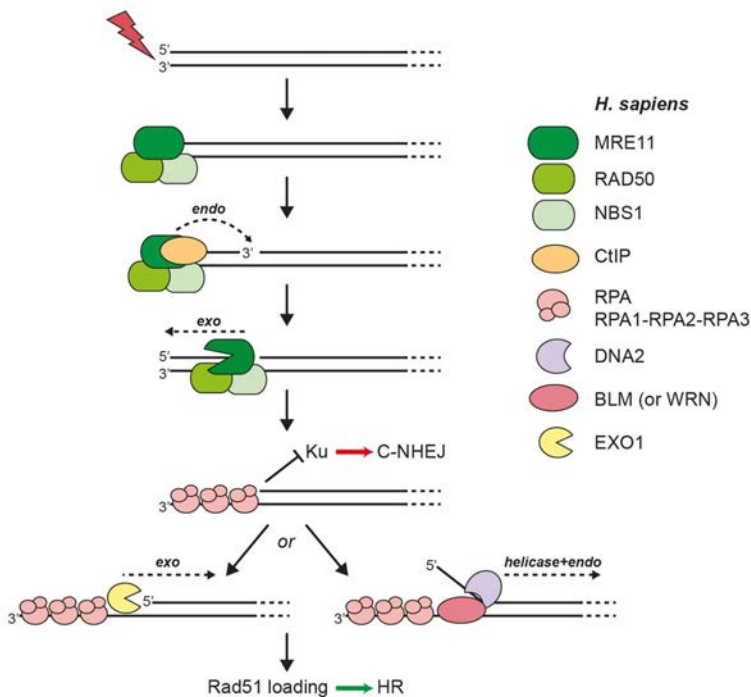


Figura 11. Mecanismes de resecció del DNA (Himmels i Sartori 2016).

És important apuntar que, tot i que el destí principal d'aquests trencaments sigui la reparació via HR, els extrems del DNA reseccionats també poden ser el substrat de vies de reparació alternatives i altament mutagèniques com la Alt-EJ (*Alternative End-Joining*) o la SSA (*Single Strand Annealing*) (Truong et al. 2013; Ceccaldi et al. 2016). Per tant, en funció del moment del cicle cel·lular, l'antagonisme entre 53BP1 i BRCA1 determina el grau de resecció del DNA trencat, que és el que dirigeix la reparació cap a un mecanisme o l'altre.

1.2.3. Mecanismes de reparació de DSBs

Tal i com s'ha introduït en apartats anteriors, en organismes superiors existeixen dues vies principals de reparació de DSBs: la c-NHEJ i la HR, però en els últims anys s'han acumulat evidències de l'existència d'altres mecanismes de reparació, com la Alt-EJ (Ceccaldi et al. 2016). Tots ells són mecanismes amb gran diversitat de proteïnes implicades que es troben ben caracteritzats tant nivell molecular com a nivell funcional i que es detallen a continuació.

La via de reparació c-NHEJ

La via de la c-NHEJ bàsicament consisteix en la reunió dels dos extrems del DNA trencats i la posterior lligació d'aquests (Figura 12) (Lieber 2010; Pannunzio et al. 2018). És la via de reparació preferent, ja que actua de manera ràpida, no requereix d'homologia ni de resecció dirigida i, a més, pot actuar sobre un ampli ventall de configuracions dels extrems trencats del DNA (Chang et al. 2017). No obstant, es tracta d'un mecanisme amb un cert potencial mutagènic, ja que el procés de lligació dels extrems trencats requereix d'un mínim d'homologia i sovint comporta la inserció o delecció d'uns pocs parells de bases (Her i Bunting 2018).

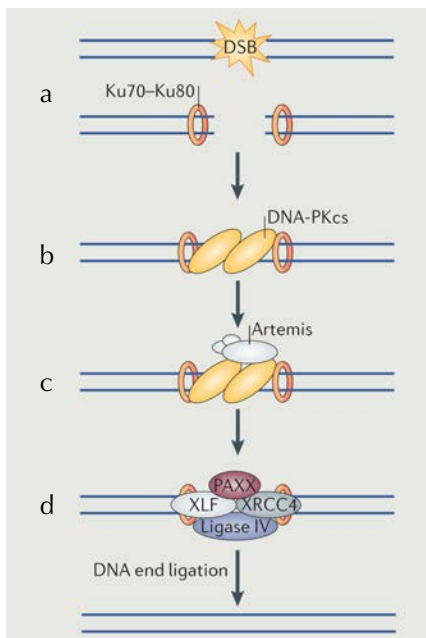


Figura 12. Via de reparació c-NHEJ. Figura modificada de Schwertman et al. 2016 (Copyright © 2016) amb el permís de Springer Nature.

Inicialment el DSB és reconegut per l'heterodímer Ku, un complex format per Ku70 i Ku80 capaç d'unir-se al DNA independentment de la seva seqüència (Figura 12a) (Blier et al. 1993). Tot i així s'ha demostrat que, generalment, a cada DSB només hi ha dues molècules de Ku properes, cadascuna d'elles unida a un costat del trencament (Britton et al. 2013). La unió de Ku al DSB bloqueja la resecció del DNA i promou el reclutament d'altres efectors *downstream* (Mimitou i Symington 2010; Fell i Schild-Poulter 2015). Seguidament es recluta DNA-PKcs, que presenta una elevada afinitat pel complex DNA:Ku80, i s'uneix a ambdós extrems del trencament mantenint els extrems trencats propers i protegits de l'acció de nucleases (Figura 12b) (West et al. 1998).

La interacció entre les dues molècules de DNA-PKcs promou la seva activitat serina/treonina cinasa, que permet la seva pròpia autofosforilació així com la fosforilació de diverses de les proteïnes involucrades en aquesta via (Jette i Lees-Miller 2015).

Els DSBs que es poden lligar més fàcilment són aquells que presenten els extrems roms, ja que no necessiten de processat previ a la lligació. Tanmateix, la majoria dels DSBs presenten extrems protuberants que requereixen del processament previ per part de nucleases per tal de fer-los compatibles per a la lligació. Es tracta d'una resecció de pocs nucleòtids per tal d'eliminar els 3' o 5' *overhangs* fins a generar zones de microhomologia, generalment de menys de 4 parells de bases. Aquesta resecció és inferior a la que es dona en processar els extrems per HR o Alt-EJ i hi participa Artemis (Figura 12c). Artemis presenta activitat exonucleasa intrínseca i activitat endonucleasa depenent de DNA-PKcs, que permet tallar extrems 5' i 3' del DNA al límit entre cadena senzilla i doble (Chang i Lieber 2016). Tot i que Artemis és la nucleasa principal, es creu que altres proteïnes amb aquesta activitat com APLF (*aprataxin and PNK-like factor*), FEN1 (*flap endonuclease 1*), DNA2 (*DNA replication ATP-dependent helicase/nuclease DNA2*) i EXO1 també podrien estar involucrades en el processament d'extrems incompatibles (Chang et al. 2015).

A més de l'acció de les nucleases prèvia a la lligació, en alguns casos es requereix de l'addició de nucleòtids per part de les polimerases mu i lambda (Pol μ i Pol λ , respectivament), pertanyents a la família Pol X (Bebenek et al. 2014; Moon et al. 2014). Tot i que la Pol λ generalment funciona de manera depenent de motlle, la Pol μ és capaç de sintetitzar DNA sense requerir cap seqüència de referència (Nick McElhinny et al. 2005), de manera que la reparació pot esdevenir propensa a errors.

Finalment, el complex format per DNA lligasa IV i XRCC4 (*X-ray repair cross-complementing protein 4*) permet la lligació dels extrems del DNA (Figura 12d) (Lieber 2010). Tot i que la lligasa IV per si sola té la capacitat de lligar el DNA es creu que és la interacció amb XRCC4 la que estimula la seva activitat catalítica (Grawunder et al. 1997). Altres proteïnes com XLF (*XRCC4-like factor*, també coneguda com Cernunnos) i PAXX (*paralog of XRCC4 and XLF*) participen en la lligació dels extrems del DNA de manera eficient (Ahnesorg et al. 2006; Ochi et al. 2015; Xing et al. 2015).

La via de reparació HR

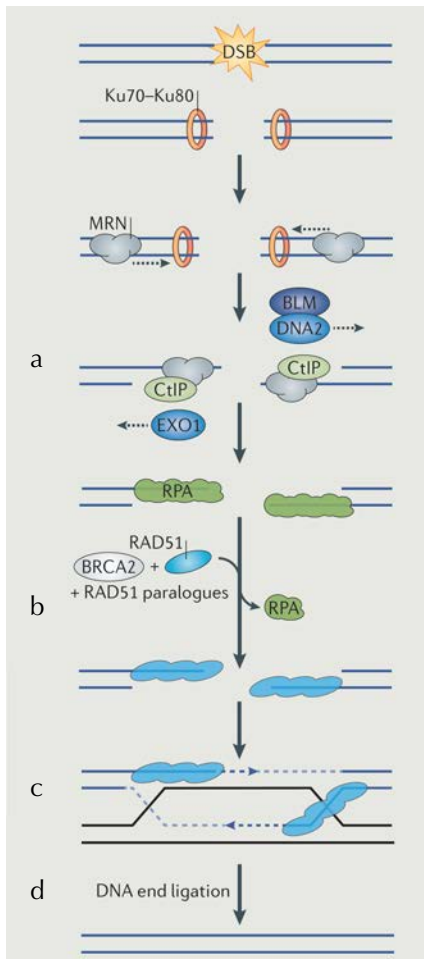


Figura 13. Via de reparació HR. Figura modificada de Schwertman et al. 2016 (Copyright © 2016) amb el permís de Springer Nature.

La via de reparació de la HR actua amb una elevada fidelitat, i és capaç de restaurar la seqüència genètica sense errors, ja que restableix la seqüència original de DNA copiant la seqüència de la cromàtide germana no danyada (Figura 13) (Heyer et al. 2010). És per aquest motiu que la seva actuació es troba restringida a la segona meitat de la fase S i a G2. Inicialment, es requereix de la resecció dels extrems trencats per part de CtlP i MRE11 tal i com s'ha comentat a l'apartat 'L'antagonisme entre 53BP1 i BRCA1' (Figura 13a). Els extrems *overhangs* de cadena senzilla que es generen són recoberts per la proteïna RPA per tal d'evitar l'acció de les nucleases (Figura 13b). No obstant, el recobriment de RPA també impedeix l'assemblatge de RAD51 al ssDNA i es requereix de l'acció de mediadors per poder generar el nucleofilament de RAD51 (Figura 13b-c). Tot i que el mecanisme d'acció dels mediadors no està clar, s'han identificat diverses proteïnes implicades, com BRCA2 i paral·legs de RAD51 (RAD51B/C/D, XRCC2/3) (San Filippo et al. 2008; Jensen et al. 2010; Liu et al. 2010; Suwaki et al. 2011).

El recobriment del DNA per part de RAD51 permet la invasió de la doble hèlix de la cromàtide germana per buscar un fragment homòleg, formant el llaç D (*D-loop*) (Figura 13d). Posteriorment, RAD54 (*DNA repair and recombination protein RAD54-like*) promou el desassemblatge del nucleofilament de RAD51 de l'heterodúplex de DNA, permetent així la síntesi de la nova cadena (Solinger et al. 2002; Mazin et al. 2010). PCNA (*proliferating cell nuclear antigen*) dirigeix la polimerasa delta (Pol δ) al *D-loop* i la dota d'una elevada processivitat en l'addició de nucleòtids copiant la cadena motlle (Maloisel et al. 2008; Li et al. 2009).

Finalment, la doble unió de Holliday, generada per la síntesi de DNA, és dissolta mitjançant l'acció conjunta de l'helicasa BLM i la topoisomerasa III α (Wu i Hickson 2003; Mazón et al. 2010). D'aquesta manera, s'aconsegueix un producte final sense entrecruaments de DNA, evitant la potencial inestabilitat genòmica associada a aquests.

La via de reparació Alt-EJ

La via de reparació Alt-EJ és poc coneguda i també s'anomena d'altres formes com *alternative NHEJ* (altNHEJ o aNHEJ), *microhomology-mediated end joining* (MMEJ), *backup NHEJ* (B-NHEJ), *polimerase theta mediated end joining* (TMEJ) o *KU-independent end joining*. Tot i que molts dels detalls a nivell mecànic relacionats amb aquesta via de reparació romanen sense resoldre, s'ha descrit la seva implicació en diferents contextos cel·lulars. Degut al seu potencial altament mutagènic es creia que funcionava com a via de *backup* dels mecanismes canònics (Wang et al. 2003; Iliakis et al. 2004; Her i Bunting 2018). Tanmateix, estudis més recents apunten a la seva actuació a les diferents fases del cicle cel·lular i en contextos en que la c-NHEJ i la HR també són funcionals (Deriano i Roth 2013; Iliakis et al. 2015). Tot i que la reparació es dona per lligació dels extrems sense necessitat d'un elevat grau d'homologia, de manera similar a la NHEJ canònica, es tracta de dues vies que utilitzen mecanismes moleculars diferents (Bennardo et al. 2008). L'interès creixent dels últims anys per aquest mecanisme es deu a la seva rellevància en càncer, per les reorganitzacions cromosòmiques que sovint se'n deriven (Simsek i Jasin 2010; Zhang i Jasin 2011).

Inicialment, la Alt-EJ requereix del processament dels extrems dirigit per CtIP i MRN per tal de generar *overhangs* 3' (Figura 14). Aquest estadi es compartit amb la HR i es creu que està regulat per la competència entre RAD51 i PARP1 (*poly [ADP-ribose] polymerase 1*). PARP1 serveix de plataforma per al reclutament d'altres proteïnes involucrades en la Alt-EJ, com la polimerasa theta (Pol θ), que inhibeix la formació del nucleofilament de RAD51, bloquejant així la HR (Figura 14) (Ceccaldi et al. 2016; Mateos-Gomez et al. 2015). La Pol θ juga un paper clau en la reparació via Alt-EJ, en la que hi té diferents funcions. Per un costat, participa en l'estabilització dels extrems 3' protuberants generats amb la resecció. A partir de zones de microhomologia de mínim 2 parells de bases, és capaç d'afegir nucleòtids en una de les cadenes utilitzant com a motlle la cadena en la que ha trobat la microhomologia

(Kent et al. 2015; Wyatt et al. 2016). Es tracta d'una polimerasa de baixa fidelitat, capaç de passar per alt lesions com ara llocs abàsics, que impedirien la progressió de la síntesi per part d'altres polimerases (Hogg et al. 2012; Yousefzadeh i Wood 2013). A més, la Pol θ presenta activitat transferasa, que li permet afegir nucleòtids i generar microhomologia quan aquesta no està present (Kent et al. 2016). Finalment, un cop generada la nova cadena, la reparació per Alt-EJ es completa amb la unió dels extrems per part de la DNA lligasa III o la DNA lligasa I (Simsek et al. 2011; Paul et al. 2013).

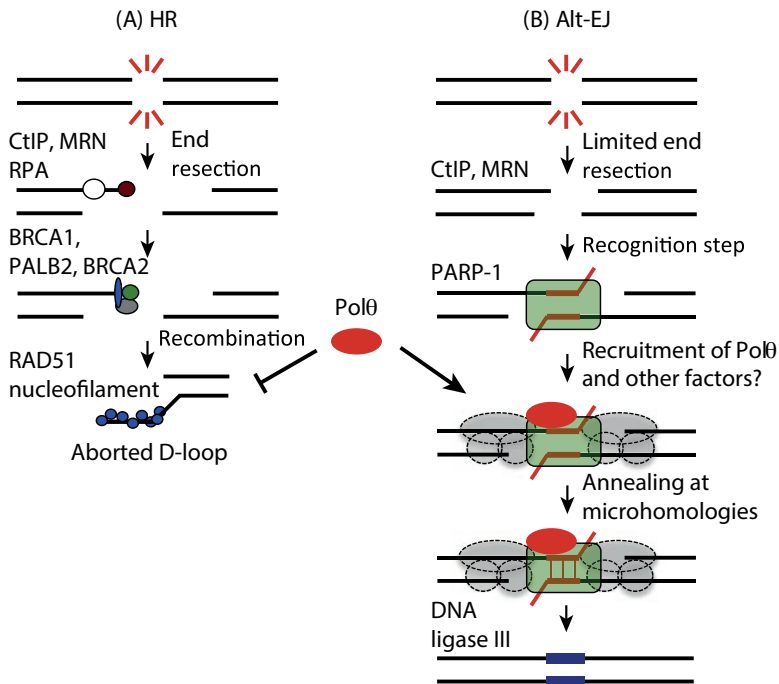


Figura 14. Via de reparació de la Alt-EJ. PARP1 i la Pol θ juguen un paper crucial en la regulació de la competència entre la HR i la Alt-EJ pels extrems del DNA reseccionats. Figura modificada de Ceccaldi et al. 2016 (Copyright © 2015) amb el permís d'Elsevier.

2. L'envelliment

2.1. Característiques de l'envelliment

L'envelliment és un procés degeneratiu natural que pateixen els organismes i que culmina amb la mort de l'individu. Es tracta d'un fenotip complex en què es veu afectada la fisiologia de tot l'organisme (Vijg 2007). El 2013, López-Otín i col·laboradors van definir 9 processos cel·lulars i moleculars involucrats en l'envelliment, els anomenats *hallmarks of aging*; signes de l'envelliment (Figura 15).



Figura 15. Enumeració dels *hallmarks* de l'envelliment. Figura reproduïda de López-Otín et al. 2013 (Copyright © 2013) amb el permís d'Elsevier.

Aquests signes es poden classificar en tres categories en funció de la seva implicació en el procés d'envelliment (Figura 16). Un primer grup inclou els signes primaris, com la inestabilitat genòmica, l'erosió telomèrica, les alteracions epigenètiques i la pèrdua d'homeòstasi proteica. Són considerats els causants del dany cel·lular associat a l'envelliment i són inequívocament negatius. A més, existeix una estreta relació entre ells, ja que l'alteració d'un pot comprometre els altres. És el cas, per exemple, de les alteracions epigenètiques que poden afectar la transcripció i el reclutament de les proteïnes de reparació, reduint l'efectivitat de la maquinaria de reparació, la qual cosa podria traduir-se en un increment de lesions sense reparar al DNA i, per tant, en un increment de la inestabilitat genòmica.

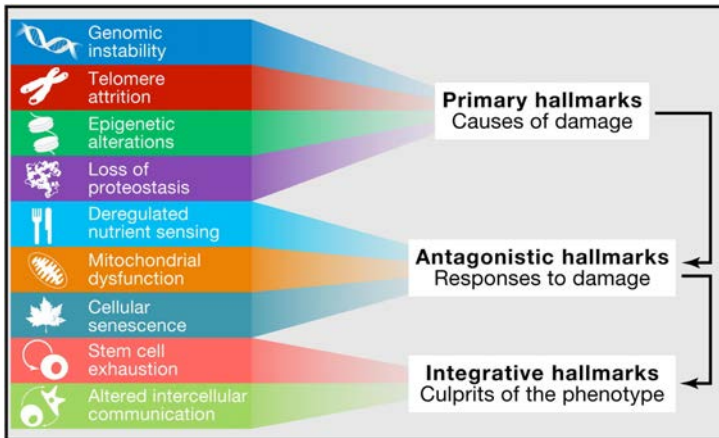


Figura 16. Classificació dels *hallmarks* de l'envelliment. Figura reproduïda de López-Otín et al. 2013 (Copyright © 2013) amb el permís d'Elsevier.

El segon grup inclou els signes antagonistes o de resposta al dany, com la desregulació en la detecció dels nutrients, la disfunció dels mitocondris o la senescència. En funció de la intensitat amb la que es manifesten, el seu efecte és favorable o desfavorable: són beneficiosos a nivells baixos però en canvi a nivells elevats, o quan es cronifiquen, esdevenen deleteris. Per exemple, la senescència protegeix l'organisme contra el càncer perquè evita la proliferació de cèl·lules que han arribat al seu límit replicatiu, però una acumulació excessiva de cèl·lules senescentes en un teixit promou l'envelliment.

Finalment, el tercer grup està format pels signes integratius, que són aquells que es donen com a conseqüència dels dos anteriors i que afecten directament l'homeòstasi i la funcionalitat. És el cas de de l'alteració en la comunicació intercel·lular i l'esgotament de cèl·lules mare, necessàries per al reposicionament de les cèl·lules senescentes que s'acumulen als teixits.

La complexitat del procés d'envelliment i l'elevada interconnexió existent entre els diferents signes dificulten la determinació exacta del mecanisme o mecanismes causants. Des de fa anys s'ha considerat el dany al DNA com la principal causa de l'envelliment (Gensler i Bernstein 1981). Tanmateix, establir si el dany al DNA és la causa o la conseqüència de l'envelliment és objecte d'intens debat (Chen et al. 2007; Moskalev et al. 2013; Gorbunova i Seluanov 2016; White i Vijg 2016; Vijg i Montagna 2017). Així mateix, determinar quin és el mecanisme molecular que dona lloc a l'envelliment és una altra de les qüestions que romanen sense resoldre's.

2.2. Inestabilitat genòmica

La inestabilitat genòmica es caracteritza per la incapacitat de les cèl·lules per mantenir la integritat del genoma i desemboca en l'adquisició d'alteracions genòmiques (Vijg i Suh 2013). Els primers indicis de la relació entre la inestabilitat genòmica i l'envelliment daten de finals del anys 40, quan es va descobrir que baixes dosis de radiació escurçaven l'esperança de vida i incrementaven l'acumulació de lesions patològiques en el DNA (Henshaw et al. 1947; Curtis 1963). Posteriorment, Szilard (1959) va publicar la *Somatic Mutation Theory of Aging*, en què proposava l'acumulació de mutacions al DNA com a causa principal de l'envelliment. Des de llavors, diversos grups d'investigació han aportat evidències i han debatut intensament sobre l'estreta relació entre les mutacions somàtiques i l'envelliment (Vijg 2000; Hoeijmakers 2009; Freitas i de Magalhães 2011; Moskalev et al. 2013).

L'acumulació de dany al DNA al llarg de la vida es tradueix en un increment en el nombre de mutacions somàtiques en els organismes envellits. En ratolins, les mutacions puntuals incrementen amb l'edat de l'individu en proporció variable en funció del teixit estudiat (Figura 17) (Dollé et al. 2000; Vijg i Dollé 2002; Busuttill et al. 2007). Es creu que aquesta variabilitat és deguda probablement a que les mutacions tenen el seu origen en errors que s'han produït durant la replicació del DNA i que, per tant, la probabilitat d'acumular-les és més elevada en teixits proliferativament més actius (Moskalev et al. 2013).

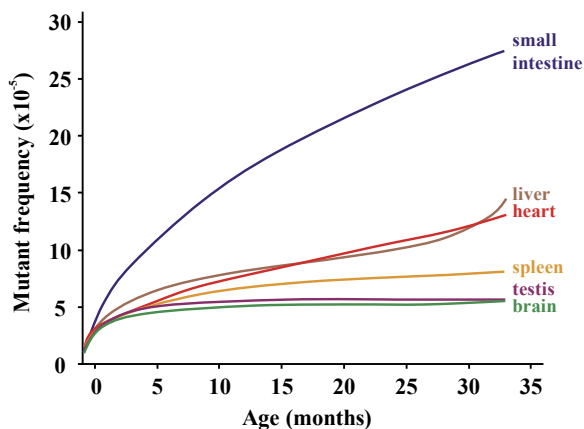


Figura 17. Freqüència de mutacions espontànies a diferents teixits de ratolins en funció de la seva edat. Figura modificada de Vijg i Dollé 2002 (Copyright © 2002) amb el permís d'Elsevier.

Si les mutacions s'acumulen amb l'edat, no és d'estranyar que també s'hagi descrit un increment associat a l'edat de reorganitzacions genòmiques i d'aberracions cromosòmiques. En ratolins, s'ha observat un increment de reorganitzacions genòmiques, d'alteracions cromosòmiques estructurals i d'aneuploidies al cor, al fetge i

als limfòcits d'individus envellits (Curtis i Crowley 1963; Dollé et al. 1997; Tucker et al. 1999; Dollé et al. 2000; Busuttill et al. 2007). Pel que fa als humans, també existeixen nombroses evidències d'un increment d'anomalies cromosòmiques estructurals en limfòcits (Ramsey et al. 1995; Bolognesi et al. 1997; Vorobtsova et al. 2001) i fibroblasts (Kalfalah et al. 2015) provinents de donants d'edat avançada. En conjunt, tot i que la freqüència d'aquestes mutacions variï en funció del teixit analitzat, els resultats provinents tant de models murins com de cèl·lules humanes suggereixen un increment de la freqüència de reorganitzacions al genoma de les cèl·lules associat a l'edat.

L'acumulació de mutacions i reorganitzacions cromosòmiques en el genoma dels organismes envellits és el resultat de lesions al DNA que romanen sense reparar o que han estat reparades de forma incorrecta. D'acord amb això, s'ha observat, per exemple, un increment en la formació de llocs abàsics (Atamna et al. 2000) o de productes resultants de la oxidació del DNA com les 8-oxoguanines (Mecocci et al. 1999; Hamilton et al. 2001; Lu et al. 2004) en diversos teixits envellits de rata i d'humans. També s'ha observat un increment en els nivells endògens de DSBs en neurones de rates (Mandavilli i Rao 1996) i en teixits somàtics (fetge, ronyó, pulmó i cervell) i germinals (testicles) de ratolins envellits (Sedelnikova et al. 2004). De manera similar, en humans s'ha descrit una acumulació de DSBs en fibroblasts i cèl·lules epitelials de pròstata senescentes (Sedelnikova et al. 2004), així com en fibroblasts i cèl·lules epitelials mamàries envellides *in vitro* (Sedelnikova et al. 2008; Hernández et al. 2013).

Pel que fa a teixit humà provinent de persones d'edat avançada, s'ha observat un increment en el nivell basal de DSBs associat a l'edat en limfòcits (Sedelnikova et al. 2008; Sharma et al. 2015), cèl·lules mare hematopoètiques (Rübe et al. 2011), oòcits (Titus et al. 2013), endoteli de la còrnia (Joyce et al. 2011) i fibroblasts (Kalfalah et al. 2015). Aquests estudis s'han realitzat mitjançant la quantificació de foci de γ H2AX per immunofluorescència (IF), marcador àmpliament utilitzat com a indicador de la presència de DSBs (Rothkamm et al. 2015). No obstant, no tots els estudis són concloents en aquest aspecte. Per exemple, Li i col·laboradors (2016) van utilitzar la quantificació del nombre de foci de γ H2AX i també l'assaig del cometa per analitzar la freqüència de DSBs en fibroblasts de parpella provinents de 50 dones d'entre 16 i 75 anys, i només van poder detectar un increment significatiu de DSBs a nivell basal associat a l'edat amb l'assaig del cometa. En general, la baixa freqüència basal de DSBs als diferents teixits, juntament amb la variabilitat interindividual d'aquesta freqüència

comporta una disminució del grau de significació de les diferències observades amb l'edat. A més, en els estudis en humans suposa una gran dificultat l'obtenció de mostres de donants sans d'edat avançada i amb un *background* comú pel què fa a malalties, exposició a substàncies químiques o radiació, que homogeneïtzi la mostra. És per aquest motiu que la majoria de dades provenen d'uns pocs teixits o han estat obtingudes a partir d'un nombre de donants reduït. Tanmateix, tot i que es requereix ampliar els anàlisis a més teixits, la tendència general apunta a un increment en la freqüència basal dels DSBs amb l'edat dels donants. Així doncs, el conjunt de dades recollides aporten evidències d'un increment en la inestabilitat genòmica associada a l'edat dels organismes i alhora plantegen la següent qüestió: per què s'acumula dany al DNA dels organismes envellits?

2.3. Els mecanismes de reparació del DNA i el procés d'envelliment

Existeixen diverses teories proposades per experts en múltiples disciplines que intenten explicar quines són les causes de l'envelliment. En la vessant biològica, s'ha proposat que l'increment de dany en el DNA en organismes envellits és degut a un efecte estocàstic, és a dir, a l'acumulació progressiva de lesions amb el pas del temps (Vijg 2000; Garinis et al. 2008; Kirkwood 2005). La teoria dels radicals lliures proposa que la disfunció progressiva dels mitocondris amb l'edat comporta un increment en la producció d'espècies reactives d'oxigen (ROS; *Reactive Oxygen Species*) i, per tant, un increment del dany al DNA (Harman 1956). Tanmateix, alguns treballs més recents evidencien una falta de correlació entre els nivells de ROS i la longevitat d'algunes espècies, qüestionant la tesi clàssica de que l'acumulació de ROS és el desencadenant principal de l'envelliment (Chen et al. 2007; Hekimi et al. 2011).

Hi ha evidències creixents que l'alteració dels mecanismes de reparació del dany al DNA associada a l'edat podria contribuir a l'increment de les lesions en organismes envellits. Després de l'exposició a radiació ionitzant, les cèl·lules senescentes o envellides *in vitro* presenten dificultats en la reparació dels DSBs radioinduïts i acumulen una major freqüència de DSBs vàries hores després de la inducció d'aquestes lesions (Sedelnikova et al. 2004; Hernández et al. 2013). Tanmateix, hi ha resultats contradictoris pel que fa a la capacitat de reparació de DSBs radioinduïts en cèl·lules humanes provinents de donants d'edat avançada que es resumeixen a la Taula 1. Per un costat, Rube i col·laboradors (2011), mitjançant el recompte de foci de γ H2AX a diferents temps post-irradiació van observar una disminució en la capacitat de reparació del DNA a les cèl·lules mare

Taula 1. Recull de treballs que avaluen la reparació dels DSBs en mostres provinents de persones de diferents edats.

Autors (any)	Tipus cel·lular	Donants (N, edat i sexe)	Tractament	Temps pIR	Tècnica	Resultats	Conclusió
Sedeinikova i col·laboradors (2008)	Fibroblasts (pulmó o pell) Linfòcits de sang perifèrica	N=3; 35, 49 i 61 anys No informa sexe N=26; 21-76 anys (basal) (irradiat <i>ex vivo</i>) No informa sexe	0,6 Gy Rajos gamma 0,6 Gy Rajos gamma	No irradiat 0,5h i 24h No irradiat 0,5h i 8h	Recòmpte de foci de γ H2AX per IF	\uparrow nivell basal de foci de γ H2AX amb edat \approx nivell de foci de γ H2AX a les 0,5h pIR amb edat \approx nivell residual de foci de γ H2AX amb edat	Capacitat de reparació no alterada amb l'edat
Rübe i col·laboradors (2011)	Cèl·lules mare hematopoietiques (cordó umbilical o sang perifèrica)	N=34; 0 anys N=68; 16-83 anys No informa sexe	2 Gy Rajos X	No irradiat 0,5h; 8h i 24h	Recòmpte de foci de γ H2AX per IF	\uparrow nivell basal de foci de γ H2AX amb edat \approx nivell de foci de γ H2AX a les 0,5h pIR amb edat \uparrow nivell residual de foci de γ H2AX amb edat	Capacitat de reparació disminuïda amb l'edat
Garm i col·laboradors (2013)	Cèl·lules mononuclears de sang perifèrica	N=216; 40-77 anys (Registre bessons danès) Homes i dones	6 Gy Rajos gamma	No irradiat 0h i 3h (cometa) 1h (citometria)	Assaig del cometa i mesura de la intensitat de fluorescència de γ H2AX (IF) amb citometria de flux	Tendència no significativa a \downarrow capacitat reparació DSBs amb edat Tendència no significativa a \downarrow formació de γ H2AX 1h pIR amb edat	Capacitat de reparació tendeix a disminuir amb l'edat
Kalfalah i col·laboradors (2015)	Fibroblast (pell)	N=15; 20-67 anys Dones	3,8 Gy No específica	No irradiat Des de 0 fins 90 minuts pIR	Western blot de γ H2AX Detecció fluorimètrica del DNA <i>unwinding</i> alcalí (assaig FADU)	\uparrow nivell basal de γ H2AX amb edat $\uparrow\downarrow$ activitat i capacitat reparació de DSBs amb edat	Capacitat de reparació heterogènia amb l'edat
Sharma i col·laboradors (2015)	Linfòcits de sang perifèrica	N=94; 19-50 anys Homes i dones	4 Gy Rajos gamma	No irradiat 0,5h; 2h; 4h; 7h i 24h	Intensitat fluorescència (IF) de γ H2AX de tot el nucli (sistema RABIT)	\uparrow nivell basal de foci de γ H2AX amb edat Tendència no significativa a \uparrow nivell de foci de γ H2AX a les 0,5h pIR amb edat \uparrow taxa reparació DSBs inicial (fins a 2h pIR) amb edat \downarrow nivell residual de foci de γ H2AX amb edat	Capacitat de reparació augmentada amb l'edat
Li i col·laboradors (2016)	Fibroblasts (parpella)	N=28; 16-75 anys Dones	8 Gy Rajos X	No irradiat 2h i 16h	Assaig del cometa i recòmpte de foci de γ H2AX per IF	\uparrow (cometa) o \approx (nombre foci de γ H2AX a nivell basal amb edat \approx nivell de foci de γ H2AX a les 2h pIR amb edat \uparrow nivell residual de foci de γ H2AX amb edat	Capacitat de reparació disminuïda amb l'edat

Llegenda: \uparrow : increment \downarrow : disminució \approx : aproximadament igual N: nombre de cèl·lules IF: immunofluorescència

hematopoètiques provinents de donants d'edat avançada. Al 2013, Garm i col·laboradors van descriure una tendència similar associada a l'edat. En aquest treball es van analitzar limfòcits provinents de parelles de bessons d'entre 40 i 77 anys exposats *ex vivo* a 6Gy de rajos gamma, i es va analitzar la capacitat de reparació de DSBs mitjançant l'assaig del cometa i la quantificació de la intensitat de fluorescència de γ H2AX amb citometria de flux. En canvi, Li i col·laboradors (2016) no van observar diferències associades a l'edat en el recompte de foci de γ H2AX a les 2h després d'irradiar fibroblasts, però si una acumulació residual de foci de γ H2AX en les donants d'edat avançada. Per la seva banda, Sedelnikova i col·laboradors (2008) van analitzar el nombre de foci de γ H2AX en fibroblasts i limfòcits procedents de 3 donants de diferents edats després de ser irradiats *ex vivo* a 0,6Gy i no van trobar diferències ni a temps curts post-irradiació (pIR), ni a temps llargs. En el seu estudi, Kalfalah i col·laboradors (2015) van descriure una elevada heterogeneïtat en la reparació de DSBs en fibroblasts de donants d'edat avançada, monitoritzada mitjançant l'assaig FADU (*fluorimetric detection of alkaline DNA unwinding*). Finalment, Sharma i col·laboradors (2015) van irradiar limfòcits de 94 donants d'entre 19 i 50 anys amb 4Gy de rajos gamma, i van descriure un increment en la taxa de reparació de DSBs associada a l'edat dels donants. Per tant, tot i que diversos estudis han abordat l'estudi de l'eficiència de la reparació dels DSBs amb l'envelliment des de diferents perspectives, incloent-hi diferents tipus cel·lular, fonts d'inducció de dany i tècniques d'assaig utilitzades, no s'ha arribat a un consens general sobre la relació entre l'envelliment i la disminució en l'eficiència de reparació de dany en el DNA capaç d'afavorir l'acumulació de lesions no reparades en el DNA.

2.3.1. Mutacions de proteïnes de reparació del DNA i envelliment prematur

Les primeres evidències sòlides de la relació entre la reparació del DNA i l'envelliment provenen d'estudis en pacients afectats per malalties que es manifesten amb envelliment prematur. Moltes d'aquestes malalties tenen l'origen en mutacions en gens involucrats en la reparació de les lesions al DNA (Coppede i Migliore 2010; Freitas i de Magalhães 2011; Moskalev et al. 2013). Una de les síndromes d'envelliment prematur més ben caracteritzades és la síndrome de Werner, causada per mutacions al gen *WRN* de la família d'helicases RecQ. La proteïna WRN (*Werner syndrome ATP-dependent helicase*) és una helicasa que funciona en la resolució de les forquetes de replicació aturades i en la reparació de DSBs per la vies de la HR i de la c-NHEJ. Els pacients amb aquesta síndrome presenten un fenotip greu de progèria i una incidència elevada de càncer (Chen i Oshima 2002; Bohr 2002; Opresko et al. 2003). Un altre exemple el trobem en

pacients amb la síndrome atàxia-telangiectasia, que, a més dels símptomes característics a nivell neurològic i immunològic, presenten un fenotip d'envelliment prematur i una elevada predisposició al càncer (Rothblum-Oviatt et al. 2016) a causa de la mutació d'ATM, una proteïna reguladora essencial en la resposta als DSBs (Figura 4 i Figura 5a) (Shiloh 2001; Derheimer i Kastan 2010).

En el cas d'algunes proteïnes de reparació no s'ha descrit la seva mutació en síndromes humanes, però el seu efecte sobre els mecanismes de reparació del DNA i l'envelliment s'ha pogut demostrar amb ratolins modificats genèticament. Per exemple, l'alteració de gens involucrats en la c-NHEJ com Ku70/80 (Li et al. 2007) o DNA-PKcs (Espejel et al. 2004) dona lloc a l'aparició d'un fenotip d'envelliment prematur. No només l'alteració de proteïnes que participen en les vies de reparació de manera directa, sinó també d'aquelles que ho fan indirectament, pot donar lloc a un fenotip d'envelliment accelerat. És el cas de la SIRT6 (sirtuin 6) que, entre altres funcions, està involucrada en la desacetilació de CtIP (Kaidi et al. 2010) i en l'estabilització de DNA-PKcs (McCord et al. 2009). La deficiència d'aquesta desacetilasa dona lloc a un increment de la inestabilitat genòmica acompanyat d'envelliment prematur sever dels ratolins afectats (Mostoslavsky et al. 2006). Per tant, tot i que el procés d'envelliment en les síndromes i els fenotips descrits no compleix totes les característiques del procés d'envelliment normal, sí que proporciona evidències moleculars de l'existència d'un vincle estret entre l'eficiència dels mecanismes de reparació del DNA i el control de la integritat genòmica durant el procés d'envelliment.

2.3.2. Disminució en l'eficiència de les vies de reparació amb l'edat

La mesura de l'activitat de les principals vies de reparació també ha aportat algunes evidències sobre una disminució en l'eficiència de reparació associada a l'envelliment. La primera prova d'una disminució en la c-NHEJ prové de cèl·lules senescentes co-transfectades amb el gen de l'enzim de restricció I-SceI per tal d'induir DSBs de manera dirigida i un plàsmid reporter GFP (*Green Fluorescent Protein*), que només emet fluorescència quan el DSB generat amb l'I-SceI ha estat reparat per aquesta via (Seluanov et al. 2004). En aquest estudi es va observar una reducció en l'activitat de reparació de fins a 4,5 vegades en les cèl·lules pre-senescentes i senescentes, en comparació a les cèl·lules joves. Posteriorment, en neurones del còrtex cerebral de rates envellides es va observar una disminució en la capacitat de lligació d'un plàsmid prèviament linearitzat amb enzims de restricció (Vyjayanti i Rao 2006; Sharma 2007), que podria estar relacionada amb una

disminució de la capacitat de reunió d'extrems de DNA per la via c-NHEJ. Més recentment, utilitzant també un sistema de plàsmids reporters per la c-NHEJ es va observar una disminució associada a l'edat en l'activitat d'aquesta via en diferents teixits de ratolí (Vaidya et al. 2014), així com en fibroblasts humans provinents de donants de més edat (Li et al. 2016). En aquest últim estudi, Li i col·laboradors també van mesurar l'activitat de la via de la HR, i van observar una elevada correlació positiva entre l'activitat d'una i altra via de reparació del DNA. La disminució en l'activitat de la HR associada a l'edat concorda amb estudis anteriors, en què s'observà una disminució en l'activitat d'aquesta via en diversos teixits de ratolins envellits (White et al. 2013; Sukup-Jackson et al. 2014). Així doncs, tot i les escasses evidències obtingudes en cèl·lules humanes i la limitada varietat dels teixits utilitzats en aquests estudis, les dades fins ara publicades apunten a una disminució en l'activitat de les principals vies de reparació del DNA en els organismes envellits, encara que el mecanisme molecular que rau sota aquesta disminució roman sense resoldre's.

En conjunt, tot i la creixent evidència sobre la implicació de les vies de reparació en l'envelliment, encara es desconeix quin és el mecanisme subjacent a la disminució en la capacitat de reparació i a l'increment del nombre de DSBs amb l'edat. Conèixer les bases moleculars d'aquest deteriorament en la capacitat de reparar el DNA podria proporcionar eines adequades per endarrerir el procés d'envelliment i per millorar la qualitat de vida de la gent gran. A més, donada l'estreta relació entre l'envelliment i l'aparició del càncer, el coneixement dels mecanismes responsables de l'increment en la inestabilitat genòmica amb l'edat podria també proporcionar noves maneres per combatre l'elevada incidència de càncer durant la vellesa, una etapa de la vida especialment susceptible a aquesta malaltia.

3. Model cel·lular d'envelliment: les HMECs pre-stasis

Una de les limitacions en l'estudi del procés d'envelliment en humans és la dificultat per obtenir mostres procedents de persones sanes, especialment d'edat avançada, de teixits rellevants des del punt de vista del càncer. Des del 1976 els laboratoris de la Martha Stampfer i el Mark LaBarge han treballat en el desenvolupament i la caracterització d'una metodologia de cultiu que permet la derivació de cèl·lules epitelials mamàries humanes (HMECs; *Human Mammary Epithelial Cells*) a partir de teixit mamari sa i la propagació de les línies obtingudes (Stampfer et al. 2013). Actualment disposen d'un

banc de mostres que inclou des de cultius primaris d'organoides, fins a línies immortals transformades (<http://hmec.lbl.gov>). Les cèl·lules amb un baix nombre de PD (*Population Doubling*) en cultiu, que es troben en una fase anomenada *pre-stasis* (*stress or aberrant signalling-induced senescence*), provinents de donants de diferents edats són d'especial interès en l'estudi de l'envelliment humà. Tot i que es tracta d'un model cel·lular en què les cèl·lules no es troben dins el microambient de la glàndula mamària, les HMECs *pre-stasis* suposen una eina d'elevada vàlua per als estudis d'envelliment natural en humans, ja que permeten comparar l'eficiència de diversos mecanismes moleculars en cèl·lules derivades de cultius primaris i genòmicament estables de donants sanes de diferents edats, essent doncs un model d'especial interès en l'estudi de l'envelliment humà.

3.1. Derivació i cultiu de les HMECs

Les HMECs es poden obtenir a partir de teixits sans de la glàndula mamària (Caixa 2) descartats en procediments quirúrgics. Generalment les mostres provenen de reduccions mamaris estètiques, motiu pel qual l'obtenció d'aquestes a partir de persones d'edat avançada és més limitada. En alguns casos, també es poden obtenir a partir del teixit no tumoral provinent de mastectomies.

Mitjançant una disgregació mecànica i enzimàtica, s'aïllen fragments de teixit glandular dels teixits circumdants. És a partir del cultiu d'aquests fragments, anomenats també organoides, que s'inicia el creixement d'un *outgrowth* de cèl·lules que preserven marcadors característics de cèl·lules mioepiteliais, luminals o progenitores en funció del llinatge del què provenen (Figura 18) (Stampfer et al. 1980; LaBarge et al. 2013). Un cop les HMEC derivades de la mama es troben en cultiu continuen proliferant, però ho fan de manera limitada, ja que els mecanismes cel·lulars responsables del manteniment de la integritat genòmica eviten la divisió cel·lular descontrolada, impeding el creixement infinit del cultiu.

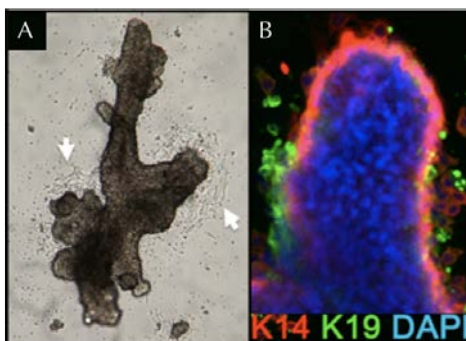


Figura 18. Cultiu primari d'organoides. (A) Creixement de cèl·lules a partir d'un organoide. (B). Marcatge per immunofluorescència de la citoqueratina 14 (K14) i de la citoqueratina 19 (K19) per tal d'identificar els diferents llinatges epitelials creixents a l'*outgrowth*. Les cèl·lules luminals són K14-/K19+, les cèl·lules mioepiteliais són K14+/K19- i les progenitores són K14+/K19+. Figura adaptada de LaBarge et al. 2013.

Caixa 2. La glàndula mamària

La glàndula mamària és un òrgan característic dels mamífers que té com a funció principal la producció i secreció de llet per tal d'alimentar els nounats (Medina 1996). El desenvolupament de la glàndula es dona en diverses etapes des de la vida embrionària fins a l'edat adulta, i no és fins després del part, a la lactància, quan assoleix el desenvolupament complet (Hassiotou i Geddes 2013).

Estructuralment, la glàndula mamària està formada per teixit glandular i estromal. El teixit glandular inclou els lòbuls i els conductes galactòfors que porten la llet cap al mugró, mentre que l'estroma ocupa l'espai entre aquests i està format principalment per teixit fibrós i adipós, en proporció variable en funció de l'edat (Figura 19A) (Hennighausen i Robinson 2005; Pandya i Moore 2011; Bussard i Smith 2011).

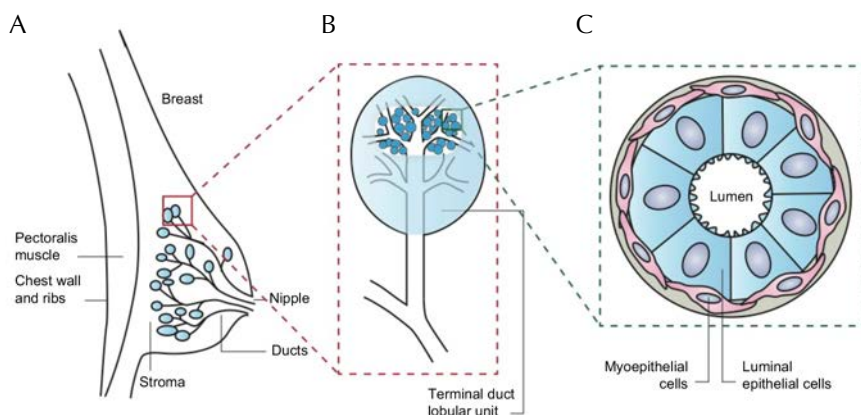


Figura 19. Estructura de la glàndula mamària. (A) El teixit glandular inclou els lòbuls i els conductes galactòfors que desemboquen al mugró i es troba sustentat per l'estroma. (B) Detall de la part terminal d'un lòbul, compost per diversos lobulets. (C) Detall dels tipus cel·lulars que constitueixen els lobulets. Figura modificada de McMaster Pathophysiology Review (Copyright © 2012-2018). Autors: Dr. Eric Wong i Dr. Sultan Chaudhry (www.pathophys.org/breast-cancer/).

Cada glàndula mamària conté uns 15-20 lòbuls que estan dividits en 20-40 lobulets (Figura 19B). La capa més propera a la llum del túbul està formada per cèl·lules epitelials luminals que s'encarreguen de la producció de llet durant la lactància (Figura 19C). La capa més distal, en canvi, està formada per cèl·lules mioepiteliales, que proporcionen suport estructural i s'encarreguen de la contracció del túbul per facilitar l'expulsió de la llet durant la lactància. Ambdós llinatges de cèl·lules epitelials mamàries tenen un origen comú, ja que provenen de cèl·lules mare mamàries multipotents. A partir d'aquestes s'originen les cèl·lules progenitores mioepiteliales i luminals que, al seu torn, es diferenciarien originant les cèl·lules mioepiteliales i luminals (Visvader i Stingl 2014).

Després de pocs PD en cultiu *in vitro*, i en resposta a l'estrès, les HMEC presenten una aturada en la proliferació que és dependent de p16. Aquesta etapa es coneix com *stasis* i està mediada per la via de retinoblastoma (Rb) (Figura 20A) (Garbe et al. 2009; Stampfer et al. 2013). El moment en què es dona l'*stasis* depèn en gran mesura de les condicions de cultiu i de la composició del medi, podent oscil·lar entre el PD 10 i el 60 (Figura 20B) (Stampfer et al. 1980; Hammond et al. 1984; Garbe et al. 2009). L'expressió de p16 a les cèl·lules en *stasis* (Brenner et al. 1998; Garbe et al. 2009) va acompanyada d'un canvi morfològic: les cèl·lules esdevenen amples, allargades i vacuolades, i presenten activitat beta-galactosidasa, característiques típiques de les cèl·lules senescentes (Campisi 2013). Les cèl·lules en *stasis* estan aturades a la fase G1 del cicle cel·lular, però són metabòlicament actives i continuen essent viables. A més, presenten un cariotip estable i no hi ha un escurçament telomèric crític (Romanov et al. 2001; Garbe et al. 2009). Només aquelles cèl·lules que adquireixin alteracions genètiques o epigenètiques en les vies que regulen Rb, com ara la metilació del promotor de *p16* que comporta la inactivació d'aquest gen, podran superar l'*stasis* i continuar proliferant (Hammond et al. 1984; Stampfer i Bartley 1985; Brenner et al. 1998; Novak et al. 2009). Tanmateix, les cèl·lules *post-stasis* acumulen reorganitzacions cromosòmiques progressivament, incloent translocacions, delecions i fusions telomèriques, entre d'altres (Romanov et al. 2001; Tlsty et al. 2001; Soler et al. 2005).

La segona aturada en el cultiu de les HMECs (Figura 20B) és deguda a un escurçament progressiu dels telòmers al llarg de les successives divisions *post-stasis*. L'escurçament crític dels telòmers genera inestabilitat genòmica i una activació persistent de la DDR, que promourà l'aturada del creixement cel·lular. Aquesta barrera es coneix com agonescència en el cas que les cèl·lules presentin la via de p53 funcional, en canvi, s'anomena crisi quan hi ha p53 inactivat, ja que dona lloc a una mort cel·lular generalitzada (Romanov et al. 2001; Garbe et al. 2007). Únicament aquelles cèl·lules que puguin mantenir estable la longitud dels seus telòmers, ja sigui expressant suficient telomerasa o mitjançant mecanismes de recombinació de tipus ALT (*Alternative Lengthening of Telomeres*), seran capaces de superar aquesta barrera, esdevenint així immortals (Cesare i Reddel 2010; Garbe et al. 2014).

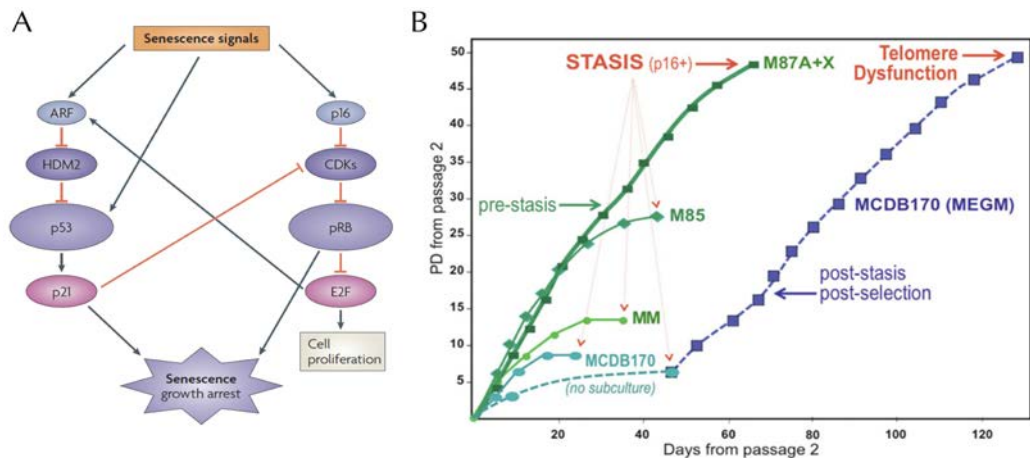


Figura 20. Etapes del cultiu d'HMECs i resposta a l'estrès. (A) Vies de senyalització implicades en la senescència. Figura reproduïda de Campisi et al. 2007 (Copyright © 2007) amb el permís de Springer Nature. (B) Creixement d'HMECs provinents de la mateixa donant en diferents medis. Les cèl·lules que creixen en els medis MM, M85 i M87A+X, que contenen sèrum, aturen el seu creixement un cop arriben a l'*stasis*. De tots ells, el medi M87A+X és el que permet allargar més el període pre-*stasis* ja que ho fa fins gairebé el PD 50. Per contra, les cèl·lules cultivades amb MCDB170, que no porta sèrum, entren a l'*stasis* al voltant del PD 5 i després d'unes setmanes sense proliferació sorgeixen algunes cèl·lules post-*stasis* que continuaran el seu creixement fins a l'aturada per disfunció telomèrica. Figura reproduïda de Stampfer et al. 2013 (Copyright © 2013) amb el permís de Springer Nature.

3.2. Cultiu de les HMECs pre-*stasis* en medi M87A+X

Al 2009, es va desenvolupar el medi de cultiu M87A+X amb l'objectiu de reduir l'estrès en cultiu de les HMECs i allargar així el període pre-*stasis* (Garbe et al. 2009) (Figura 20B). Fins aleshores els processos biològics de la glàndula mamària en humans només s'havien pogut estudiar en HMECs post-*stasis*, però aquestes cèl·lules presentaven un cariotip alterat degut a l'increment de la inestabilitat genòmica amb el temps en cultiu. És, per exemple, el cas de les línies comercials de cel·lulars epitelials mamàries que sovint es consideren primàries i normals però, en sentit estricte, són HMECs post-*stasis* i per tant no són línies primàries ni són cèl·lules normals.

La formulació del medi M87A+X pel cultiu d'HMECs pre-*stasis* es pot trobar detallada a la patent corresponent (referència WO 2017/053845) publicada el març de 2017. Bàsicament, l'M87 està format per un medi basal que es complementa amb diversos suplementes per estimular el creixement de les HMECs. El medi basal es pot obtenir a partir de la barreja dels medis comercials DMEM/F12 i Medium 171 en proporció 1:1. Pel que fa als suplementes, cal destacar l'albumina sèrica bovina (A) i la oxitocina (X) ja

que són els elements clau per incrementar la proliferació de les HMECs en l'etapa *pre-stasis* (Garbe et al. 2009). Per altra banda, l'addició de sèrum fetal boví, en un percentatge baix (0,25%) afavoreix el manteniment de la població de cèl·lules amb característiques luminals. Finalment també s'incorpora al medi toxina colèrica, suplement ja utilitzat en anteriors medis de cultiu de cèl·lules epitelials mamàries donat que estimula el seu creixement *in vitro* (Stampfer 1982).

El medi M87A+X, a banda d'allargar els PDs de les HMECs *pre-stasis*, permet mantenir l'heterogeneïtat dels llinatges epitelials presents a la glàndula mamària, aconseguint així una millor representació dels diferents tipus cel·lulars (Figura 21). El creixement de cèl·lules amb marcadors luminals i mioepitelials es manté durant les primeres setmanes de cultiu. No obstant, a partir del passatge 8 (aproximadament uns 30 PDs) es perden els marcadors luminals i la majoria de cèl·lules presenten exclusivament marcadors del llinatge mioepitelial (Garbe et al. 2009; LaBarge et al. 2013). Pel que fa a la proporció dels dos llinatges a la glàndula mamària, aquesta varia en funció de l'edat de les donants: a mesura que augmenta l'edat hi ha una reducció de la fracció mioepitelial i un consegüent enriquiment de la fracció luminal (Figura 21C) (Garbe et al. 2012).

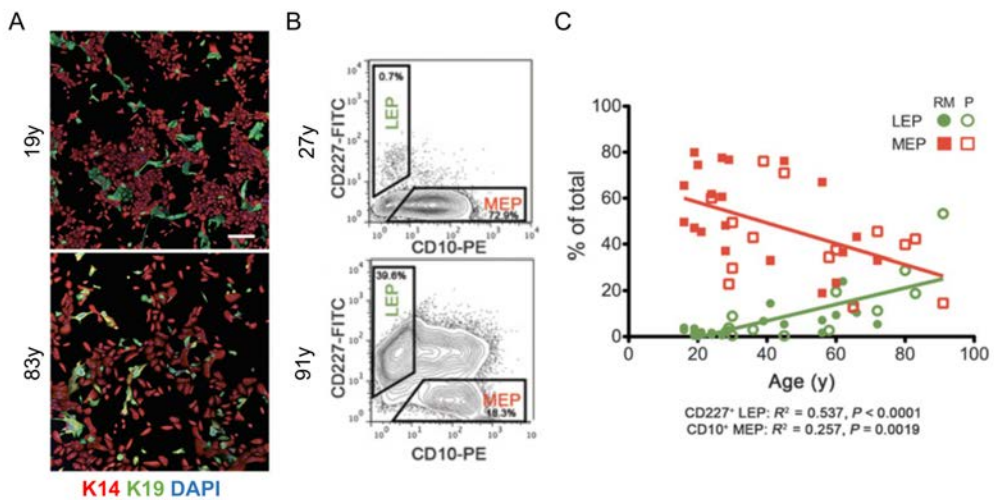


Figura 21. Proporció de cèl·lules amb característiques luminals i mioepitelials en funció de l'edat de la donant. (A) Immunofluorescència on es poden identificar cèl·lules mioepitelials (K14+/K19-) i luminals (K14-/K19+). (B) Citometria de flux on es diferencia una població de cèl·lules mioepitelials (CD10+/CD227-; MEP) i una població de cèl·lules luminals (CD10-/CD227+; LEP) (C) Proporció dels llinatges epitelials en HMECs provinents de 36 donants de diferents edats. Les mostres provenen de reduccions mamoplàstiques (RM) o de teixit perifèric no tumoral provinent de mastectomies (P). Figures modificades de Garbe et al. 2012 (Copyright © 2012) amb el permís de l'AACR.

La utilització del medi M87A+X per al cultiu de les HMECs redueix les condicions d'estrès *in vitro*, permetent allargar el període de proliferació d'aquestes cèl·lules abans de l'*stasis*, sense l'adquisició d'alteracions genòmiques i alhora mantenint les característiques del teixit de procedència. Per tant, es tracta d'una bona aproximació per estudiar els mecanismes cel·lulars que ocorren a l'organisme. L'ús de cèl·lules primàries HMECs pre-*stasis* provinents de donants de diferents edats permet definir els canvis en l'eficiència de les vies de detecció i resposta al dany al DNA associats a l'envelliment. A més, permet l'anàlisi d'aquests canvis prèviament a l'inici dels processos moleculars que desemboquen en una creixent inestabilitat genòmica en aquestes cèl·lules i que poden emascarar les variacions en aquests processos purament degudes a l'edat. Entendre els canvis que ocorren a nivell cel·lular i molecular en processos d'envelliment no patològic, obre la porta a determinar les causes naturals d'aquest procés i a identificar dianes terapèutiques per poder-lo combatre. Donat l'elevat percentatge de dones que pateixen càncer de mama, les cèl·lules epitelials mamàries suposen un model rellevant en carcinogènesi. És per això que determinar els mecanismes que acompanyen l'envelliment pot, a més, ajudar a comprendre com aquests canvis es relacionen amb l'increment de la probabilitat de desenvolupar altres processos associats a l'edat, com ara el càncer.

Hipòtesi i objectius

Hipòtesi de l'estudi

Deficiències en els mecanismes de reparació dels trencaments de doble cadena del DNA associades a l'edat poden contribuir a l'alteració en l'elecció de la via de reparació i, consegüentment, a l'increment de la inestabilitat genòmica en cèl·lules provinents de persones més grans.

Objectius

L'objectiu principal d'aquesta tesi és determinar quines són les deficiències en el funcionament dels mecanismes de reparació de DSBs associades a l'edat.

Per assolir aquest objectiu principal es plantegen els següents objectius concrets:

1. Analitzar la cinètica d'inducció i de reparació dels DSBs radioinduïts en HMECs provinents de donants joves i d'edat avançada.
2. Mesurar l'activitat de les principals vies de reparació de DSBs, la c-NHEJ i la HR, en HMECs provinents de donants dels dos grups d'edat.
3. Mesurar els nivells de les proteïnes implicades en les principals vies de reparació de DSBs en HMECs de donants joves i grans.
4. Analitzar la dinàmica de reclutament de les proteïnes BRCA1 i 53BP1, responsables de l'elecció de la via de reparació, als DSBs radioinduïts en HMECs provinents de donants joves i d'edat avançada.

Resultats

TREBALL I

**Delayed γ H2AX foci disappearance in
mammary epithelial cells from aged women
reveals an age-associated DNA repair defect**

Delayed γ H2AX foci disappearance in mammary epithelial cells from aged women reveals an age-associated DNA repair defect

Teresa Anglada¹, Joan Repullés^{1,2}, Anna Espinal³, Mark A LaBarge^{4,5}, Martha R Stampfer⁵, Anna Genescà^{1*}, Marta Martín^{1*}

¹ Department of Cell Biology, Physiology and Immunology, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Bellaterra, Spain; ² Microscopy Platform, Biomedical Research Institute Sant Pau (IIB-Sant Pau), 08025 Barcelona, Spain; ³ Servei d'Estadística Aplicada, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Bellaterra, Spain; ⁴ Department of Population Sciences, and Center for Cancer and Aging, Beckman Research Institute at City of Hope, Duarte, CA 91010, USA; ⁵ Biological Systems and Engineering Division, Lawrence Berkeley National Laboratory, Berkeley, CA 94720, USA.

*Both are corresponding authors and have contributed equally to this work

— ACCEPTED IN AGING-US —

ABSTRACT

Aging is a degenerative process in which genome instability plays a crucial role. To gain insight into the link between organismal aging and DNA repair capacity, we analyzed DNA double-strand break (DSB) resolution efficiency in human mammary epithelial cells from 12 healthy donors of young and old ages. The frequency of DSBs was measured by quantifying the number of γ H2AX foci before and after 1Gy of γ -rays and it was higher in cells from aged donors (ADs) at all times analyzed. At 24 hours after irradiation, ADs retained a significantly higher frequency of residual DSBs than young donors (YDs), which had already reached values close to basal levels. The kinetics of DSB induction and disappearance showed that cells from ADs and YDs repair DSBs with similar speed, although analysis of early times after irradiation indicate that a repair defect may lie within the firing of the DNA repair machinery in AD cells. Indeed, using a mathematical model we calculated a constant factor of delay affecting aged human epithelial cells repair kinetics. This defect manifests with the accumulation of DSBs that might eventually undergo illegitimate repair, thus posing a relevant threat to the maintenance of genome integrity in older individuals.

INTRODUCTION

The aging process is related to a loss of function and an increased probability of developing several diseases, such as cancer. Cellular changes associated with aging are an accentuated inflammatory response, alterations in the redox cellular equilibrium, telomere attrition, and changes in nuclear structure, and all of them imply relevant threats to maintenance of genomic integrity [1].

Of the many lesions that DNA can suffer, the DNA double-strand break (DSB) poses a considerable threat because joining of illegitimate ends can occur. One of the earliest events in DSB signaling is the phosphorylation of the histone H2AX on serine 139, γ H2AX [2]. This modification can be identified as discrete foci forming at DSB sites and scoring of γ H2AX foci is a widely used tool to estimate the number of DSBs induced after exposure to damaging agents [3]. Phosphorylation of H2AX promotes the recruitment of repair proteins at the break site [4] and once DNA has been repaired, H2AX phosphorylation disappears and foci are no longer detectable [5]. Thus, γ H2AX foci disappearance over time is a good approach to assess kinetics of DSB repair.

Studies with models of *in vitro* aging have provided evidence of a higher frequency of unrepaired DSBs with time in culture. For example replicative senescent cells accumulate more γ H2AX than dividing cells, suggesting a reduced repair ability or accumulation of DNA damage associated with replicative halt [6]. Also, non-senescent late population doubling (PD) cells during *in vitro* culture present with more unrepaired DSBs and more γ H2AX signaling than earlier PD cells [7,8]. A similar tendency is observed with organismal aging, as cells from aged human donors present an increased frequency of chromosomal reorganizations and γ H2AX foci with increasing age [8–11]. Although the increased frequency of DSBs with aging is clear, the mechanisms underlying it are yet unknown.

The presence of a greater number of lesions in the DNA of aged cells could be due to a progressive accumulation of lesions over time, to difficult-to-repair DSBs marked by persistent γ H2AX foci or to a limited capacity of aged cells to repair new DSBs [12–14]. The general notion of declined DSB repair efficiency with age is supported by some studies. Accumulation of residual γ H2AX foci after ex-vivo ionizing irradiation (IR) exposure of fibroblasts and hematopoietic stem cells of healthy donors, suggests that older individuals have a reduced DSBs repair capacity [11,15]. Similarly, Garm and

colleagues [16] observed a tendency towards diminished DSB repair with increasing age using comet assays and flow cytometry techniques to measure DSBs in peripheral blood mononuclear cells from twins who ranged from 40 to 77 years of age. In contrast, human dermal fibroblasts from aged donors showed a heterogeneous capacity for DSB repair after analyzing γ H2AX fluorescence intensity [9], and even an increased DSB repair rate with age in lymphocytes from 94 donors exposed to IR [17]. Therefore, although the collected evidence suggests that the frequency of DNA-DSBs increases with age in multiple mammalian tissues, the DSB repair capacity of cells from aged individuals is still controversial and the mechanisms underlying aging-related DSB accumulation remain unclear.

To gain insight into the consequences of organismal aging on DNA damage repair capacity we have measured DSB induction and resolution in finite lifespan non-transformed (pre-stasis) human mammary epithelial cells (HMECs) from 12 female donors of young (≤ 27) and old (≥ 60) ages. Our work shows that cells from aged women have a higher basal level of DSBs and display a sharp decline of DSB repair efficiency that leads to their accumulation after exposure to low doses of IR. Both observed data and mathematical modelling of DSBs repair kinetics indicate that old donors display a delayed firing of the DNA damage response that contributes to the accumulation of damage with age.

RESULTS

1. Defining the criteria for analyzing DNA double-strand breaks in pre-stasis HMECs

HMECs were obtained from reduction mammoplasty tissue of 12 donors, which were classified according to age into young donors (YDs, < 27, age in parentheses): YD48R(16), YD240L(19), YD168R(19), YD184(21), YD59L(23) and YD123(27) and aged donors (ADs, > 60, age in parentheses): AD153L(60), AD112R(61), AD122L(66), AD29(68), AD429ER(72), AD353P(72). Cells were cultured as pre-stasis strains in M87A medium as described by Garbe [18], to support their long-term growth (Figure 1A). Despite using a low-stress medium, there was an accumulation of senescent cells with time in culture (Figures 1A and 1B). In order to avoid interference from replicative-senescence associated DNA damage when assessing age-dependent differences in the formation and resolution of DSBs, early PDs were chosen (PD < 20 which correspond to passages 4th to 6th) in which the frequency of senescent cells was ≤ 10%.

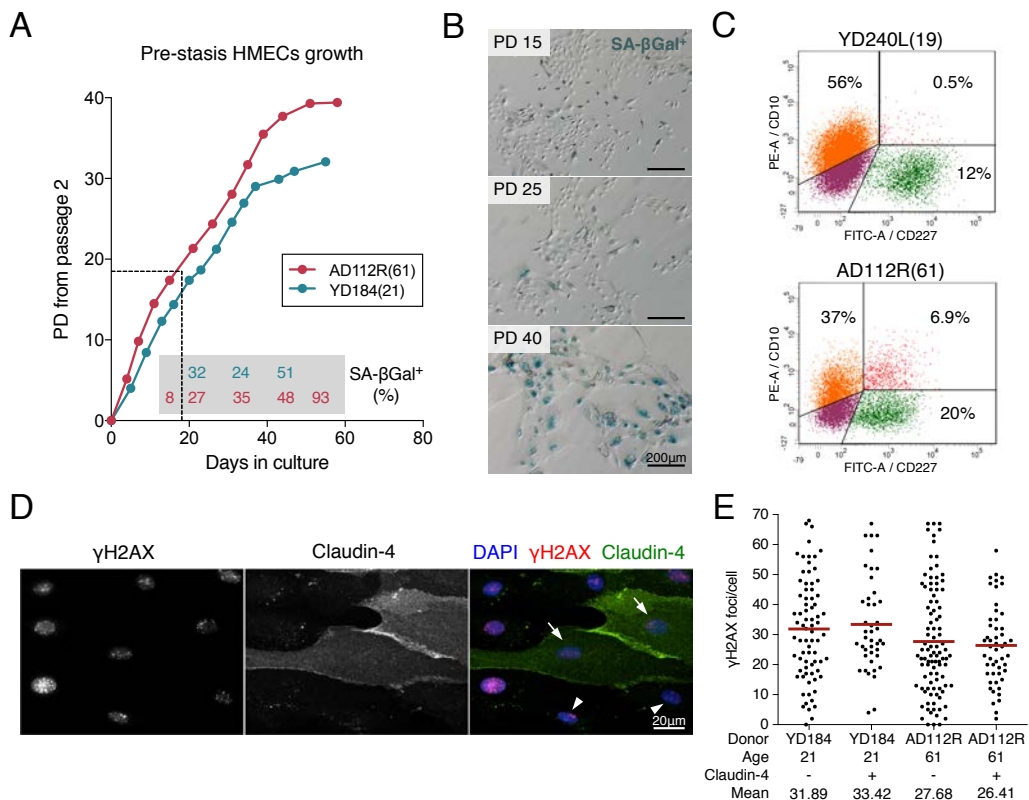


Figure 1. Pre-stasis HMEC characterization and culture. (A) Representative growth curves of HMECs from YD184(21) and AD112R(61) in M87A medium with supplements. Dots correspond to correlative cell passages from passage 2. (Continue on next page) →

← (Continued from previous page) The dotted thin line indicates the early passages used for the experiments. Percentages of SA-β-Gal positive cells are indicated within the grey box ($N > 500$ cells). **(B)** The frequency of SA-β-Gal positive cells increases with time in culture. **(C)** Diagrams of flow cytometry analysis of CD10 (PE, phycoerytrin) and CD227 (FITC, fluorescein isothiocyanate) in YD240L(19) and AD112R(61). **(D)** Images of the immunofluorescent staining of claudin-4 (expressed by luminal cells, FITC, green), γH2AX (Cy3, red) and DAPI (blue) at 2h after 1Gy of γ-rays exposure. Claudin-4 positive (arrows) and negative (arrowheads) cells are shown. **(E)** Scatter dot plot and average number (red line) of γH2AX foci/cell in claudin-4 positive and negative cells ($N > 100$ cells/donor). No statistical differences were observed (Mann-Whitney test, p -value > 0.05)

As previously reported [18,19] we found age-related differences in the fractions of myoepithelial (CD10⁺/CD227⁻) and luminal (CD10⁻/CD227⁺) cells in HMEC culture. Flow cytometry analysis of CD10 and CD227 cell-lineage specific markers confirmed an age-dependent decrease in the myoepithelial fraction accompanied by an increase of the luminal fraction (CD10⁺/CD227⁻ in YD240L: 56.05%; AD112R: 37.29%; CD10⁻/CD227⁺ in YD240L: 12.67%; AD112R: 20.06%; Figure 1C). In order to rule out radiation-sensitivity differences between the two breast cell types, cells from young and aged donors were exposed to 1Gy of γ-rays and labelled with γH2AX and claudin-4 (Cl4), a cytoplasmic membrane protein mostly expressed by luminal cells (Figure 1D). As shown in Figure 1E, there were no differences in the frequency of γH2AX foci between Cl4⁺ and Cl4⁻ cells 2 h after irradiation in any of the donors analyzed (Cl4⁻: 31.89 and Cl4⁺: 33.42 in the YD184; Cl4⁻: 27.68 and Cl4⁺: 26.41 in the AD112R; Mann-Whitney test, p -value > 0.05). These results indicate that radiation-induction of DSBs is similar in myoepithelial and luminal HMECs, ruling out the need to distinctively identify them when analyzing age-dependent differences in DNA repair.

2. Mammary epithelial cells from aged donors show an increased basal frequency of DSBs

γH2AX foci are accepted as surrogate markers of DSBs [20]. The pattern of γH2AX staining and the number of foci scored are dependent on the phase of the cell cycle analyzed (Supplementary Figure 1). To mitigate variability due to cell cycle, γH2AX foci counting was restricted to cells in G1 phase, which were identified by pericentrin labelling, a centrosomal protein that duplicates along with DNA, allowing clear distinction of cell cycle phase for each individual cell analyzed [21]. In order to establish the basal frequency of DSBs in cells from young and old donors, γH2AX foci were

analyzed in non-irradiated samples. The estimated mean number of γ H2AX foci was 0.96 ($CI_{95\%} = [0.70, 1.30]$) in cells from YDs and 1.94 ($CI_{95\%} = [1.43, 2.63]$) in cells from ADs, twice the level scored in YDs (Figure 2A). A generalized linear model with repeated measures for each donor was established to detect differences in γ H2AX foci numbers between age groups at each time point analyzed (see the methods section). Before irradiation statistically significant differences between YDs and ADs did exist (p -value = 0.0013; $t = -3.22$). In addition to a lower basal frequency of DSBs, 60% to 75% of most YD cells were devoid of any γ H2AX foci, whereas only ~40% of most AD cells were devoid of foci (Figure 2B). In most YDs less than 10% of cells carried more than 3 γ H2AX foci per cell, whereas ~20% of cells from most ADs had more than 3 foci (X^2 test, p -value < 0.0001). Despite the existence of inter-individual differences between donors of similar ages, these analyses demonstrate that both, the average basal frequency of DSBs and the fraction of cells carrying DSBs are higher in HMECs from aged donors as compared to young donors.

Descriptive statistics were computed for each donor (Table 1 and Supplementary Figure 2) and statistical differences regarding the mean number of γ H2AX foci per cell were calculated (Kruskal-Wallis test with a Dunn's multiple comparisons correction). When donors were lined up based on statistical differences among them, most of YDs and ADs aligned according to an age-dependent order (Figure 2C Non-irradiated). This analysis allowed us to detect that unirradiated cells from YD123(27) and AD153L(60) did not strictly behave as the rest of the donors from their age group (Table 1, Figure 2C Non-irradiated), thus unmasking inter-individual differences among donors. Besides these particular exceptions, the rest of YDs had a similar and low frequency of basal DSBs/cell (Table 1) and, consequently, they statistically grouped together (a, b and c) and were significantly different from most of ADs (d, e) (Figure 2C Non-irradiated), which carry more basal DSBs/cell and display a greater data dispersion.

3. Aged donors accumulate higher levels of DSBs after irradiation

To study the efficiency of DSB repair with age, exponentially growing cell cultures from all donors were exposed to 1Gy of γ -rays. One hour after IR exposure, the estimated mean number of γ H2AX/cell was 15.70 ($CI_{95\%} = [11.57, 21.29]$) in YDs versus 22.27 ($CI_{95\%} = [16.42, 30.19]$) in cells from ADs (Figure 2A). As shown in Table 1, at this time point the mean number of γ H2AX foci per cell strongly correlated with the age of the

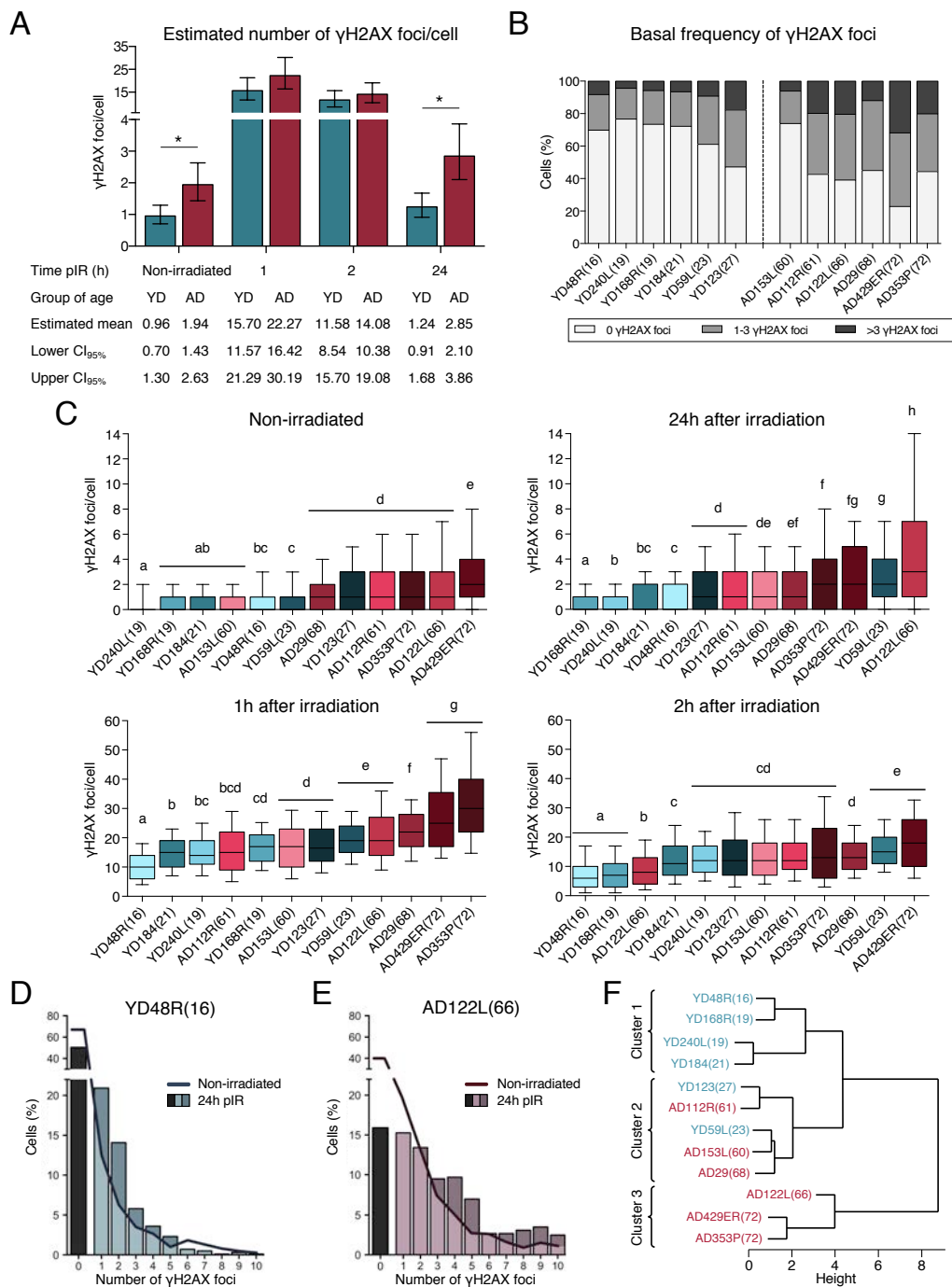


Figure 2. Frequencies of γ H2AX foci in HMECs from young and aged donors. (A) Estimated mean number of γ H2AX foci/cell and confidence intervals for young and aged donors. Asterisks indicate significant differences between YDs and ADs (generalized linear model, p -value < 0.01). (Continue on next page)

← (Continue from previous page) **(B)** Frequency of cells with a defined number of γ H2AX foci in non-irradiated samples from the 12 donors. **(C)** Box plots of the frequency of γ H2AX foci in cells from YDs (blue) and ADs (red) in non-irradiated samples and at 1 h, 2 h or 24 h after exposure to 1 Gy of γ -rays. Colors become darker with increasing donor age. Boxes include data from the upper to the lower quartile. The median is represented with a black line and whiskers compile 10 to 90% of the scored values. The number of cells analyzed for each donor is stated in Table 1. Different letters indicate statistically significant differences between donors (Kruskal-Wallis test with Dunn's multiple comparisons correction, p -value < 0.05). **(D, E)** Distribution of cells according to the number of γ H2AX foci/cell individually scored in YD48R(16) **(D)** and in AD122L(66) **(E)**. Bars indicate the percentage of cells without foci (black bar) or with ≥ 1 γ H2AX foci (colored bars) 24 h after irradiation. The continuous line depicts this percentage before irradiation. The number of cells analyzed for each donor is stated in Table 1. **(F)** Hierarchical clustering of the 12 donors according to the standardized mean number of γ H2AX foci scored in non-irradiated samples and at 1, 2 and 24 h after IR.

donors, increasing from 10.63 γ H2AX foci per cell in the youngest donor (YD48R(16)) to 32.7 γ H2AX foci per cell in the oldest donor (AD353P(72)). Again, alignment of donors at this time according to statistics (Kruskal-Wallis test and Dunn's multiple comparisons correction), rendered clear-differences between the groups of young and old and most of them continued to maintain an age-related position (Figure 2C 1 h after irradiation). Again, data from YDs showed little variance, revealing similar DSB repair efficiencies while ADs presented with more γ H2AX foci and higher inter-cellular variability. Overall, 1 h after irradiation cells from ADs accumulated higher levels of unrepaired DSBs, suggesting that these cells elicit a less efficient response from the fast component of DSBs repair.

When γ H2AX foci were scored two hours after exposure to ionizing radiation the estimated mean number of γ H2AX foci per cell had already decreased in all donors and it was similar for YDs (11.58 γ H2AX foci/cell, $CI_{95\%} = [8.54, 15.70]$) and for ADs (14.08 γ H2AX foci/cell, $CI_{95\%} = [10.38, 19.08]$) (Figures 2A and 2C 2 h after irradiation, Table 1). The decline in γ H2AX foci during this second hour was higher in cells from ADs than in cells from YDs, suggesting that the initial impairment in DSBs repair shown by ADs 1 h after irradiation is eventually alleviated.

In order to evaluate the efficiency in the slow component of DNA repair we analyzed the frequency of γ H2AX foci 24 hours after IR exposure. Both YDs and ADs have repaired most of the radiation induced DSBs, but cells from ADs displayed a higher estimated mean number of γ H2AX foci/cell than cells from YDs (YDs: 1.24 γ H2AX foci/cell, $CI_{95\%} =$

Table 1. Descriptive analysis of the number of γ H2AX foci per cell.

Donor	Non-irradiated			1h post-irradiation			2h post-irradiation			24h post-irradiation		
	Mean	SD	N	Mean	SD	N	Mean	SD	N	Mean	SD	N
Young donors (YDs)	0.90	2.52	6152	16.16	7.85	2777	11.43	8.22	4046	1.41	2.33	5633
YD48R(16)	0.91	2.17	957	10.63	5.94	464	7.64	7.04	923	1.21	2.04	1000
YD240L(19)	0.71	2.64	1975	15.42	7.32	389	13.25	7.62	685	0.87	1.87	1000
YD168R(19)	0.78	2.60	809	17.13	7.34	357	8.05	6.38	740	0.58	1.40	879
YD184(21)	0.79	2.13	1000	15.04	6.89	470	12.87	8.02	752	1.05	1.72	1000
YD59L(23)	1.05	2.21	1000	19.75	7.22	609	16.17	7.15	511	2.87	2.75	956
YD123(27)	1.93	3.64	411	17.9	8.60	488	14.30	9.91	435	1.98	3.10	798
Aged donors (ADs)	2.03	3.85	4702	21.17	11.85	3616	13.79	9.52	3800	2.77	4.62	4730
AD153L(60)	0.78	2.30	998	17.36	9.00	895	13.72	8.61	733	2.08	2.85	996
AD112R(61)	2.20	3.57	770	16.31	9.75	780	14.18	8.34	671	2.33	5.18	996
AD122L(66)	2.68	4.91	984	21.45	11.15	588	9.33	6.71	822	5.38	6.85	484
AD29(68)	1.48	2.26	707	22.38	8.04	656	13.97	7.13	799	2.03	2.31	1000
AD429ER(72)	3.43	4.57	483	27.72	13.31	361	19.14	11.82	252	3.10	3.83	353
AD353P(72)	2.30	4.29	760	32.7	16.31	336	16.16	13.33	615	3.29	5.58	901

[0.91, 1.68]; ADs: 2.85 γ H2AX foci/cell, $CI_{95\%} = [2.10, 3.86]$; p -value = 0.0001; $t = -3.79$; Figure 2A). While most of the YDs had reached a frequency of residual DSBs close to the basal levels displayed before irradiation, only AD112R(61) and AD429ER(72) had reached their basal levels of DSBs (Table 1). When donors were individually compared (Kruskal-Wallis test and Dunn's multiple comparisons correction) the differences between the two groups were emphasized, especially between the youngest and the oldest donors (Table 1 and Figure 2C 24 h after irradiation). In YDs, the frequency of cells devoid of γ H2AX foci at 24 h is 50%, close to their frequency before irradiation (70%) (Figure 2D). In contrast, in ADs the frequency of cells without γ H2AX foci at 24 h after irradiation is far from reaching their basal frequency (15% vs. 40%) (Figure 2E). At this time and among cells with γ H2AX foci, most of the YDs' cells scored only 1 or 2 γ H2AX foci per cell, whereas ADs still accumulated 3 or more γ H2AX foci per cell (Figures 2D and 2E). Thus, 24 hours after irradiation not only more cells from ADs accumulated DSBs, but also the frequency of DSBs per cell was higher than in cells from YDs.

To determine if DSB repair efficiency was a good marker of chronological age, we carried out hierarchical clustering using standardized values of γ H2AX foci from the 12 donors along the 4 time points (non-irradiated, 1 h, 2 h and 24 h after IR). As shown in Figure 2F, donors were grouped in 3 clusters. A clearly separated cluster was constituted by the oldest donors (AD122L(66), AD429ER(72) and AD353P(72)), which displayed the worst repair efficiency among all the donors. The 4 youngest donors (YD48R(16), YD168R(19), YD240L(19) and YD184(21)), which are the ones with the best DSBs repair performance, clustered together and separated from the other donors. An intermediate cluster included the remaining young donors (YD123(27) and YD59L(23)) along with 3 aged donors (AD153L(60), AD112R(61) and AD29(68)) which are those that did consistently not follow an age-dependent order in the previous statistical analyses (Figure 2C). Thus, hierarchical clustering of donors according to γ H2AX presence at different times reveals that DSBs repair efficiency is a reasonable marker of age.

Taken together, we reveal an age-associated DSB repair deficiency characterized by a diminished efficiency in the fast component of DSBs repair along with higher levels of residual DSBs, which is consistent with the increased basal frequency of DSBs observed in the aged donors.

4. Delayed firing of the DDR with age

DSB repair is not constant and it follows biphasic exponential negative kinetics. During the early times after irradiation, repair is fast and resolves most of the induced DSBs, whereas slow DSB repair kinetics continues days after irradiation [22]. In order to determine the nature of the repair defect displayed by cells from older donors, we aimed to describe the kinetics of DSB repair for the two age groups. We first calculated the rate of γ H2AX foci disappearance for each time interval analyzed (Table 2).

Table 2. Rate of DSB repair within intervals of time

Time after IR exposure (h)	DSB induced/ remaining		Time interval	DSB repaired (%)**	
	YDs	ADs		YDs	ADs
0*	35	35			
1	16.16	21.17	0* - 1h	53.83	39.51
2	11.43	13.79	1h - 2h	13.51	21.09
24	1.41	2.77	2h - 24h	28.63	31.49

* 0 = immediately after irradiation. The current estimation of 35 DSB per Gy is used [23].

** Frequency of DSB repair has been calculated as the difference in DSBs between one time point and the time immediately before, assuming that repairing 35 DSBs is 100% of repair.

Because γ H2AX foci scoring does not allow the identification of the DSBs induced immediately after irradiation (θ), to calculate γ H2AX foci disappearance between this time point and 1h we have used the standard estimation of 35 DSBs induced per Gy of radiation in G1 cells [23]. During the first hour after DNA damage induction, the rate of DSB resolution was higher for YDs (53.83% of γ H2AX foci disappeared) than for ADs (39.51%) (Figure 3A and Table 2). This indicates a greater ability for YDs to activate the DDR, thus translating into the resolution of a higher fraction of DSBs immediately after DNA damage induction. In contrast, as shown in Figure 3A and Table 2, the rate of γ H2AX foci disappearance between 1 and 2 h after IR was higher in AD (21.09%) than in YD samples (13.51%). Although it might seem that, after some time, ADs cells display a better repair ability than YDs' cells, this rate of DSB resolution simply indicates that ADs end the 1st hour carrying higher numbers of unresolved DSBs. Also it shows that, although at a later time point, cells from AD are eventually able to launch the DDR and efficiently resolve the DSBs that were accumulated. In fact, 2 h after irradiation ADs have

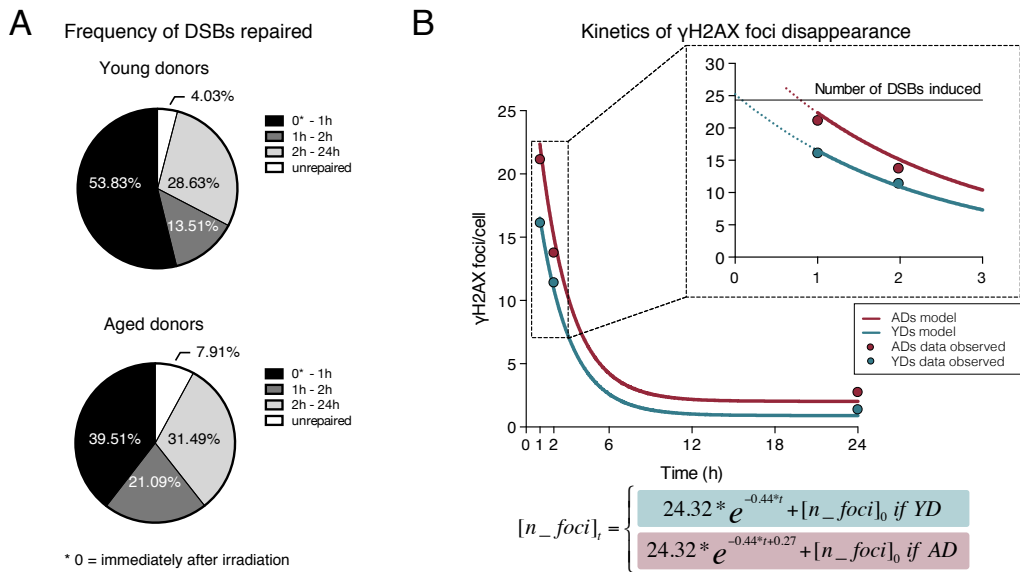


Figure 3. Dynamics of γ H2AX foci disappearance after irradiation. (A) Frequency of DSBs repaired within defined time intervals after exposure to 1 Gy of γ -rays for YDs and ADs. The number of DSBs induced immediately after 1 Gy irradiation (0) of G1 cells was estimated to be of 35 according to Rothkamm & Löbrich [23]. For the other time points, the numbers of DSBs are those depicted in Table 1 and Table 2. (B) Kinetics of γ H2AX foci disappearance for young and aged donors following the model of first order kinetic reaction stated in methods section. The mean number of γ H2AX foci scored at each time point is represented with dots (blue for YDs, red for ADs). The lines represent the kinetics of DSBs repair estimated after modeling the data from the 12 donors at 1, 2 and 24 h after irradiation. The inset in the graph shows a detail of the early times after IR exposure. The dotted lines represent an extrapolation of the DSB repair model in the time interval comprised between the DSB repair initiation and 1 h after IR.

repaired 60.60% of radiation-induced DSBs, very close to the 67.34% of DSBs repaired by YDs' cells. The last time interval analyzed (2 to 24 h post-irradiation) corresponds to the slow component of repair, in which the rates of DSBs repaired were very similar for both young (28.63%) and aged donors (31.49%) (Figure 3A and Table 2), suggesting that age-related differences in DNA repair efficiency lay within the initial times after DNA damage induction. With these data, we propose that the accumulation of DSBs in ADs is due to a repair defect that manifests as a delayed firing of the DDR, thus diminishing the repair efficiency of the fast component of repair. Nonetheless, and considering that cells from ADs also accumulate more basal and residual DSBs than cells from YDs, it cannot be ruled out that, besides a delayed initiation of DSBs repair, cells from ADs also might suffer from a DNA repair impairment related to the repair of specific, long-lived residual DSBs.

In order to test the hypothesis of an age-related delay in the firing of the DDR, we established a first order kinetic reaction using a Nonlinear Regression Model. The model, described in the methods section, predicts the number of γ H2AX foci in AD and YD and it is resolved as follows:

$$[n_foci]_t = \begin{cases} 24.32 * e^{-0.44 * t} + [n_foci]_0 & \text{if YD} \\ 24.32 * e^{-0.44 * t + 0.27} + [n_foci]_0 & \text{if AD} \end{cases}$$

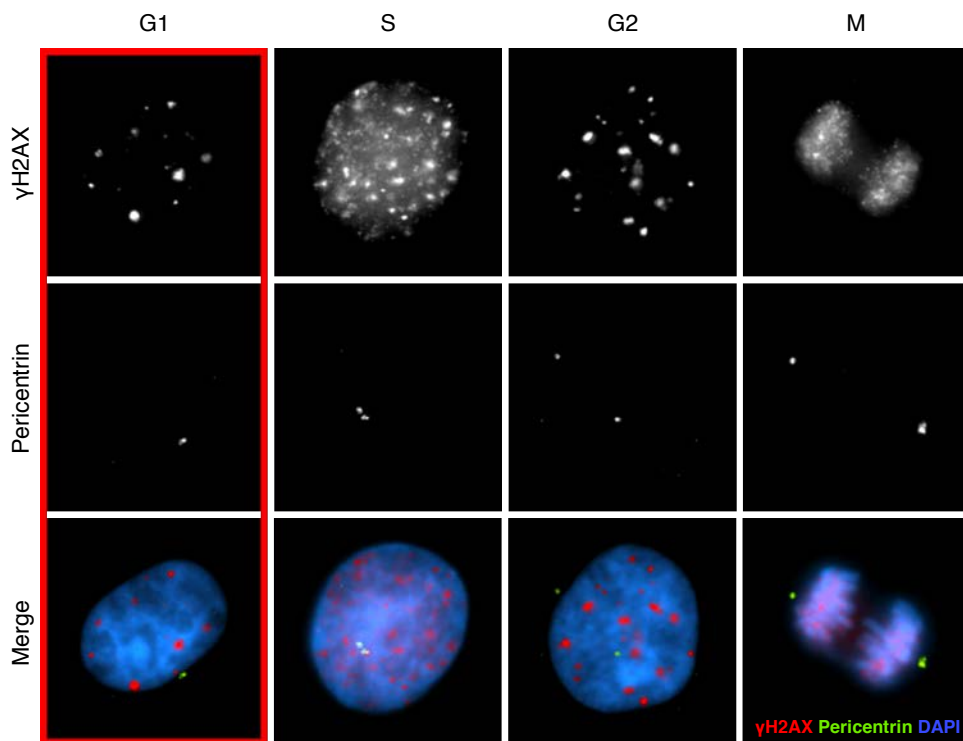
The estimated constant of γ H2AX foci decay is $\beta_1 = -0.44$, $CI_{95\%} = [-0.64, -0.25]$ for young and aged donors. In the case of ADs, the model includes a constant factor of delay in DSB repair initiation, which is estimated to be $\beta_0 = 0.27$, $CI_{95\%} = [0.08, 0.45]$. Thus, the equation is different for YDs and for ADs, as it assumes that ADs present a delayed start of DSB repair ($e^{-0.44*t+0.27}$) with respect to YDs ($e^{-0.44*t}$). The basal frequency of DSBs ($[n_foci]_0$) is also included in the equation because it is different for YDs and ADs (Table 1). Finally, the model estimates the number of induced γ H2AX foci in G1 phase HMECs after 1 Gy of γ -rays as $\theta = 24.32$, $CI_{95\%} = [17.28, 31.35]$. Although our model's estimation of induced DSBs is lower than the 35 DSBs/Gy reported previously [23], it is very similar to others' estimations of ~25 DSBs/Gy in G1 cells [24,25]. Discrepancies in the number of DSBs induced can be attributed to the source of radiation, the dose rate used in each experiment or to an overestimation of the number of DSBs detected by PGFE methodology.

As shown in Figure 3B, this model renders estimated DSB repair kinetics for YD and AD that fit well the data observed. Although the model, strictly, can only be applied to estimate DSB repair kinetics between 1 and 24 h after IR, it has been used to make an extrapolation corresponding to the kinetics of DSB repair from the time point immediately after exposure to the first hour after irradiation (inset in Figure 3B). Immediately after irradiation cells have those DSBs induced by radiation (θ) plus their basal frequency of DSBs ($[n_foci]_0$), which is different between YDs and ADs. Thus, immediately after irradiation and according to the model, γ H2AX values are 25.73 for YD and 27.09 for AD. When the number of γ H2AX foci in times between 0 and 1 h after irradiation is calculated (dotted colored line in Figure 3B inset), it can be observed that YDs initiate repair immediately after irradiation and they efficiently diminish the number of DSBs during this first hour. Instead, the number of γ H2AX foci in ADs remains unchanged for some time after irradiation and they begin to resolve DSBs later than YDs,

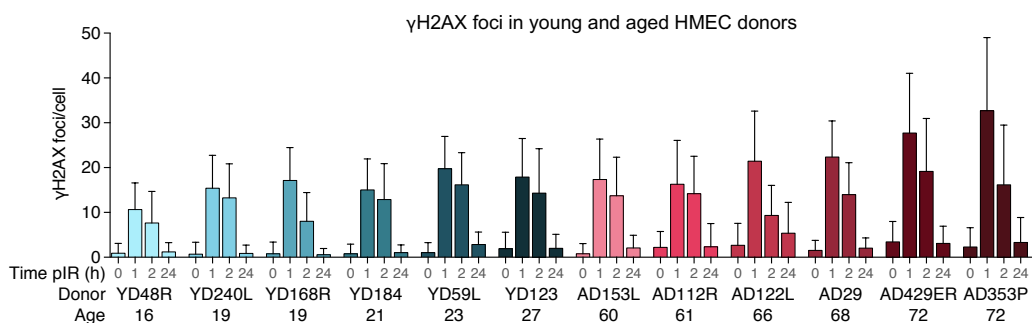
thus reaching the first hour after irradiation carrying more DSBs than YDs. Once the DDR is launched, ADs are able to repair most of the DSBs with efficiencies similar to that of YDs for the rest of time points analyzed. This extrapolation of the model clearly shows that ADs would have started DSB repair later than YDs and, therefore they would have repaired few DSBs during this first hour after DNA damage induction. Thus, it is tempting to speculate that a period of latency exists before ADs are able to fire a fully operative DNA repair response, although once launched, they are able to repair with a speed similar to that of YDs.

In conclusion, we propose that the accumulation of DSBs in ADs is due to a repair defect that manifests as a delayed firing of the DDR, thus diminishing the repair efficiency of the fast component of repair. We hypothesize that this delay favors accumulation of unresolved DSBs, which may promote their unfaithful repair and promote an increased frequency of genomic rearrangements in aged organisms. Therefore, the here described age-associated impairment in the firing of the DDR machinery may pose a hazard to the maintenance of the genomic integrity in epithelial cells from older individuals.

SUPPLEMENTARY FIGURES



Supplementary Figure 1. Immunofluorescent labeling of γ H2AX (Cy3, red), pericentrin (FITC, green) and DAPI (blue) at different phases of the cell cycle. Scoring of individualized γ H2AX foci was restricted to G1 phase cells (red box) by selecting those cells with one pericentrin signal. From late S to mitosis cells have two pericentrin signals. Also, the pan-nuclear pattern of γ H2AX during S phase is very characteristic.



Supplementary Figure 2. Mean number of γ H2AX foci per cell and their standard deviation in young and aged HMEC donors before irradiation and at 1, 2 and 24 hours after IR.

DISCUSSION

To investigate the age-associated impairment of genomic integrity, we examined the DNA damage response in cells from healthy individuals of different ages. The increased basal frequency of γ H2AX foci with donor's age observed in HMECs is in agreement with results reported in other cell types from healthy human donors [8–11] and reveals an age-dependent accumulation of DSBs. The observed age-related increase in the number of endogenous DSBs could be attributed to a stochastic accumulation of damage with time, or alternatively, an alteration of the DSBs repair mechanism could account for an accelerated accumulation of unresolved DSBs with age [12–14]. HMECs from ADs presented increased frequencies of DSBs at all times analyzed after IR exposure, which manifests an impaired ability to repair DSBs with age. The data revealed significant inter-cellular variation in the frequency of γ H2AX foci in aged donors, which in fact arises as a remarkable feature of ADs. Despite these variations, the hierarchical clustering, using data from γ H2AX foci scored at all time points analyzed, efficiently grouped donors by age, thus demonstrating that analysis of γ H2AX foci disappearance after IR exposure could be a potential marker for physiological aging. An interesting result is that all these analyses efficiently unmasked inter-individual variation amongst donors with similar ages and this is especially clear in aged donors. Similar results regarding inter-individual variance were also reported in studies measuring γ H2AX fluorescent intensity in blood samples [17,26]. Efficient tools that allow the detection of donors in which physiological aging does not completely match with chronological aging might be useful to improve and adapt preventive diagnostic controls among other medical procedures.

The repair kinetics we observed in HMECs from older individuals after irradiation is in agreement with the general notion of an age-associated decline in the DNA repair capacity. Other reports have also described a decreased capacity for γ H2AX foci disappearance after IR exposure in different cell types from aged donors and suggested reduced DSB repair capacities with age [11,15,16]. However, an increased DSB repair rate with age also was reported in blood mononuclear cells from 94 healthy donors [17]. We propose that the apparent disparity among these studies could be explained if we assume a delayed firing of the DDR that leads ADs to accumulate more unrepaired DSBs at early post-irradiation times analyzed, coinciding with ADs starting to efficiently repair these DSBs. Our experimental and modeled data render a similar DSB repair kinetics for both groups of donors, although ADs show a delay in the initiation of repair. This

delayed firing translates into the accumulation of yet to be resolved DSBs in early times after irradiation. Eventually, ADs fire the DDR and they start to resolve these DSBs, appearing as more efficient than YD, but only because they have repaired less DSBs immediately before.

Delayed firing of the DDR could be explained by initial difficulties in loading repair proteins to DSBs sites, probably due to difficulties in their mobilization. Primary fibroblasts showed a delayed recruitment of MRE11 and RAD50 proteins with increasing donors' age [8]. Also, a delayed recruitment of 53BP1 repair protein to DSB sites was described in *in vitro* aged HMECs with a time-course experiment of 53BP1 foci formation [27]. A lower efficiency of the non-homologous end joining repair pathway with age was reported in mice [28], rats [29] and human senescent cells [30]. Cell lines defective in ATM or 53BP1 were described as presenting an accumulation of long-lasting residual DSBs [31], suggesting that a defective recruitment also could translate into some kind of repair defect. In line with this, we observe that the repair defect of aged donors is accompanied by an increased frequency of γ H2AX foci at 24 h after irradiation. Although we cannot rule out that these residual DSBs correspond to complex sites of damage or to heterochromatin-located DSBs that are being repaired in a very slow manner, we hypothesize that their presence is related to the delay in the firing of the DDR. Long-lasting γ H2AX signaling after exposure to IR was proposed to be a marker of DNA damage and aging [32] and was correlated with radiosensitivity in mammalian cell lines [33]. Due to a delayed launch of an effective DDR, ADs show incomplete DSB repair and accumulate a larger fraction of cells with a higher number of unresolved DSBs, which could render them susceptible to eventually develop a carcinogenic process.

A delayed firing of the DDR poses a relevant threat to genomic integrity, as the accumulation of unresolved DSBs leads to increasing probabilities of illegitimate repair [34]. Accumulation of genomic rearrangements arising from illegitimate DSB repair was reported in different tissues from old individuals [35]. These kinds of abnormalities can affect multiple genes and they are a potential source of oncogenic transformation. It can be of particular concern in individuals exposed to low and protracted doses of radiation in which the repair machinery is continuously challenged. Epidemiological studies have demonstrated an increased excess risk for some types of cancer after exposure to low and protracted doses of radiation with age at exposure [36]. For example, individuals exposed to the radioactive contamination of the Techa River in the Urals had an

increased excess relative risk of cancer mortality with increasing age at first exposure [37]. Also, data from workers at the Oak Ridge National Laboratory exposed to low radiation doses revealed an association between age at exposure and cancer mortality [38]. Thus, the impaired ability in DSB repair makes older people among the adult population particularly susceptible to ionizing radiation detrimental effects.

Our study provides valuable information about the relation between aging and DNA-DSB accumulation in human mammary epithelial cells from healthy donors and we expect our results will serve as a basis for further studies regarding impaired DSB repair mechanisms in aged individuals. Future studies would be necessary to explore the mechanisms responsible for the delay in the activation of the DDR with age and their implications in the global cellular context.

METHODS

1. Cell culture

Finite lifespan pre-stasis HMECs were obtained from reduction mammoplasty tissue of 11 donors: 48R (16 yo), 240L (19 yo), 168R (19 yo), 184 (21 yo), 59L (23 yo), 123 (27 yo), 153L (60 yo), 112R (61 yo), 122L (66 yo), 29 (68 yo), 429ER (72 yo), or peripheral non-tumor containing mastectomy tissue of one donor: 353P (72 yo). Donors were classified into two groups depending on age: young donors (YDs, <27 years old) and aged donors (ADs, >60 years old). When referring to donors, the group of age is followed by the specimen identification and the age of the donor in parentheses.

Cells were cultured as pre-stasis strains using M87A medium with cholera toxin and oxytocin according to previously reported methods [18], with the addition of 100 U/ml penicillin and 100 µg/ml streptomycin. Cells were incubated at 37°C and 5% CO₂ atmosphere. The number of PD from passage 2 was calculated as PD = [log(cells harvested/cells plated)]/log2.

2. SA-β-Gal activity detection

SA-β-Gal activity was detected as described by Debacq-Chainiaux [39]. Blue staining was detected under an IX71 microscope equipped with DP20 camera and cell^A software (Olympus, Hamburg, Germany).

3. Irradiation

When indicated, exponentially growing HMECs were exposed to 1 Gy of γ-rays using an IBL-437C R-137 Cs irradiator (dose rate of 5.10 Gy/min).

4. Immunodetection

4.1 Flow cytometric analysis

After trypsinization, HMECs were blocked for 20 minutes in PBS- 1% BSA, incubated for 30 minutes with anti-CD227-FITC (clone HMPV, Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA) and anti-CD10-PE (clone HI10a, BioLegend, San Diego, CA, USA) at a final concentration of 1:100, all on ice. Flow cytometric analysis was performed using a FACSCanto (Becton Dickinson).

4.2 Immunofluorescence

To detect γ H2AX and pericentrin, HMECs were fixed in 4% paraformaldehyde for 15 minutes and permeabilized in a 1x PBS-0.5% Triton-X-100 for 20 minutes. To detect γ H2AX and claudin-4, cells were fixed with ice-cold methanol for 10 minutes. Cells were incubated for 1 hour with blocking solution (1x PBS-0.1% Tween20-3% FBS) before applying primary antibodies mouse anti- γ H2AX (Ser139) (clone JBW301, Millipore, Madrid, Spain), rabbit anti-pericentrin (Abcam, Cambridge, UK) or rabbit anti-claudin-4 (Abcam) at 1:1000, 1:2000 and 1:250 final concentrations respectively. Secondary antibodies anti-mouse Cy3 (Jackson ImmunoResearch Inc., Cambridge, UK) and anti-rabbit A488 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) were applied at a final concentration of 1:800 and 1:500 (claudin-4) or 1:1000 (pericentrin), respectively. Nuclei were counterstained with 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) at a final concentration of 0.25 μ g/ml. For image acquisition an Olympus BX61 epifluorescent microscope equipped with a CV-M4+CL camera (JAI, Grosswallstadt, Germany) and Cytovision software (Applied Imaging, Newcastle, UK) was used.

5. Automated microscopy and γ H2AX foci counting

γ H2AX foci counting was done following a semi-automatic approach. Images from slides with γ H2AX and pericentrin immunofluorescence were captured using an Olympus BX61 epifluorescence microscope equipped with an automatic motorized stage (BX-UCB, Olympus) and a CCD camera (CV-M4+CL, JAI). The capture methodology was adapted from the Spot-counting system (Spot AX software, Applied Imaging) as described by Hernández et al. [21]. Images were acquired automatically with a 60x objective using predefined settings. Four z-stacks were acquired for γ H2AX and 6 for pericentrin, with a step size of 1.55 μ m between planes. Cells with only one pericentrin signal were selected and γ H2AX foci were scored using FociPicker3D algorithm for Fiji software [40].

6. Statistical analysis and data modelling

Descriptive analysis and graphics were performed using Microsoft Excel (Microsoft® Excel® 2011, v14.1, Redmond, Washington, USA) and GraphPad Prism 6 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA) with methods indicated in the results where applicable.

In order to statistically compare the two age groups at each time point analyzed, a generalized linear model with a Negative Binomial distribution response and with repeated measures for each donor was established. The estimated values for γ H2AX foci

number and the corresponding confidence intervals were obtained using SAS software (SAS v9.4, SAS Institute Inc., Cary, NC, USA).

For the hierarchical cluster analysis, standardized values of γ H2AX foci from the 12 donors along the four time points (non-irradiated, 1 h, 2 h and 24 h pIR) [41] were used. Ward method was applied using R software (version 3.4.4, Vienna, Austria).

A first order kinetic reaction was established to obtain estimations regarding the kinetics of DSB repair in YDs and ADs. This approach was done using methodologies for Nonlinear Regression Model using SAS software (SAS v9.4, SAS Institute Inc.). The established model is described by the following equation:

$$[n_foci]_t = \begin{cases} \theta * e^{\beta_1 * t} + [n_foci]_0 & \text{if YD} \\ \theta * e^{\beta_1 * t + \beta_0} + [n_foci]_0 & \text{if AD} \end{cases}$$

where $[n_foci]_t$ is the number of γ H2AX foci at a concrete time after irradiation, θ is the number of radiation-induced DSBs, β_1 is the γ H2AX foci decay proportion, $[n_foci]_0$ is the basal frequency of γ H2AX foci (before irradiation) and β_0 is a constant of delayed repair onset. This model assumes that (1) the same number of DSBs per unit of radiation are induced in YD and AD cells immediately after irradiation θ ; (2) cells do not reach complete repair, but instead they reach the basal frequency $[n_foci]_0$ of DSBs and (3) cells from ADs suffer a delay in DSBs repair initiation (β_0).

ACKNOWLEDGMENTS

We gratefully acknowledge Gemma Fuster (*Hospital Clínic*, Barcelona) for her help with flow cytometry.

CONFLICTS OF INTEREST

The authors declare that they have no conflicts of interest.

FUNDING

The AG laboratory is supported by *Consejo de Seguridad Nuclear*, *Generalitat de Catalunya* (2017-SGR-503) and *Fundación Dexeus Salud de la Mujer* 2016 grants. TA has been a beneficiary of FI-DGR 2015-2017 (*Generalitat de Catalunya*) and *Universitat Autònoma de Barcelona* PhD program fellowships. MS was supported by the Office of Health and Biological Research, US. Department of Energy under Contract No. DE-AC02-05CH11231.

REFERENCES

1. López-Otín C, Blasco MA, Partridge L, Serrano M, Kroemer G. The Hallmarks of Aging. *Cell*. 2013; 153: 1194–217.
2. Rogakou EP, Pilch DR, Orr AH, Ivanova VS, Bonner WM. DNA Double-stranded Breaks Induce Histone H2AX Phosphorylation on Serine 139. *J Biol Chem*. 1998; 273: 5858–68.
3. Rothkamm K, Barnard S, Moquet J, Ellender M, Rana Z, Burdak-Rothkamm S. DNA damage foci: Meaning and significance. *Environ Mol Mutagen*. 2015; 56: 491–504.
4. Nakamura AJ, Rao VA, Pommier Y, Bonner WM. The complexity of phosphorylated H2AX foci formation and DNA repair assembly at DNA double-strand breaks. *Cell Cycle*. 2010; 9: 389–97.
5. Chowdhury D, Keogh M-C, Ishii H, Peterson CL, Buratowski S, Lieberman J. γ -H2AX Dephosphorylation by Protein Phosphatase 2A Facilitates DNA Double-Strand Break Repair. *Mol Cell*. 2005; 20: 801–9.
6. Sedelnikova OA, Horikawa I, Zimonjic DB, Popescu NC, Bonner WM, Barrett JC. Senescing human cells and ageing mice accumulate DNA lesions with unreparable double-strand breaks. *Nat Cell Biol*. 2004; 6: 168–70.
7. 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.
8. Sedelnikova OA, Horikawa I, Redon C, Nakamura A, Zimonjic DB, Popescu NC, Bonner WM. Delayed kinetics of DNA double-strand break processing in normal and pathological aging. *Aging Cell*. 2008; 7: 89–100.
9. Kalfalah F, Seggewiß S, Walter R, Tigges J, Moreno-Villanueva M, Bürkle A, Ohse S, Busch H, Boerries M, Hildebrandt B, Royer-Pokora B, Boege F. Structural chromosome abnormalities, increased DNA strand breaks and DNA strand break repair deficiency in dermal fibroblasts from old female human donors. *Aging (Albany NY)*. 2015; 7: 110–22.
10. Joyce NC, Harris DL, Zhu CC. Age-Related Gene Response of Human Corneal Endothelium to Oxidative Stress and DNA Damage. *Investig Ophthalmology Vis Sci*. 2011; 52: 1641–9.
11. Rube CE, Fricke A, Widmann TA, Fürst T, Madry H, Pfreundschuh M, Rube C. Accumulation of DNA Damage in Hematopoietic Stem and Progenitor Cells during Human Aging. *PLoS One*. 2011; 6: e17487.
12. Vijg J. Somatic mutations and aging: a re-evaluation. *Mutat Res Mol Mech Mutagen*. 2000; 447: 117–35.

13. Garinis GA, van der Horst GTJ, Vijg J, H.J. Hoeijmakers J. DNA damage and ageing: new-age ideas for an age-old problem. *Nat Cell Biol.* 2008; 10: 1241–7.
14. Gorbunova V, Seluanov A. DNA double strand break repair, aging and the chromatin connection. *Mutat Res - Fundam Mol Mech Mutagen.* 2016; 788: 2–6.
15. Li Z, Zhang W, Chen Y, Guo W, Zhang J, Tang H, Xu Z, Zhang H, Tao Y, Wang F, Jiang Y, Sun FL, Mao Z. Impaired DNA double-strand break repair contributes to the age-associated rise of genomic instability in humans. *Cell Death Differ.* 2016; 23: 1765–77.
16. Garm C, Moreno-Villanueva M, Bürkle A, Petersen I, Bohr VA, Christensen K, Stevnsner T. Age and gender effects on DNA strand break repair in peripheral blood mononuclear cells. *Aging Cell.* 2013; 12: 58–66.
17. Sharma PM, Ponnaiya B, Taveras M, Shuryak I, Turner H, Brenner DJ. High Throughput Measurement of γ H2AX DSB Repair Kinetics in a Healthy Human Population. *PLoS One.* 2015; 10: e0121083.
18. Garbe JC, Bhattacharya S, Merchant B, Bassett E, Swisshelm K, Feiler HS, Wyrobek AJ, Stampfer MR. Molecular Distinctions between Stasis and Telomere Attrition Senescence Barriers Shown by Long-term Culture of Normal Human Mammary Epithelial Cells. *Cancer Res.* 2009; 69: 7557–68.
19. Garbe JC, Pepin F, Pelissier FA, Sputova K, Fridriksdottir AJ, Guo DE, Villadsen R, Park M, Petersen OW, Borowsky AD, Stampfer MR, LaBarge MA. Accumulation of Multipotent Progenitors with a Basal Differentiation Bias during Aging of Human Mammary Epithelia. *Cancer Res.* 2012; 72: 3687–701.
20. Löbrich M, Shibata A, Beucher A, Fisher A, Ensminger M, Goodarzi AA, Barton O, Jeggo PA. γ H2AX foci analysis for monitoring DNA double-strand break repair: Strengths, limitations and optimization. *Cell Cycle.* 2010; 9: 662–9.
21. Hernández L, Terradas M, Martín M, Tusell L, Genescà A. Highly Sensitive Automated Method for DNA Damage Assessment: Gamma-H2AX Foci Counting and Cell Cycle Sorting. *Int J Mol Sci.* 2013; 14: 15810–26.
22. DiBiase SJ, Zeng ZC, Chen R, Hyslop T, Curran WJ, Iliakis G. DNA-dependent protein kinase stimulates an independently active, nonhomologous, end-joining apparatus. *Cancer Res.* 2000; 60: 1245–53.
23. Rothkamm K, Löbrich M. Evidence for a lack of DNA double-strand break repair in human cells exposed to very low x-ray doses. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003; 100: 5057–62.

24. Stenerlöv B, Karlsson KH, Cooper B, Rydberg B. Measurement of Prompt DNA Double-Strand Breaks in Mammalian Cells without Including Heat-Labile Sites: Results for Cells Deficient in Nonhomologous End Joining. *Radiat Res.* 2003; 159: 502–10.
25. Iliakis GE, Cicilioni O, Metzger L. Measurement of DNA Double-strand Breaks in CHO Cells at Various Stages of the Cell Cycle Using Pulsed Field Gel Electrophoresis: Calibration by Means of ¹²⁵I Decay. *Int J Radiat Biol.* 1991; 59: 343–57.
26. Ismail IH, Wadhra TI, Hammarsten O. An optimized method for detecting gamma-H2AX in blood cells reveals a significant interindividual variation in the gamma-H2AX response among humans. *Nucleic Acids Res.* 2007; 35: e36.
27. 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.
28. Vaidya A, Mao Z, Tian X, Spencer B, Seluanov A, Gorbunova V. Knock-In Reporter Mice Demonstrate that DNA Repair by Non-homologous End Joining Declines with Age. *PLoS Genet.* 2014; 10: e1004511.
29. Vyjayanti VN, Rao KS. DNA double strand break repair in brain: Reduced NHEJ activity in aging rat neurons. *Neurosci Lett.* 2006; 393: 18–22.
30. Seluanov A, Mittelman D, Pereira-Smith OM, Wilson JH, Gorbunova V. DNA end joining becomes less efficient and more error-prone during cellular senescence. *Proc Natl Acad Sci.* 2004; 101: 7624–9.
31. Riballo E, Kühne M, Rief N, Doherty A, Smith GCM, Recio M-J, Reis C, Dahm K, Fricke A, Krempler A, Parker AR, Jackson SP, Gennery A, et al. A Pathway of Double-Strand Break Rejoining Dependent upon ATM, Artemis, and Proteins Locating to γ -H2AX Foci. *Mol Cell.* 2004; 16: 715–24.
32. Siddiqui MS, François M, Fenech MF, Leifert WR. γ H2AX responses in human buccal cells exposed to ionizing radiation. *Cytom Part A.* 2015; 87A: 296–308.
33. Taneja N, Davis M, Choy JS, Beckett MA, Singh R, Kron SJ, Weichselbaum RR. Histone H2AX Phosphorylation as a Predictor of Radiosensitivity and Target for Radiotherapy. *J Biol Chem.* 2004; 279: 2273–80.
34. Martín M, Terradas M, Tusell L, Genescà A. ATM and DNA-PKcs make a complementary couple in DNA double strand break repair. *Mutat Res Mutat Res.* 2012; 751: 29–35.
35. Suh Y, Vijg J. Maintaining Genetic Integrity in Aging: A Zero Sum Game. *Antioxid Redox Signal.* 2006; 8: 559–71.

36. Preston DL, Kitahara CM, Freedman DM, Sigurdson AJ, Simon SL, Little MP, Cahoon EK, Rajaraman P, Miller JS, Alexander BH, Doody MM, Linet MS. Breast cancer risk and protracted low-to-moderate dose occupational radiation exposure in the US Radiologic Technologists Cohort, 1983–2008. *Br J Cancer*. 2016; 115: 1105–12.
37. Krestinina LY, Preston DL, Ostroumova E V., Degteva MO, Ron E, Vyushkova O V., Startsev N V., Kossenko MM, Akleyev A V. Protracted Radiation Exposure and Cancer Mortality in the Techa River Cohort. *Radiat Res*. 2005; 164: 602–11.
38. Richardson DB, Wing S. Greater sensitivity to ionizing radiation at older age: follow-up of workers at Oak Ridge National Laboratory through 1990. *Int J Epidemiol*. 1999; 28: 428–36.
39. Debacq-Chainiaux F, Erusalimsky JD, Campisi J, Toussaint O. Protocols to detect senescence-associated beta-galactosidase (SA- β gal) activity, a biomarker of senescent cells in culture and in vivo. *Nat Protoc*. 2009; 4: 1798–806.
40. Du G, Drexler G a., Friedland W, Greubel C, Hable V, Krücken R, Kugler A, Tonelli L, Friedl A a., Dollinger G. Spatial Dynamics of DNA Damage Response Protein Foci along the Ion Trajectory of High-LET Particles. *Radiat Res*. 2011; 176: 706–15.
41. Everitt BS, Landau S, Leese M, Stahl D. *Cluster Analysis*. 5th ed. Quality and Quantity. 2011. 348 p.

TREBALL II

Deficient recruitment of 53BP1 to DNA double-strand breaks in G1 cells from aged women directs repair to BRCA1/CtIP-mediated end resection

Deficient recruitment of 53BP1 to DNA double-strand breaks in G1 cells from aged women directs repair to BRCA1/CtIP-mediated end resection

Teresa Anglada¹, Anna Genescà^{1*}, Marta Martín^{1*}

¹ Department of Cell Biology, Physiology and Immunology, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Bellaterra, Spain

*Both are corresponding authors and have contributed equally to this work

ABSTRACT

DNA repair mechanisms play an important role in maintaining genome integrity. However, the increased accumulation of DNA double-strand breaks (DSBs) and genome rearrangements in aged individuals suggests an age-associated DNA repair deficiency. Previous work from our group revealed a delayed firing of the DNA damage response that probably contributed to the accumulation of unrepaired breaks in Human Mammary Epithelial Cells (HMECs) from aged donors. To explore the mechanisms underlying this repair defect that is associated with age, we evaluated the efficiency of the main DNA repair pathways, the c-NHEJ and HR pathways, using a plasmid reporter assay. The efficiency of both pathways declines in HMECs from aged donors, while levels of DNA repair proteins involved in either the HR or the c-NHEJ pathway do not change with age. Furthermore, we observed a deficient recruitment of 53BP1 to radiation-induced DSBs, which could be responsible for the decreased c-NHEJ activity in cells from aged donors. The absence of 53BP1 permits the ectopic formation of BRCA1 foci while still in the G1 phase. CtIP and RPA foci are also formed in G1 cells from aged donors, but RAD51 is not recruited, thus indicating that extensive end resection occurs in these breaks although HR does not launch. These results suggest an age-associated switch of the repair pathways of some DSBs to highly mutagenic alternative mechanisms such as Alt-EJ that promote the formation of genome rearrangements. The accumulation of these events has been frequently observed in older individuals and supposes an important source of genome instability that might contribute to the aging process.

INTRODUCTION

Aging is a complex process that implies the loss of physiological integrity and also affects the DNA of cells. Several studies have reported increased frequencies of both DNA double-strand breaks (DSBs) and genome rearrangements in different tissues of aged organisms and senescent cells [1–5]. Also, mutations in some DSB repair genes have been described as causing a premature aging phenotype [6–9], thus pointing to a relationship between defective DNA repair and age. In this regard, the direct measurement of DSB repair events using plasmid constructs has demonstrated an age-associated decrease in the efficiency and fidelity of the repair function in mice, rats and human cells [10–13]. Thus, several evidences link aging with a decline in DSB repair efficiency that could account for the accumulation of unrepaired DNA damage and increased genome instability with age, but the nature of the DSB repair defect underlying the age-related accumulation of DNA damage still remains an open question.

There are two main DSB repair pathways operating in mammalian cells: the canonical Non-Homologous End-Joining (c-NHEJ) that is able to join scarcely resected broken DNA ends with little or no homology and the Homologous Recombination (HR) pathway, which needs extensive DNA resection and uses the sister chromatid as a template for repair. The choice of a DSB repair pathway is highly regulated, and the cell cycle is a major determinant [14–16]. The c-NHEJ is the predominant pathway during G1, although it can also work during the S and G2 phases. From mid-S to G2, when a sister chromatid is available as a template for repair, HR can also be activated in a Cyclin-Dependent Kinases (CDK)-dependent manner.

At the molecular level, the choice for a DNA repair pathway is regulated by DNA end resection, which inhibits c-NHEJ and promotes HR repair. The balance between 53BP1 and BRCA1 plays an important role in the choice of a DSB repair pathway by modulating end resection [17–19]. After DNA damage induction, multiple sites of 53BP1 are phosphorylated by the ataxia-telangiectasia mutated (ATM) kinase and 53BP1 is rapidly relocated to the break site [20–22]. Phosphorylated 53BP1 recruits RIF1 and PTIP, and the formation and positioning of the 53BP1/RIF1 complex at the DSB stimulates its repair by c-NHEJ while restricting BRCA1 accumulation at the DSB during the G1 phase of the cell cycle [17,23–27].

Progression into S phase enables CDK1-dependent formation and activation of the BRCA1/CtIP complex [28–30]. The CtIP protein is phosphorylated by ATM after DNA damage induced by ionising radiation (IR) [31] and forms a complex with MRE11/RAD50/NBS1 and BRCA1, which is required for DSB resection [32–34]. It was recently proposed that the recruitment of BRCA1 to the DSBs promotes PPC4-dependent dephosphorylation of 53BP1 and the subsequent loss of RIF1 from the complex, leading to 53BP1 repositioning, excluding it from the break site and promoting end resection of the DNA breaks [35,36]. The initial steps of resection are directed by the CtIP/MRE11 complex [37], which, along with other nucleases, generates long stretches of ssDNA that are coated by RPA [38]. RAD51 is a core protein of the HR pathway that progressively displaces the RPA in ssDNA to form a nucleoprotein filament that is competent to invade a sister chromatid strand and use it as a template for repair [39,40]. Finally, DNA ends are ligated and the original sequence is restored without error.

While HR is considered to operate as an error-free repair pathway, the c-NHEJ repair mechanism involves end-ligation without sequence homology, and thus, despite minimal resection, small deletions or insertions are frequently introduced [41,42]. However, c-NHEJ holds an important role in protecting genome integrity because it operates with fast kinetics, thus reducing the coincidence of broken ends and consequently reducing the probability of illegitimate repair [43]. In addition, DSBs can be repaired by the highly mutagenic alternative end joining (Alt-EJ) pathway, which promotes DNA end ligation after end resection, thus increasing the probability of introducing alterations in the DNA sequence [44–46]. In the last few years, great advances have been made in describing the mechanisms that regulate the interplay between the DSB repair pathways and their components. However, the decline in the efficiency of these pathways during aging and how this decline would eventually impact the interplay between them has yet to be explored.

In a previous work from our group, we measured the frequency of γ H2AX foci in G1 Human Mammary Epithelial Cells (HMECs) from young and aged donors after exposure to γ -rays (Anglada et al., in press). An age-associated delay in the firing of the DNA Damage Response (DDR) responsible for the repair deficiency was observed in HMECs from older women (Anglada et al., in press). To find out the exact nature of this repair defect, in the present work we evaluated the activity of the c-NHEJ and HR repair pathways and the dynamics of the main proteins involved in these pathways after DSB

induction. We observed that the activity of both DNA repair pathways decreases with the donor's age. Protein colocalization assays revealed an age-associated defect in the recruitment of 53BP1 to DSBs in G1 cells that permit BRCA1 ectopic access to these breaks. BRCA1 recruitment in G1 is accompanied by CtIP-mediated end resection and RPA coating of the ssDNA, but RAD51 is not present at these breaks, thus dismissing repair by HR. We speculate that absence of 53BP1 at these breaks prevents their repair by c-NHEJ and instead makes them accessible to end resection while still in G1. Thus, we propose that increasing age hampers proper recruitment of 53BP1 to G1 DSBs, thus preventing fast repair and switching DSB repair to error prone mechanisms such as Alt-EJ, which could contribute to the age-associated formation of genomic rearrangements.

RESULTS

1. Efficiency of the c-NHEJ and HR DSB repair pathways decreases with age

In a previous study, we described an age-associated increase in the frequency of DNA DSBs in HMECs following IR exposure and connected it to an age-related delayed firing of the DDR (Anglada et al., in press). To investigate the nature of this repair defect, here we used HMECs derived from mammary tissues of female donors classified as young donors (YDs, < 27 years old) and aged donors (ADs, > 60 years old). Low PD cells (< 20 PD) were used in all of the experiments to rule out any effect of replicative cellular senescence on DNA repair.

First, we evaluated the efficiency of the two main DSB repair pathways in mammalian cells, the c-NHEJ and HR pathways, by transfecting the cells with the reporter plasmids pimEJ5GFP or pDRGFP together with an I-SceI enzyme expressing plasmid (Supplementary Figure 1). The intact c-NHEJ and HR reporting plasmids are GFP-negative. However, when the I-SceI enzyme induces a DSB, the GFP gene can be restored if the pathway tested repairs it. Thus, the frequency of GFP-expressing cells measured by flow cytometry provides an estimation of the efficiency of c-NHEJ or HR repair (Figure 1A and 1D). To obtain the transfection efficiency values for each donor, each sample was also transfected with a constitutively GFP-expressing plasmid. The transfection efficiency values obtained were low but consistent, as is expected for primary cells, and despite inter-individual variations amongst donors (Table 1), there were no statistical differences between the two age groups (YDs = 9.18%; ADs = 11.51%, *t*-test; *p*-value > 0.05). Regarding c-NHEJ, its normalized average efficiency calculated for the two age groups resulted in statistically significant differences (4.50% in YDs and 2.32% in ADs; *t*-test; *p*-value < 0.001) (Table 1 and Figure 1B). Consistent with this, c-NHEJ efficiency was negatively correlated with the residual number of γ H2AX foci scored 24 h after exposure to 1 Gy of γ -rays in each donor ($R^2 = 0.39$; *p*-value = 0.0308) (Figure 1C). Therefore, c-NHEJ repair is less efficient with age and this defect most probably contributes to the accumulation of residual DSBs in ADs.

In contrast to the c-NHEJ pathway, the HR pathway only operates from the S to the G2 phase of the cell cycle. According to this, the normalized frequencies of GFP-positive cells were lower for HR than for c-NHEJ in all donors (Table 1, Figure 1E). Our results showed that the HR repair pathway activity was also reduced in ADs compared to YDs

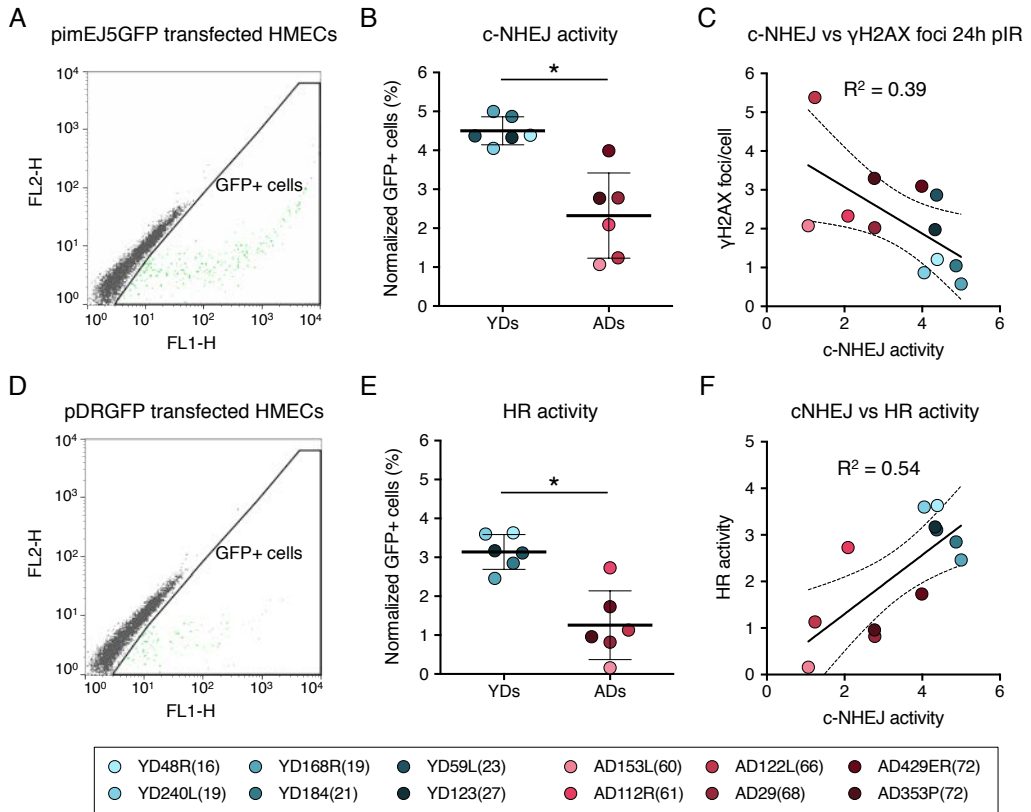


Figure 1. The efficiency of DNA DSB repair by c-NHEJ and HR decreases significantly with age.

(A) Representative flow cytometry plot of the frequency of GFP-positive cells after co-transfection with the c-NHEJ reporter plasmid pimEJ5GFP and the I-SceI expressing plasmids. (B) Normalized frequency of GFP-positive cells after transfection with pimEJ5GFP and the I-SceI expressing plasmids for YDs (blue) and ADs (red). Mean and SD are indicated for each group. Asterisk indicates statistically significant differences between YDs and ADs (t -test, p -value < 0.001). (C) Correlation between the activity of c-NHEJ and the residual number of γ H2AX foci scored in HMECs from YDs and ADs. Best-fit line, 95% confidence bands (dotted lines) and Pearson's correlation coefficient (R^2) are indicated (p -value = 0.0308). (D) Representative flow cytometry plot of the frequency of GFP-positive cells after co-transfection with the HR reporter plasmid pDRGFP and the I-SceI expressing plasmids. (E) Normalized frequency of GFP-positive cells after co-transfection with pDRGFP and the I-SceI expressing plasmids for YDs and ADs. Mean and SD are indicated for each group. Asterisks indicate significant differences between YDs and ADs (t -test, p -value < 0.001). (F) Correlation between the activity of the c-NHEJ and the HR pathways in HMECs from YDs and ADs. Best-fit line, 95% confidence bands (dotted lines) and Pearson's correlation coefficient (R^2) are indicated (p -value = 0.0065).

(3.14% for YDs and 1.33% for ADs), and the difference was statistically significant (t -test; p -value < 0.001). It could be argued that a reduced efficiency of the HR repair pathway in ADs could be due to an increased frequency of ADs' cells halted in the G1 phase.

However, the cell cycle analysis discarded this possibility as no significant differences in the distribution of the cell cycle phases between YD and AD cells were detected (Supplementary Figure 2; two-way ANOVA and Bonferroni multiple correction test; p -value > 0.05). Finally, we observed that the donors with low HR activity also showed low c-NHEJ activity ($R^2 = 0.54$, p -value = 0.0065) (Figure 1F) and they were mostly old donors. These results indicate that the age-related DSB repair deficiency is not restricted to a single pathway, but instead affects both main DSB repair pathways, thus contributing to the accumulation of DNA damage in aged organisms.

Table 1. Plasmid reporter assays for the c-NHEJ and HR pathways in HMECs.

Donor	Transfection efficiency		c-NHEJ	HR
	%	SD	Normalized %	Normalized %
Young donors	9.18	5.75	4.50	3.14
YD48R(16)	10.67	0.40	4.39	3.63
YD240L(19)	4.21	1.01	4.05	3.60
YD168R(19)	11.94	4.40	5.00	2.46
YD184(21)	5.51	1.94	4.87	2.85
YD59L(23)	8.11	0.43	4.37	3.11
YD123(27)	22.35	0.78	4.33	3.17
Aged donors	11.51	7.74	3.32	1.33
AD153L(60)	22.03	3.31	1.07	0.16
AD112R(61)	16.62	9.45	2.09	2.73
AD122L(66)	4.99	0.79	1.24	1.13
AD29(68)	6.16	0.60	2.78	0.82
AD429ER(72)	7.51	5.73	3.99	1.73
AD353P(72)	11.93	1.56	2.77	0.96

2. Proteins involved in HR and c-NHEJ are not depleted in HMECs in aged donors

The expression of DNA repair enzymes has been evaluated in cells from aged individuals and senescent cells with inconsistent results [13,47–49]. To elucidate the regulatory mechanisms underlying the negative association between the assessed repair pathways and age, we first analysed the levels of BRCA1 and 53BP1 in cells from the two age groups. These are the proteins that guide the repair choice for the HR and c-NHEJ pathways, respectively. The protein levels that were analysed by western blot were normalized for the total protein loaded in each sample. Although some variation was detected amongst donors, no significant differences in 53BP1 or BRCA1 levels were observed between the two groups (Figure 2A). Because the reduced efficiency of both repair pathways could reside downstream of 53BP1 and BRCA1, we next checked the levels of some of their effector proteins, such as Ku70, RPA and RAD51, which are directly or indirectly recruited by BRCA1 or 53BP1. Again, the levels of these proteins

showed inter-individual variations, but no age-associated tendency was detected (Figures 2A and 2B). We conclude that the observed decline in c-NHEJ and HR repair in ADs is not due to a depletion of the DNA repair proteins described above that would render them unavailable for DSB repair.

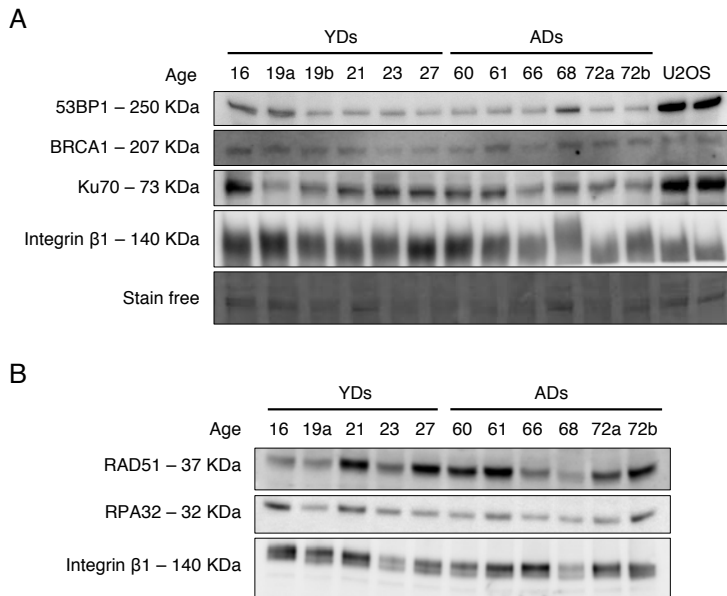


Figure 2. Western blot analysis of c-NHEJ and HR factors. Basal levels of high (A) and low (B) molecular weight DNA repair proteins in HMECs from young and aged donors and in U2OS cells as a positive control. Stain free technology and/or Integrin β 1 have been used for sample normalization.

3. BRCA1 is efficiently recruited to DSBs in G2 phase HMECs from older donors

We next hypothesized that the repair defect observed in ADs could be due to an impaired recruitment of DNA damage signalling and repair proteins to DSB sites. To assess protein recruitment dynamics, DSBs were induced in localized areas of cell nuclei using the micro-irradiation technique described by Suzuki et al. (2011) [50]. DSBs were identified at 15, 30 and 60 min post-irradiation (pIR) as discrete γ H2AX foci by immunofluorescent detection of the phosphorylated histone. The newly induced DSBs could be clearly differentiated from the basal ones (Figure 3A), whose frequency was low but significantly increased in aged donors (Anglada et al., in press). We first checked the colocalization of BRCA1 and γ H2AX at radiation-induced DSBs in G2 cells, which were identified by CENPF staining, a protein that progressively accumulates from the S phase

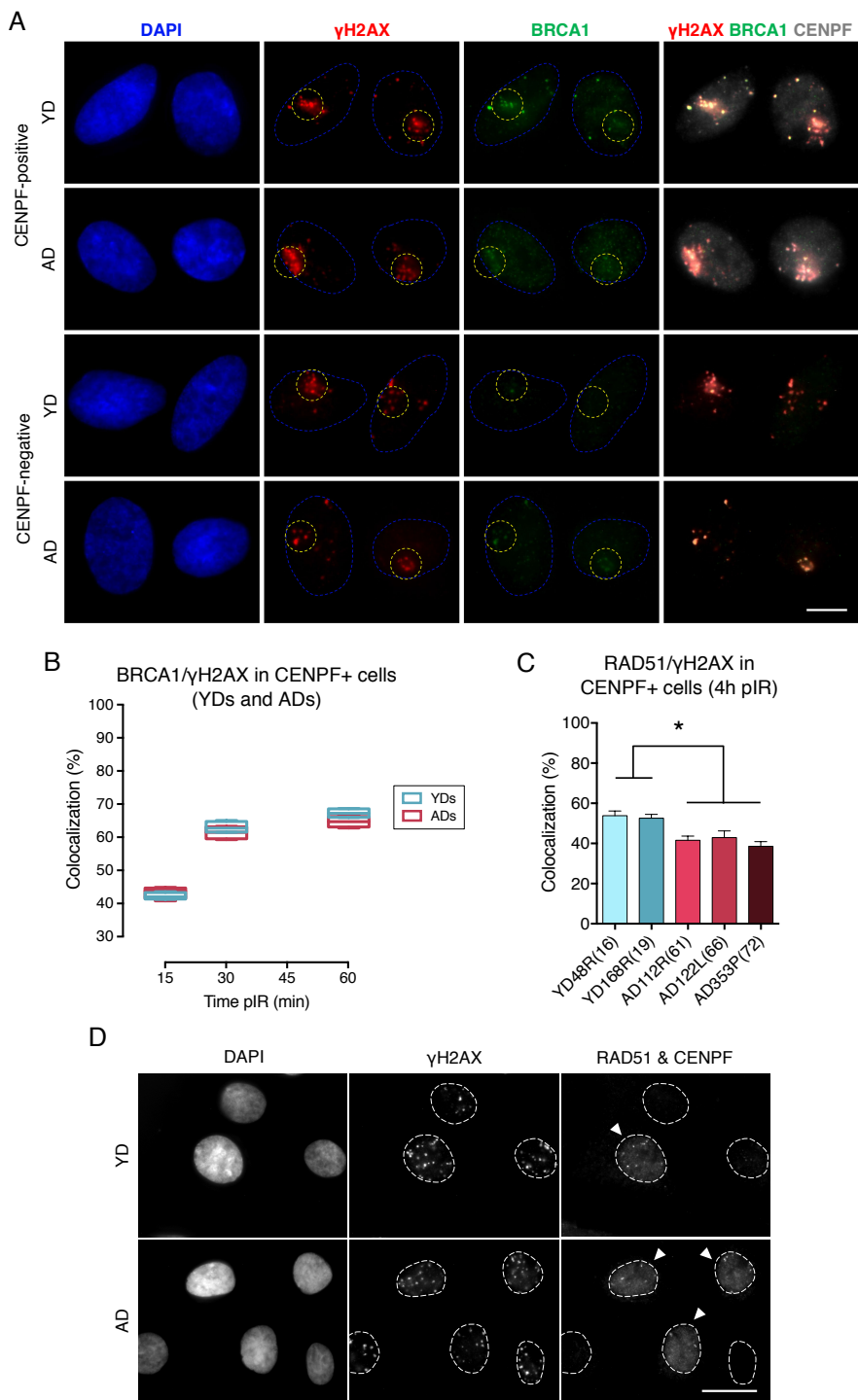


Figure 3. The recruitment of BRCA1 to DNA damage sites in G2 is not impaired in cells from aged donors. (Continue on next page) →

← (Continued from previous page) **(A)** Immunofluorescent labelling of cell nuclei with DAPI (blue), γ H2AX foci (A594, red), BRCA1 foci (A488, green) and CENPF nuclear staining (A532, grey). γ H2AX and BRCA1 foci were scored within the irradiated pore zone (dotted lines in yellow) in HMECs from YDs and ADs. Scale bar = 10 μ m **(B)** Percentage of BRCA1/ γ H2AX foci colocalization at 15, 30 and 60 min post-irradiation (15 J/m², UVC) in BrdU sensitized HMECs from four YDs (blue) and four ADs (red). Boxes include data from the upper to the lower quartile and whiskers compile from minimum to maximum values. The analysis was restricted to CENPF-positive cells. The number of pores analysed for each donor is stated in Table 2. No statistical differences between YDs and ADs were observed (two-way ANOVA and Bonferroni multiple correction test, p -value > 0.05). **(C)** Percentage of RAD51/ γ H2AX foci colocalization in CENPF-positive cells at 4 h after irradiation (5 Gy, γ -rays). Error bars indicate SEM and asterisk indicates statistical differences between YDs (blue) and ADs (red) (one-way ANOVA and Tukey multiple correction test, p -value < 0.05). $N \geq 500$ γ H2AX foci for each donor. **(D)** Immunofluorescent labelling of cell nuclei with DAPI (blue), γ H2AX foci (A488), RAD51 foci (A594) and CENPF nuclear staining (A532) at 4 h after exposure to 5 Gy of γ -rays. Arrowheads indicate G2 (CENPF-positive) cells. Scale bar = 20 μ m.

and G2 to mitosis [37,51]. CENPF-positive nuclei were localized and the individualized γ H2AX foci in the micro-irradiated nuclear areas were scored. Next, we determined the BRCA1 foci colocalization with each γ H2AX foci (Figure 3A). The colocalization of BRCA1 with γ H2AX foci increased with time after micro-irradiation both in YDs and ADs, reaching a maximum at 60 min pIR and without detectable differences between the two age groups (42.55% at 15 min, 62.67% at 30 min and 67.42% of γ H2AX foci colocalized with BRCA1 at 60 min pIR in YDs; 43.04% at 15 min, 61.87% at 30 min and 64.84% at 60 min pIR of foci protein colocalization in ADs; two-way ANOVA and Bonferroni multiple correction test; p -value > 0.05) (Figure 3B; Table 2). Given that BRCA1 recruitment to DSBs in G2 cells from ADs was as effective as in those from YDs, we ruled out an age-associated deficiency in BRCA1-mediated DSB recognition.

To determine if difficulties related to the recruitment of other effector proteins downstream of BRCA1 could still exist, we analysed the colocalization of RAD51 with γ H2AX foci in G2 cells at 4 h after exposure to 5 Gy of γ -rays (Figure 3C and 3D). Our results showed a reduced colocalization in AD cells compared to YD cells (53.37% in YD vs. 40.91% in AD; one-way ANOVA and Tukey multiple correction test; p -value < 0.05) (Figure 3C), suggesting that not BRCA1 but an impaired or delayed RAD51 recruitment to DSBs could affect the proper progression of homologous recombination repair with age and account for the decreased efficiency of the HR pathway detected with the plasmid reporter assay in cells from older donors.

Table 2. Colocalization of BRCA1 to radiation-induced DSBs in CENPF-positive (G2) HMECs.

Donor	15' pIR				30' pIR				60' pIR			
	N pores	N γ H2AX foci	N BRCA1 foci	% BRCA1/ γ H2AX	N pores	N γ H2AX foci	N BRCA1 foci	% BRCA1/ γ H2AX	N pores	N γ H2AX foci	N BRCA1 foci	% BRCA1/ γ H2AX
Young donors	94	1107	471	42.55	86	1050	685	62.67	83	1231	830	67.42
YD48R(16)	15	108	45	41.67	16	124	81	65.32	8	74	51	68.92
YD240L(19)	28	407	178	43.73	31	460	284	61.74	30	549	376	68.49
YD168R(19)	22	256	109	42.58	18	211	135	63.98	25	367	243	66.21
YD184(21)	29	336	139	41.37	21	255	158	61.96	20	241	160	66.39
Aged donors	87	1034	445	43.04	93	1238	766	61.87	106	1439	933	64.84
AD112R(61)	28	340	139	40.88	23	321	202	62.93	32	405	255	62.96
AD29(68)	24	300	131	43.67	26	359	217	60.45	31	425	284	66.82
AD429ER(72)	26	245	108	44.08	30	373	237	63.54	29	389	250	64.27
AD353P(72)	9	149	67	44.97	14	185	110	59.46	14	220	144	65.45

4. Age-related decrease in the recruitment of 53BP1 to DSB sites

Next, we analysed the dynamics of the recruitment of c-NHEJ proteins to DSBs. To that end, we assessed 53BP1 recruitment to DSB sites and its colocalization with γ H2AX (Figure 4A). Recruitment of 53BP1 to DSBs was less efficient in ADs than in YDs at all analysed times (62.59% at 15 min, 76.39% at 30 min and 81.00% of scored γ H2AX foci at 60 min pIR colocalized with 53BP1 in YDs; 48.19% at 15 min, 62.42% at 30 min and 66.79% at 60 min pIR of protein colocalization in ADs; two-way ANOVA and Bonferroni multiple correction test; p -value < 0.0001) (Figures 4B and 4C; Table 3). An age-related impaired recruitment of 53BP1 to DSBs could account for the increased frequency of residual breaks in AD cells as well as for the reduced efficiency of the c-NHEJ pathway. In this regard, frequencies of 53BP1 recruitment to DSBs for each donor positively correlated with values of c-NHEJ efficiency evaluated with the plasmid reporter system at all analysed time points ($R^2 = 0.54$ at 15 min; $R^2 = 0.61$ at 30 min and $R^2 = 0.69$ at 60 min pIR) (Figure 4D). Also, 53BP1 recruitment to DSBs (60 min pIR) negatively correlated with the frequencies of γ H2AX foci in HMECs from the same donors reported previously (Anglada et al., in press) before ($R^2 = 0.76$) and 24 h after irradiation ($R^2 = 0.79$) (Supplementary Figure 3), indicating that proper recruitment of 53BP1 favours γ H2AX foci clearance. Therefore, it is not surprising that the frequency of DSBs signalled by 53BP1 appears to be good marker of age, as data from the 53BP1/ γ H2AX colocalization at the different time points hierarchically cluster donors into two differentiated groups that coincide with the chronological age of the donors (Figure 4E). Altogether these results indicate that 53BP1 recruitment to DSB sites at early times after DNA damage induction is impaired in the HMECs from aged donors, and it translates into a lower efficiency of c-NHEJ and into an increased frequency of both basal and induced γ H2AX foci.

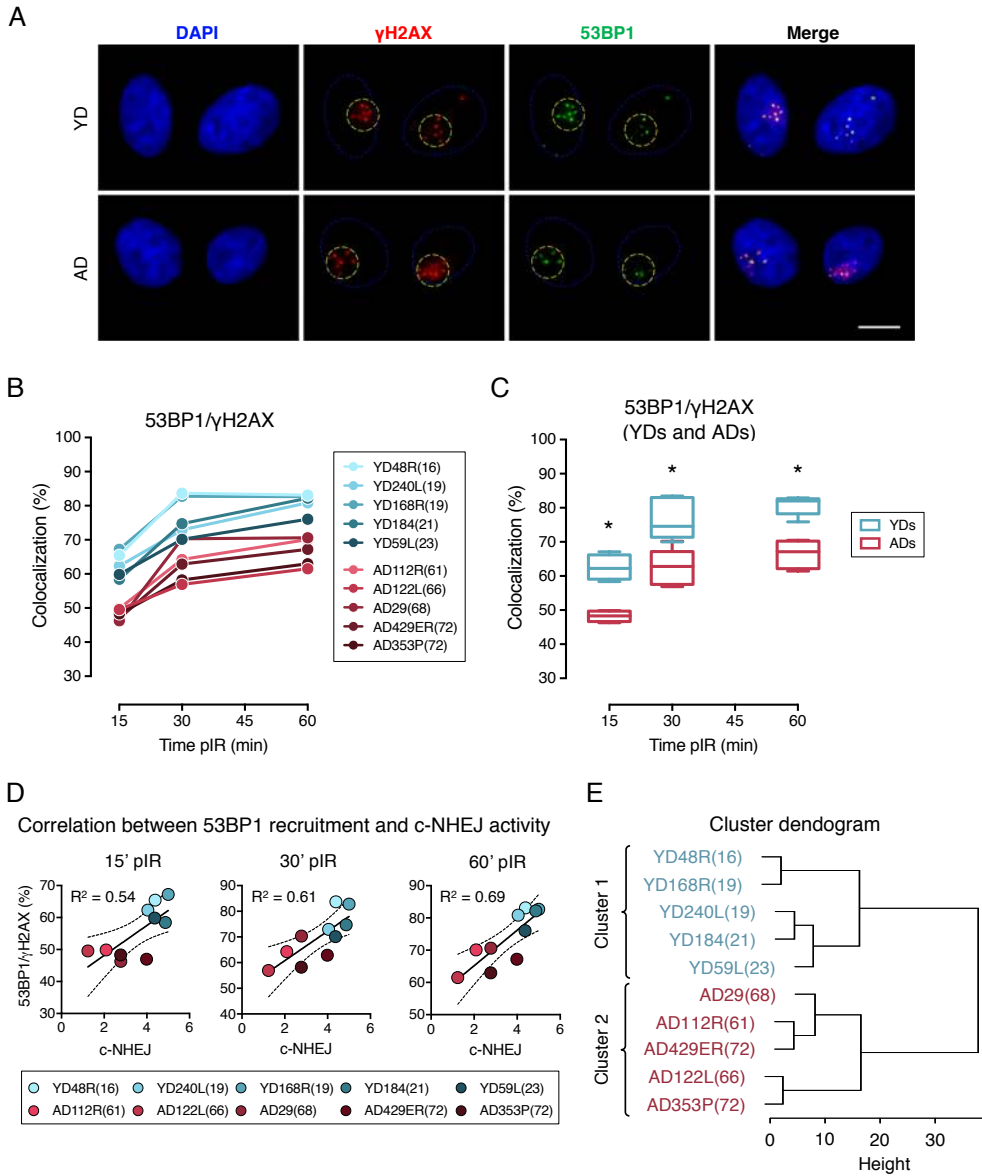


Figure 4. Deficient recruitment of 53BP1 to DSB sites in aged donor cells. (A) Immunofluorescent labelling of cell nuclei with DAPI (blue), γ H2AX foci (Cy3, red) and 53BP1 foci (A488, green). γ H2AX and 53BP1 foci were scored within the irradiated pore zone (dotted lines in yellow) in HMECs from YDs and ADs. Scale bar = 10 μ m. (B) Percentage of 53BP1/ γ H2AX foci colocalization at 15, 30 and 60 min post-irradiation (15 J/m², UVC) in BrdU sensitized HMECs from five YDs (blue) and five ADs (red). The number of pores analysed for each donor is stated in Table 3. (C) Percentage of 53BP1/ γ H2AX foci colocalization for YDs and ADs. Boxes include data from the upper to the lower quartile and whiskers compile from minimum to maximum values. Asterisks indicate significant differences between YDs and ADs at a concrete time point (two-way ANOVA and Bonferroni multiple correction test, p -value < 0.0001). (Continue on next page) →

← (Continued from previous page) (D) Correlation of c-NHEJ efficiency and 53BP1/ γ H2AX colocalization (at 15, 30 and 60 min pIR) in HMECs from YDs and ADs. Best-fit line, 95% confidence bands (dotted lines) and Pearson's correlation coefficient (R^2) are indicated (p -value < 0.05). (E) Hierarchical clustering of the ten donors according to the percentage of 53BP1/ γ H2AX foci colocalization at 15, 30 and 60 min after irradiation.

Table 3. Colocalization of 53BP1 to radiation-induced DSBs in HMECs.

Donor	15' pIR				30' pIR				60' pIR			
	N pores	N γ H2AX foci	N 53BP1 foci	% 53BP1/ γ H2AX	N pores	N γ H2AX foci	N 53BP1 foci	% 53BP1/ γ H2AX	N pores	N γ H2AX foci	N 53BP1 foci	% 53BP1/ γ H2AX
Young donors	440	4250	2660	62.59	451	4193	3203	76.39	453	4227	3424	81.00
YD48R(16)	56	486	318	65.43	54	361	302	83.66	62	527	438	83.11
YD240L(19)	110	1245	776	62.33	108	1086	792	72.93	107	1117	903	80.84
YD168R(19)	109	988	664	67.21	110	1121	928	82.78	104	1061	877	82.66
YD184(21)	107	1023	598	58.46	92	895	669	74.75	94	787	647	82.21
YD59L(23)	58	508	304	59.84	87	730	512	70.14	86	735	559	76.05
Aged donors	467	4692	2261	48.19	464	4510	2815	62.42	411	3701	2472	66.79
AD112R(61)	106	1025	511	49.85	103	1035	665	64.25	105	933	654	70.10
AD122L(66)	105	1126	558	49.56	109	1189	677	56.94	93	894	550	61.52
AD29(68)	110	1242	575	46.30	109	1021	718	70.32	98	878	620	70.62
AD429ER(72)	92	796	374	46.98	50	396	249	62.88	64	491	330	67.21
AD353P(72)	54	503	243	48.31	93	869	506	58.23	51	505	318	62.97

5. In the absence of 53BP1, BRCA1 is ectopically recruited to DSBs in G1

Although BRCA1 is expressed in G1 cells, its recruitment to DSB sites is suppressed by 53BP1 that acts as a barrier for HR to proceed by preventing DSBs' end resection. Thus, BRCA1 is unable to form IR-induced foci that colocalize with γ H2AX foci during G1, unless 53BP1 is depleted [17,52]. Because 53BP1 recruitment to γ H2AX foci was impaired in ADs, we next aimed to determine if the observed age-related 53BP1 recruitment defect could permit BRCA1 to ectopically form foci DSB sites during the G1 phase. We first scored the γ H2AX foci induced 30 min after localized DSBs induction in G1 cells (negative for CENPF staining) (Figure 3A), and checked for BRCA1 foci colocalization inside the pore zone. At this time, BRCA1/ γ H2AX foci colocalization in G1 cells was 41.66% in ADs and less than 20% in YDs (Mann Whitney test; p -value < 0.0001) (Figures 5A and 5B; Table 4). Moreover, the fraction of BRCA1-free γ H2AX foci inside the pores was lower in ADs (~10%) than in YDs (~40%) (Figure 5A). These results indicate that in G1 cells, BRCA1 can form foci at γ H2AX-signalled DSBs and that the frequency of this event increases with the donor's age. Since 53BP1 recruitment is compromised in ADs, it is tempting to speculate that ectopic BRCA1 recruitment is promoted at the 53BP1-orphan DSBs. In fact, the addition of the two colocalization

frequencies (53BP1/ γ H2AX and BRCA1/ γ H2AX) reach ~100% in each donor (Figures 5B and 5C), suggesting that either 53BP1 or BRCA1 are recruited to almost all DSBs within 30 min of their induction. We propose that ectopic BRCA1 foci formation at DSBs in G1 cells is an age-related response, most probably related to an attempt to resolve DSBs that failed to recruit 53BP1.

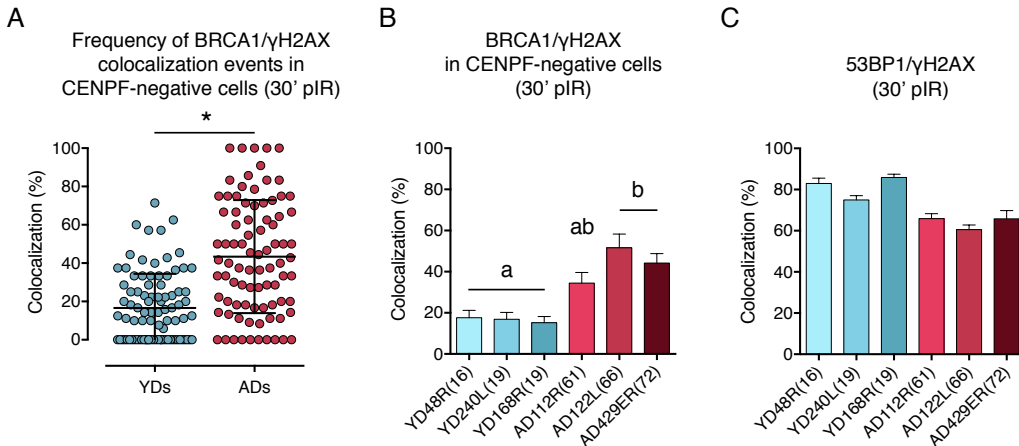


Figure 5. BRCA1 is ectopically recruited to DNA DSBs in aged donor G1 cells. (A) Frequency of BRCA1/ γ H2AX foci colocalization in CENPF-negative cells from YDs (blue) and ADs (red) at 30 min after irradiation (15 J/m², UVC, BrdU sensitized cells). Each dot corresponds to the fraction of BRCA1 and γ H2AX foci colocalizing within one pore. The mean is indicated for each group and error bars correspond to the SD. The number of pores analysed is stated in Table 4. Asterisks indicate significant differences between YDs and ADs (Mann Whitney test, p -value < 0.0001). (B) Percentage of BRCA1/ γ H2AX foci colocalization in CENPF-negative cells for individual donors at 30 min after irradiation. Error bars indicate SEM and different letters indicate statistical differences between donors (Kruskal-Wallis and Dunn's multiple correction test, p -value < 0.05). The number of pores analysed for each donor is stated in Table 4. (C) Percentage of 53BP1/ γ H2AX foci colocalization in CENPF-negative cells for individual donors at 30 min after irradiation. Error bars indicate SEM. The number of pores analysed for each donor is stated in Table 3. Note that the sum of BRCA1/ γ H2AX (B) and 53BP1/ γ H2AX (C) reaches around 100% for each donor.

Table 4. Colocalization of BRCA1 to radiation-induced DSBs in CENPF-negative (G1) HMECs.

Donor	30' pIR			
	N pores	N γ H2AX foci	N BRCA1 foci	% BRCA1/ γ H2AX
Young donors	90	896	156	17.41
YD48R(16)	31	261	46	17.62
YD240L(19)	29	351	63	17.95
YD168R(19)	30	284	47	16.55
Aged donors	86	761	317	41.66
AD112R(61)	27	268	95	35.45
AD122L(66)	26	203	100	49.26
AD429ER(72)	33	290	122	42.07

6. CtIP-mediated end resection of DSBs occurs in G1 cells from aged donors

To determine the significance of the BRCA1 ectopic recruitment observed in G1 cells from ADs, we analysed whether CtIP, a nuclease whose access to DNA ends is usually restricted to the S/G2 phases of the cell cycle when it stimulates end resection previous to HR repair, was being recruited to those G1-DSBs occupied by BRCA1. To this end, HMECs from YDs and ADs were exposed to 5 Gy of γ -rays and the number of CtIP-positive cells (≥ 5 foci) in G1 was scored. At 1 h pIR ADs showed a significantly increased frequency of CtIP-positive cells ($< 6\%$ in YDs vs. $> 15\%$ in ADs; Fisher's exact test; p -value < 0.05) (Figures 6A and 6B). These results suggest that although not all of the γ H2AX foci colocalizing with BRCA1 had efficiently recruited CtIP, a significant fraction of DSBs in AD cells eventually did and might be undergoing an aberrant end resection, which is normally restricted to cells in S or G2 phases that had been committed to the homologous repair of DSBs.

Because RPA binds and stabilizes ssDNA intermediates that arise after DNA processing, we next analysed its recruitment in G1 cells from ADs. At 1 h pIR the number of RPA foci scored in G1 cells was negligible. However, at 4 h after irradiation while most YD cells in G1 were still devoid of RPA foci, the frequency of RPA-positive cells (≥ 5 foci) in AD cells increased significantly (0% in YDs vs. $\geq 10\%$ in ADs; Fisher's exact test; p -value < 0.05) (Figures 6C and 6D). These results suggest that the initial resection elicited by CtIP in G1 cells from older donors can eventually elicit an extensive end resection resulting in single-stranded stretches of DNA that are effectively coated with RPA. Despite DSBs in G1 being occupied by DNA repair proteins that promote end resection, the colocalization of RAD51 foci with γ H2AX foci was observed to be extremely low in both young and aged donors at 4 h after 5 Gy exposure (2.12% in YDs vs. 2.47% in ADs; Kruskal-Wallis and Dunn's multiple correction test; p -value > 0.05) (Figure 6E). Thus, we discard that the HR pathway operates on DNA breaks occupied with BRCA1 in G1 cells from older donors. However, the impact of those DSBs that suffered end resection in G1 should be reckoned with, as the resected intermediates are able to suppress c-NHEJ-mediated DSB repair and favour alternative and highly mutagenic DNA repair mechanisms.

In summary, the results of the current study indicate that HMECs from old donors display a defective recruitment of 53BP1 to DSBs in G1 cells. The lack of 53BP1 most probably enables recruitment of BRCA1 along with CtIP to these breaks, which then undergo

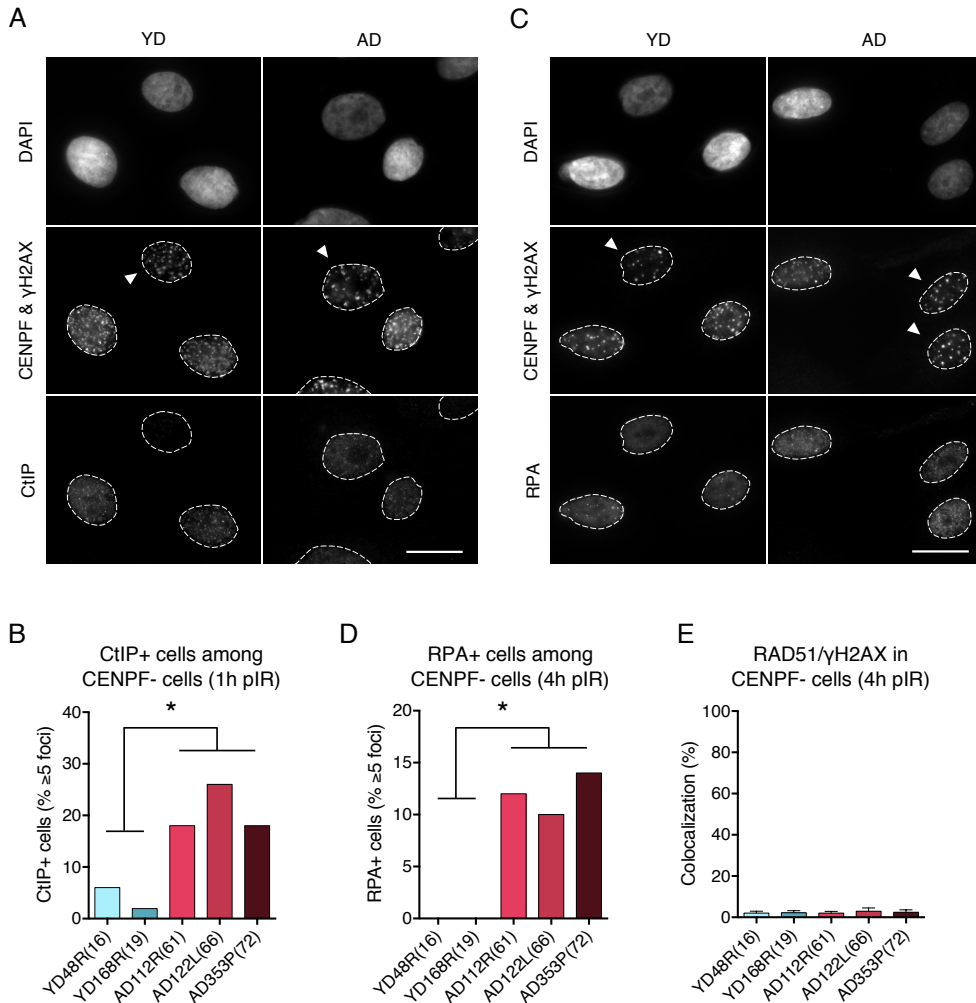
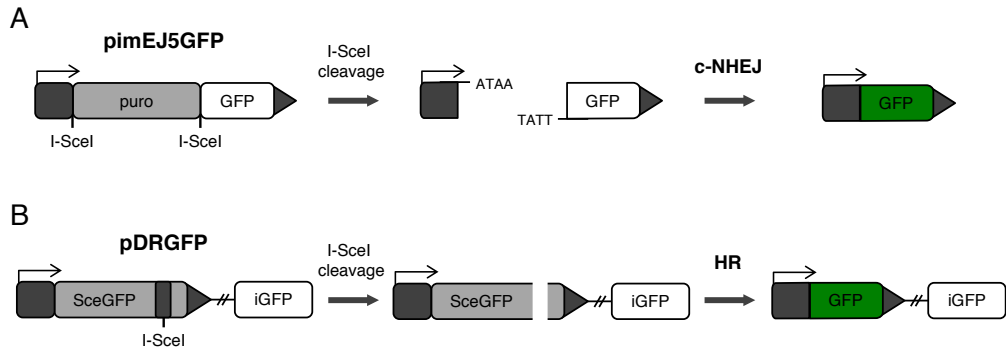


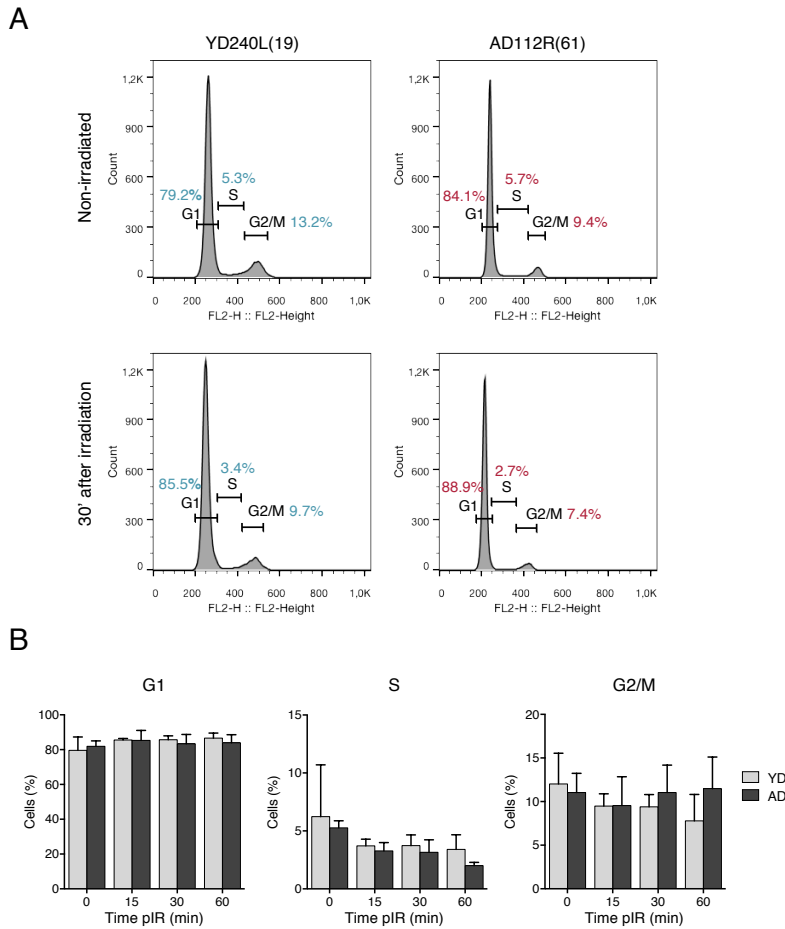
Figure 6. CtIP and RPA but not RAD51 are ectopically recruited to DNA-DSBs in G1 cells from aged donors. (A) Immunofluorescent labelling of cell nuclei with DAPI, CENPF (A532), γ H2AX (A594) and CtIP (A488) at 1 h after irradiation (5 Gy, γ -rays). Arrowheads indicate G1 (CENPF-negative) cells. Scale bar = 20 μ m. (B) Frequency of CtIP-positive HMECs (cells with ≥ 5 foci) at 1 h after irradiation (5 Gy, γ -rays). Analysis was restricted to CENPF-negative cells (G1). Asterisks indicate significant differences between YDs (blue) and ADs (red) (Fisher's exact test, p -value < 0.05). $N \geq 50$ cells for each donor. (C) Immunofluorescent labelling of cell nuclei with DAPI, CENPF (A532), γ H2AX (A594) and RPA (A488) at 4 h after irradiation (5 Gy, γ -rays). Arrowheads indicate G1 (CENPF-negative) cells. Scale bar = 20 μ m. (D) Frequency of RPA-positive HMECs (cells with ≥ 5 foci) at 4 h after irradiation (5 Gy, γ -rays). Analysis was restricted to CENPF-negative cells (G1). Asterisks indicate significant differences between YDs (blue) and ADs (red) (Fisher's exact test, p -value < 0.05). $N \geq 50$ cells for each donor. (E) Percentage of RAD51/ γ H2AX foci colocalization in CENPF-negative cells at 4 h after irradiation (5 Gy, γ -rays). Error bars indicate SEM. No statistical differences between donors were observed (Kruskal-Wallis and Dunn's multiple correction test, p -value > 0.05). $N \geq 1000$ γ H2AX foci for each donor.

inappropriate DNA end resection mediated by CtIP. If resection is extensive enough, single-stranded fragments are coated by RPA while awaiting ligation. Because launching a full HR repair in G1 is not possible, we speculate two possible outcomes for these DSBs: they might remain extensively processed and unrepaired until the cells progresses to S phase and HR can be fully launched in the presence of a DNA template or, alternatively, they become substrates for alternative and highly mutagenic backup mechanisms of DNA repair, such as Alt-EJ repair.

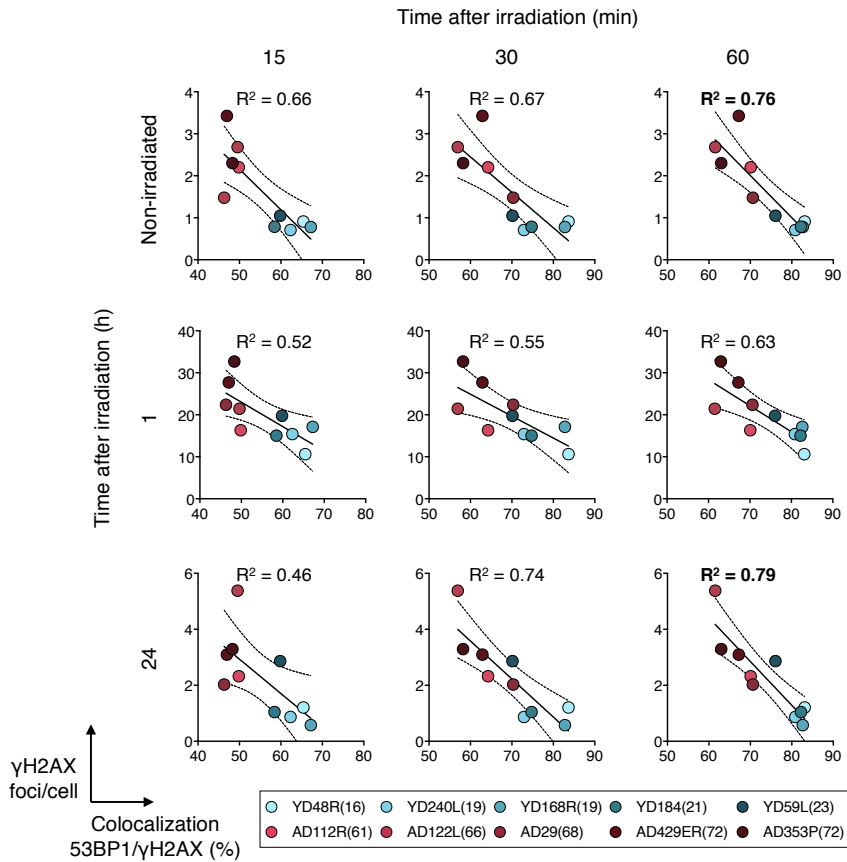
SUPPLEMENTARY FIGURES



Supplementary Figure 1. Structure of the reporter plasmids for the analysis of c-NHEJ (A) and HR (B) efficiency.



Supplementary Figure 2. Cell cycle analysis with flow cytometry. (A) Representative diagrams of cell cycle distribution for one YD and one AD in non-treated conditions and at 30 min post-irradiation (15 J/m^2 , UVC, BrdU sensitized cells). (B) Frequency of cells at G1, S and G2/M stages in non-irradiated HMECs and at 15, 30 and 60 min after irradiation (15 J/m^2 , UVC, BrdU sensitized cells). Mean values from three YDs and three ADs and SD are shown.



Supplementary Figure 3. Negative correlations of 53BP1/γH2AX foci colocalization and the number of DNA DSBs scored as γH2AX foci in HMECs from YDs and ADs. 53BP1/γH2AX foci colocalization was evaluated at 15, 30 and 60 min pIR and γH2AX foci were scored before and 1 h and 24 h pIR. Best-fit line, 95% confidence bands (dotted lines) and Pearson's correlation coefficient (R) are indicated (p -value < 0.05). The two most significant values are highlighted in bold letters.

DISCUSSION

The mechanisms by which older individuals accumulate genome rearrangements and DSBs have remained unknown for years. In a previous work, we reported a delayed firing of the DDR in G1 HMECs from aged donors that could contribute to the accumulation of DSBs with age (Anglada et al., in press). In the work presented here we explored the causes of the deferred ignition of the repair response in aged individuals. We observed a deficient recruitment of 53BP1 to radiation-induced DSBs from old donors, a defect that was previously described by our group using *in vitro* aged HMECs [53], suggesting that the deficiency in 53BP1 recruitment could be an age-related characteristic. We also detected, with the reporter plasmids technique, a decreased activity of c-NHEJ in aged donors. It has been described that 53BP1 acts with faster kinetics [20–22] and its rapid positioning at the break site along with its effector protein RIF1 impedes end resection and promotes c-NHEJ repair during G1 [17]. Therefore, the impaired recruitment of 53BP1 could alter the triggering of the repair and translate into a defective c-NHEJ repair.

The deficient recruitment of 53BP1 to DSBs is not due to its depletion in ADs, as there were no age-associated differences in the total amount of this protein between the two age groups. However, other factors related to DSB signalling or to the chromatin environment could be responsible for the impaired recruitment of 53BP1 to DSB sites with age. Ataxia-Telangiectasia Mutated (ATM) kinase is involved in 53BP1 activation, since after DSBs induction by IR, ATM phosphorylates 53BP1 [54]. Nonetheless, it was previously described that the ATM-dependent phosphorylation of 53BP1 is necessary for RIF1 recruitment [17,23–26], but not for 53BP1 accumulation at DSB sites to form foci [55], thus discarding ATM as the source of deficient 53BP1 recruitment. The accumulation of 53BP1 at DSB sites is dependent on a biochemical pathway controlled by the RNF8 and RNF168 E3 ubiquitin ligases that generate ubiquitin marks in histone H2A [56–58]. BRCA1 recruitment to DSBs also depends on the ubiquitin marks generated by RNF8 and RNF168, and thus a defect on this biochemical pathway with age would affect both 53BP1 and BRCA1 accumulation at DSBs. Given that BRCA1 shows no deficient foci formation at DSBs in HMEC cells, we discard that a failure in this pathway might be the cause of 53BP1 impaired recruitment in cells from aged women. Finally, epigenetic changes affecting both DNA and histones are associated with age [59,60] and could influence 53BP1 recruitment to DSBs. In this regard, changes in the acetylation state of the Lys16 of histone H4 seem to directly influence 53BP1 association

to DNA and thus the repair by c-NHEJ [61]. Nonetheless, further work will be needed to explore all of these possibilities and confirm the exact mechanism that renders 53BP1 unavailable to DSBs in aging cells.

Given the antagonistic role of 53BP1 and BRCA1 in the DSB repair pathway choice, it is not surprising that an impaired recruitment of 53BP1 in ADs would have consequences in the dynamics of BRCA1. While the recruitment of BRCA1 was not affected by age in G2 cells, we observed an increased formation of ectopic BRCA1 foci in G1 cells from ADs. Ectopic BRCA1 foci formation in G1 was previously reported after inhibition of 53BP1 [17] and recent reports have described an increased formation of BRCA1 and CtIP foci in G1 after the depletion of 53BP1 or RIF1 [62]. In the present work 53BP1 is not depleted in cells from ADs, but it is absent from as much as 40% of the radiation-induced DSBs, giving room to BRCA1 to occupy these breaks. All of these results evidence the mutually exclusive relationship between BRCA1/CtIP and 53BP1/RIF1 tandems, which ultimately determine the DSB repair machinery loaded onto the DSB.

The increased frequency of BRCA1 foci in G1 cells from ADs was concomitant with an increased frequency of CtIP foci. Despite the fact that from the S to G2 stages CtIP activation is directly regulated by CDKs, CtIP in G1 cells can be phosphorylated by Polo-like kinase 3 (PLK3) [62,63]. In fact, CtIP activity has been observed in Ku-depleted cells in G1 [63]. Additionally, not only CtIP, but also RPA foci formation in AD cells indicates that long stretches of ssDNA are generated in G1 in the absence of 53BP1, suggesting that extensive DNA end resection has taken place in some DSBs in G1 cells. If CtIP initiates end resection in these breaks, c-NHEJ could no longer operate. Also, launching HR in G1 cells is not possible due to the absence of a homologous repair template together with the inhibition of the assembly of the BRCA1-PALB2-BRCA2 complex by CDKs [64]. Thus, RAD51 was not loaded in G1 cells from ADs and the HR repair pathway does not process DSBs in G1 that suffered end resection.

While neither c-NHEJ nor HR operated in 53BP1-free DSBs in G1 cells from ADs, DNA breaks were being repaired as only a small fraction of DSBs remain unrepaired a long time after irradiation (Anglada et al., in press). It is tempting to speculate that these DSBs are repaired by an alternative repair mechanism such as the Alt-EJ, which shares an initial step of DNA end resection mediated by CtIP and MRE11 prior to the ligation of the DNA ends with HR [46,65]. The Alt-EJ can operate both in the G1 and G2 phases of the cell cycle [66] and also in cells with functional c-NHEJ and HR pathways [65]. Contrary

to c-NHEJ, Alt-EJ has been described as requiring a greater degree of end resection prior to the ligation of the DNA ends that often results in extensive losses, additions or alterations of the sequence at the DSB junction. Also, Alt-EJ functions with slower kinetics, thus increasing the probability of illegitimate repair [66], which are scenarios that are compatible with those observed in aged donors.

Given all of the results, we present a model for DSB repair pathway choice in HMECs from aged women (Figure 7). Upon induction of DSBs in YD cells, 53BP1 is recruited in the G1 phase and promotes c-NHEJ. Instead, AD cells fail to efficiently recruit 53BP1 to DSBs. The absence of 53BP1 in G1 DSBs allows their ectopic occupancy by BRCA1, followed by CtIP mediated end resection. Because the c-NHEJ pathway is inhibited by extensive end resection of breaks and HR cannot be launched in G1, these DSBs most probably become substrates for alternative DSB repair mechanisms like Alt-EJ. Thus, we propose that the age-associated repair defect in HMECs relies on the antagonism between 53BP1 and BRCA1 proteins that probably shift the DNA-DSB repair pathway choice to more mutagenic repair mechanisms. We speculate that the age-associated ectopic activity of BRCA1/CtIP could account for the increased accumulation of genome rearrangements typically observed in aged tissues. CtIP has oncogenic properties due to its implication in the Alt-EJ pathway, and has been associated with chromosomal instability and the generation of aberrant chromosomal rearrangements [67]. Also, CtIP has recently been targeted as an oncogene implicated in mammary tumorigenesis in a mouse model, as CtIP ablation or inactivation efficiently reduced tumorigenesis [68]. The present work contributes to evidence the role that many DNA repair proteins display connecting genome integrity maintenance to aging. Future efforts addressing the mechanism to counteract BRCA1/CtIP activity during the G1 phase due to 53BP1 absence in cells from older individuals could result in a tool of interest. This would permit normalization of DNA repair efficiency during aging to avoid a rise in genomic instability in older individuals, as well as delay aging and treat age-associated diseases such as cancer in adulthood.

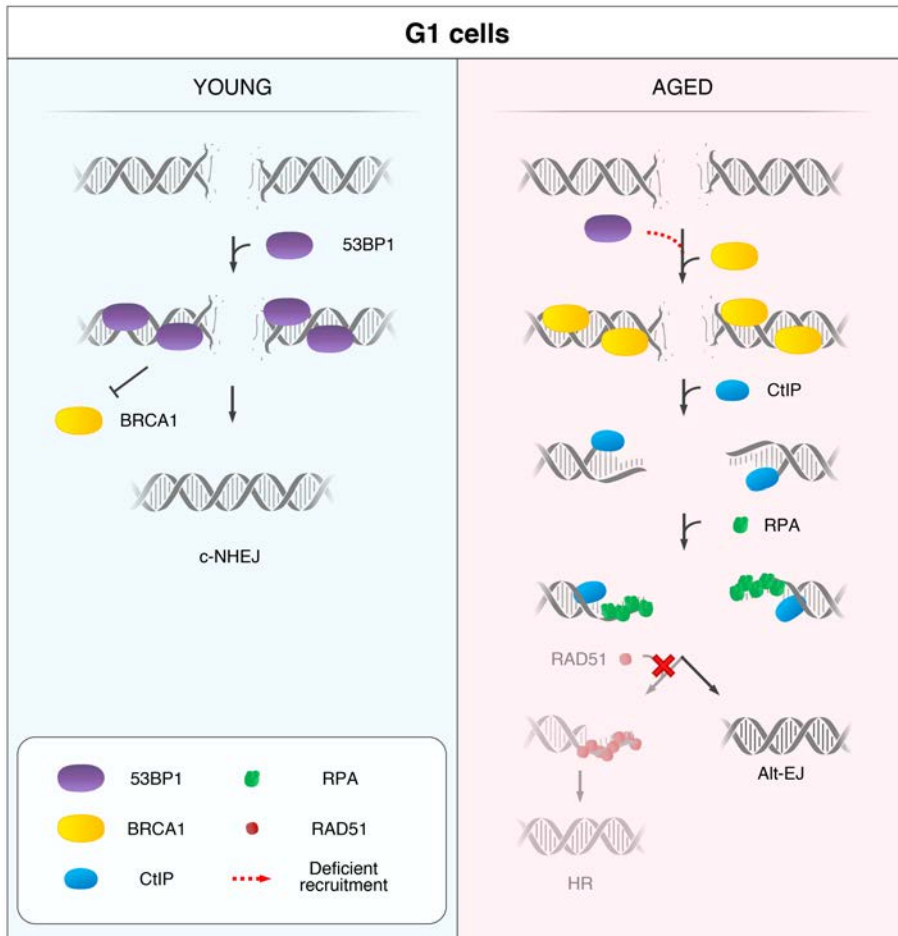


Figure 7. Model for the age-related shift in the DSB repair pathway choice in G1 cells.

In response to DSB induction, 53BP1 is recruited to the break site in G1 cells from YDs and promotes the repair by c-NHEJ. Instead, in G1 AD cells, the deficient recruitment of 53BP1 to some DSBs permits the ectopic recruitment of BRCA1. CtIP-mediated end resection and RPA coating of the ssDNA follow BRCA1 foci formation. However, RAD51 loading is inhibited in G1 cells and HR cannot be launched. Thus, these DSBs from ADs that have suffered end resection in G1 become substrates for alternative DSB repair mechanisms, such as Alt-EJ.

METHODS

1. Cell culture

Finite lifespan pre-stasis HMECs were obtained from reduction mammoplasty of 11 donors: 48R (16 yo), 240L (19 yo), 168R (19 yo), 184 (21 yo), 59L (23 yo), 123 (27 yo), 153L (60 yo), 112R (61 yo), 122L (66 yo), 29 (68 yo) and 429ER (72 yo); and one peripheral non-tumour containing mastectomy tissue of one donor: 353P (72 yo). Donors were classified depending on their age into young donors (YDs, < 27 years) and aged donors (ADs, > 60 years). When referring to donors, the age group is followed by specimen identification and the age of the donor. HMECs were cultured as pre-stasis strains using M87A medium with cholera toxin and oxytocin according to previously reported methods [69], with the addition of 100 U/ml penicillin and 100 µg/ml streptomycin. U2OS cells were cultured with DMEM and Ham's F10 medium at 1:1 and supplemented with 10% FBS and penicillin/streptomycin. Cells were kept in the incubator at 37°C and 5% CO₂ atmosphere.

2. Irradiation

Micro-localized DNA damage was induced as described in Suzuki et al. (2011) [50]. Briefly, cells were labelled with 10 µm BrdU for 48 h. Just before the irradiation medium was removed, cells were briefly rinsed with PBS and covered with a Whatman™ Cyclopore™ Polycarbonate membrane (Whatman, Maidstone, UK) with pores of 5 µm in diameter. Cells were exposed to 15J m⁻² of UVC light at a dose rate of 1J m⁻² s⁻¹. After exposure, free-BrdU medium was added and cells were incubated at 37°C and 5% CO₂ for 15–60 min. Whole cell irradiation was performed by exposing cells to 5 Gy of γ-rays using an IBL-437C R-137 Cs irradiator at a dose rate of 5.10 Gy/min.

3. Immunofluorescence

HMECs were fixed during 15 min with 4% PFA, permeabilized with 1x PBS-0.5% Triton-X-100 solution for 20 min and blocked with 1x PBS-0.5% BSA-0.15% glycine for 15 min. For RAD51 and CtIP labelling, cells were also fixed with ice-cold methanol for 30 min after PFA, permeabilized with ice-cold acetone for 1 min and blocked with 1x PBS-1% FBS-5% BSA. After the blocking step, primary antibodies (listed in the Supplementary Information) were incubated overnight at 4°C. After three washes with 1x PBS-0.1% Tween20 or PBS-1% FBS, the secondary antibodies anti-Rb A488 and anti-Mouse A594 (Supplementary Information) were incubated for 1 h at room temperature. If a third

protein was detected (CENPF), secondary antibodies from the other two were re-incubated to occupy the maximum number epitopes before anti-CENPF was incubated overnight at 4°C. The secondary antibody for CENPF was then incubated for 20 min at room temperature. Finally, all samples were washed, briefly rinsed with distilled water, underwent progressive alcohol dehydration and counterstained with 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) at a final concentration of 0.25 µg/ml in Vectashield Mounting Medium (Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA, USA). Analysis and image acquisition were performed using an Olympus BX61 epifluorescent microscope (Olympus, Hamburg, Germany) equipped with a CV-M4+CL camera (JAI, Grosswallstadt, Germany) and Cytovision software (Applied Imaging, Newcastle, UK).

4. Western Blot

HMECs were washed with cold PBS and stored at -80°C upon all samples were collected. Cells were lysed in RIPA buffer (50mM Tris-HCl pH 8, 1% sodium deoxycholate, 150 mM sodium chloride, 20 mM sodium fluoride, 1% Triton-X-100, 1 mM EDTA, 0.1% SDS, DTT 1 mM, 20 mM b-glycerolphosphate, 1 mM Na ortovanadate and protease inhibitor cocktail (Roche, Basilea, Switzerland)) and sonicated. The protein concentration was measured using a Pierce™ BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) and 25 µg of total protein was loaded onto a 7.5% acrylamide TGX Stain-Free gel or a 10% Bis-Tris gel. After electrophoresis, proteins were transferred to a PVDF membrane. After a blocking step with 5% BSA or 5% of non-fat milk for 1 h, primary antibodies (Supplementary Information) were incubated overnight at 4°C. After three washing steps with TTBS (Tris 20 mM, NaCl 150 mM, and 0.1% Tween20), secondary antibodies (Supplementary Information) were incubated for 1 h at room temperature. Chemiluminescent detection was performed after incubation with Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrate (Millipore, Madrid, Spain) and using a ChemiDoc™ Touch Imaging System (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). For reprobing, a mild stripping solution (1.5% glycine, 0.1% SDS, 1% Tween20) adjusted to pH 2.2 was used for antibodies with the same host species or alternatively, an incubation in 30% H₂O₂ was applied for reprobing with antibodies with different host species.

5. Transfection with DNA repair reporter plasmids and flow cytometric analysis

To measure c-NHEJ and HR repair activity, 40,000 cells from an exponentially growing culture were seeded onto 12-well plates. When properly attached, cells were transfected with 0.5 µg of reporter pimEJ5GFP (Addgene #44026) or pDRGFP (Addgene #26475)

and with 0.5 µg of the I-SceI-expressing plasmid pCBASceI (Addgene #26477) or with an empty vector pCAGGS (kind gift from Surrallés' and Jasin's laboratories) for the negative control. For the positive control, cells were transfected with 0.5 µg of the GFP-expressing plasmid NZE-GFP (kind gift from Surrallés' and Jasin's laboratories). The mix of DNA was prepared in OptiMEM medium and then mixed in a 1:4 proportion with Eugene® HD transfection reagent (Promega, Madison, WI, USA) following the manufacturer's instructions. Transfection mix was added to cells in 1 ml of antibiotic free medium and incubated for 13 h at 37°C and 5% CO₂ atmosphere. The percentage of GFP-positive cells was measured by flow cytometry with a FACS Calibur cytometer (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA) at 40 h after transfection. FlowJo software (v10.0.7; FlowJo LLC, Ashland, OR, USA) was used for gate adjusting and plot representation. The threshold of GFP-negative cells was determined for each donor with values from cells transfected with the pCAGGS empty vector. To compare activity levels of each repair pathway between donors, the fluorescent value obtained for each reporter was normalized with the transfection efficiency with the GFP-expressing plasmid NZE-GFP. At least two independent transfections with the reporter plasmids and with their respective controls were performed for each donor.

6. Cell cycle by flow cytometry

A cell cycle analysis was performed as described elsewhere [70]. Briefly, after trypsinization, cells were fixed in ethanol and stored at -20°C. After all samples were collected, cells were stained with PI staining solution (0.1% Triton-X-100 in PBS, 0.2 mg/ml DNase-free RNase A and 0.02 mg/ml of propidium iodide). After 30 min of incubation at room temperature, fluorescence intensity was measured using a FACS Calibur cytometer (Becton Dickinson) and analysed using FlowJo software.

7. Statistical analysis

The data we obtained was analysed using Microsoft Excel (Microsoft® Excel® 2011, v14.1, Redmond, Washington, USA). The statistical analysis was performed using GraphPad Prism 7 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA) with methods indicated in the results where applicable. For the hierarchical cluster analysis, the Ward method was applied [71] using R software (version 3.4.4, Vienna, Austria).

SUPPLEMENTARY INFORMATION

List of antibodies used.

Antibody	Host	Reference	Working dilution	
			IF	WB
Primary antibodies				
Anti-53BP1	Rabbit	Abcam, ab21083	1:2000	1:1000
Anti-BRCA1	Mouse	Abcam, ab16781, clone MS13	1:500	1:500
Anti-CENPF	Rabbit	Abcam, ab90, clone 14C10/1D8	1:1000	-
Anti-CtIP	Mouse	Millipore, MABE1060, clone 14-1	1:500	-
Anti-Integrin β 1	Rabbit	Abcam, ab52971	-	1:1000
Anti-Ku70	Rabbit	Abcam, ab83501	-	1:3000
Anti-Rad51	Rabbit	Abcam, ab63801	1:15000	1:2000
Anti-RPA32/RPA2	Mouse	Abcam, ab2175, clone 9H8	1:500	1:1000
Anti- γ H2AX (Ser139)	Mouse	Millipore, 05-636, clone JBW301	1:1000	-
Anti- γ H2AX (Ser139)	Rabbit	Abcam, ab81299, clone EP854(2)Y	1:500	-
Secondary antibodies				
Anti-mouse HRP conjugate	Goat	Millipore, 12-349	-	1:5000
Anti-mouse Alexa Fluor® 488	Goat	Jackson ImmunoResearch Inc., 115-545-205	1:500	-
Anti-mouse Cyanine Cy™3	Goat	Jackson ImmunoResearch Inc., 115-165-146	1:800	-
Anti-rabbit HRP conjugate	Goat	Millipore, 12-384	-	1:5000
Anti-rabbit Alexa Fluor® 488	Goat	Thermo Fisher Scientific, A-11034	1:500	-
Anti-rabbit Alexa Fluor® 532	Goat	Thermo Fisher Scientific, A-11009	1:1000	-
Anti-rabbit Alexa Fluor® 594	Goat	Thermo Fisher Scientific, A-11037	1:500	-

ACKNOWLEDGMENTS

Special thanks to Martha Stampfer and Mark LaBarge (Lawrence Berkeley National Laboratory) for providing HMEC samples and advise on cell culture. Our sincere acknowledge to Jordi Surrallés and Jordi Minguillón (*Universitat Autònoma de Barcelona*) for their help with the plasmid reporter assay. We thank Eduard ESCRICH (*Universitat Autònoma de Barcelona*) for the material, equipment and advice with the western blot assay. We also acknowledge Pablo Huertas (CABIMER, Sevilla) for providing the CtIP antibody and critical advice. We gratefully acknowledge Joan Repullés for his help with our figure design and creation.

CONFLICTS OF INTEREST

The authors declare that they have no conflicts of interest.

FUNDING

The AG and MM laboratory is funded by *Consejo de Seguridad Nuclear, Generalitat de Catalunya* (2017-SGR-503) and *Fundación Dexeus Salud de la Mujer* 2016 grants. TA has been a beneficiary of FI-DGR 2015-2017 (*Generalitat de Catalunya*) and *Universitat Autònoma de Barcelona* PhD program fellowships.

REFERENCES

1. Mandavilli BS, Rao KS. Accumulation of DNA Damage in Aging Neurons Occurs Through a Mechanism Other than Apoptosis. *J Neurochem.* 1996; 67: 1559–65.
2. Dollé MET, Giese H, Hopkins CL, Martus H-J, Hausdorff JM, Vijg J. Rapid accumulation of genome rearrangements in liver but not in brain of old mice. *Nat Genet.* 1997; 17: 431–4.
3. Sedelnikova OA, Horikawa I, Zimonjic DB, Popescu NC, Bonner WM, Barrett JC. Senescing human cells and ageing mice accumulate DNA lesions with unreparable double-strand breaks. *Nat Cell Biol.* 2004; 6: 168–70.
4. Sedelnikova OA, Horikawa I, Redon C, Nakamura A, Zimonjic DB, Popescu NC, Bonner WM. Delayed kinetics of DNA double-strand break processing in normal and pathological aging. *Aging Cell.* 2008; 7: 89–100.
5. Kalfalah F, Seggewiß S, Walter R, Tigges J, Moreno-Villanueva M, Bürkle A, Ohse S, Busch H, Boerries M, Hildebrandt B, Royer-Pokora B, Boege F. Structural chromosome abnormalities, increased DNA strand breaks and DNA strand break repair deficiency in dermal fibroblasts from old female human donors. *Aging (Albany NY).* 2015; 7: 110–22.
6. Goto M. Hierarchical deterioration of body systems in Werner's syndrome: Implications for normal ageing. *Mech Ageing Dev.* 1997; 98: 239–54.
7. Vogel H, Lim D-S, Karsenty G, Finegold M, Hasty P. Deletion of Ku86 causes early onset of senescence in mice. *Proc Natl Acad Sci.* 1999; 96: 10770–5.
8. Bohr VA. Human premature aging syndromes and genomic instability. *Mech Ageing Dev.* 2002; 123: 987–93.
9. Espejel S, Martín M, Klatt P, Martín-Caballero J, Flores JM, Blasco MA. Shorter telomeres, accelerated ageing and increased lymphoma in DNA-PKcs-deficient mice. *EMBO Rep.* 2004; 5: 503–9.
10. Vyjayanti VN, Rao KS. DNA double strand break repair in brain: Reduced NHEJ activity in aging rat neurons. *Neurosci Lett.* 2006; 393: 18–22.
11. Vaidya A, Mao Z, Tian X, Spencer B, Seluanov A, Gorbunova V. Knock-In Reporter Mice Demonstrate that DNA Repair by Non-homologous End Joining Declines with Age. *PLoS Genet.* 2014; 10: e1004511.
12. Gorbunova V, Seluanov A. DNA double strand break repair, aging and the chromatin connection. *Mutat Res - Fundam Mol Mech Mutagen.* 2016; 788: 2–6.

13. Li Z, Zhang W, Chen Y, Guo W, Zhang J, Tang H, Xu Z, Zhang H, Tao Y, Wang F, Jiang Y, Sun FL, Mao Z. Impaired DNA double-strand break repair contributes to the age-associated rise of genomic instability in humans. *Cell Death Differ.* 2016; 23: 1765–77.
14. Chapman JR, Taylor MRG, Boulton SJ. Playing the End Game: DNA Double-Strand Break Repair Pathway Choice. *Mol Cell.* 2012; 47: 497–510.
15. Hustedt N, Durocher D. The control of DNA repair by the cell cycle. *Nat Cell Biol.* 2017; 19: 1–9.
16. Her J, Bunting SF. How cells ensure correct repair of DNA double-strand breaks. *J Biol Chem.* 2018; 293: 10502–11.
17. Escribano-Díaz C, Orthwein A, Fradet-Turcotte A, Xing M, Young JTF, Tkáč J, Cook MA, Rosebrock AP, Munro M, Canny MD, Xu D, Durocher D. A Cell Cycle-Dependent Regulatory Circuit Composed of 53BP1-RIF1 and BRCA1-CtIP Controls DNA Repair Pathway Choice. *Mol Cell.* 2013; 49: 872–83.
18. Panier S, Boulton SJ. Double-strand break repair: 53BP1 comes into focus. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2014; 15: 7–18.
19. Bakr A, Köcher S, Volquardsen J, Reimer R, Borgmann K, Dikomey E, Rothkamm K, Mansour WY. Functional crosstalk between DNA damage response proteins 53BP1 and BRCA1 regulates double strand break repair choice. *Radiother Oncol.* 2016; 119: 276–81.
20. Schultz LB, Chehab NH, Malikzay A, Halazonetis TD. p53 Binding Protein 1 (53BP1) Is an Early Participant in the Cellular Response to DNA Double-Strand Breaks. *J Cell Biol.* 2000; 151: 1381–90.
21. Anderson L, Henderson C, Adachi Y. Phosphorylation and Rapid Relocalization of 53BP1 to Nuclear Foci upon DNA Damage. *Mol Cell Biol.* 2001; 21: 1719–29.
22. Rappold I, Iwabuchi K, Date T, Chen J. Tumor Suppressor p53 Binding Protein 1 (53BP1) Is Involved in DNA Damage–signaling Pathways. *J Cell Biol.* 2001; 153: 613–20.
23. Chapman JR, Barral P, Vannier J-B, Borel V, Steger M, Tomas-Loba A, Sartori AA, Adams IR, Batista FD, Boulton SJ. RIF1 Is Essential for 53BP1-Dependent Nonhomologous End Joining and Suppression of DNA Double-Strand Break Resection. *Mol Cell.* 2013; 49: 858–71.
24. Zimmermann M, Lottersberger F, Buonomo SB, Sfeir A, de Lange T. 53BP1 Regulates DSB Repair Using Rif1 to Control 5' End Resection. *Science.* 2013; 339: 700–4.
25. Di Virgilio M, Callen E, Yamane A, Zhang W, Jankovic M, Gitlin AD, Feldhahn N, Resch W, Oliveira TY, Chait BT, Nussenzweig A, Casellas R, Robbiani DF, et al. Rif1 Prevents Resection of DNA Breaks and Promotes Immunoglobulin Class Switching. *Science.* 2013; 339: 711–5.

26. Feng L, Fong K-W, Wang J, Wang W, Chen J. RIF1 Counteracts BRCA1-mediated End Resection during DNA Repair. *J Biol Chem*. 2013; 288: 11135–43.
27. Callen E, Di Virgilio M, Kruhlak MJ, Nieto-Soler M, Wong N, Chen HT, Faryabi RB, Polato F, Santos M, Starnes LM, Wesemann DR, Lee JE, Tubbs A, et al. 53BP1 mediates productive and mutagenic DNA repair through distinct phosphoprotein interactions. *Cell*. 2013; 153: 1266–80.
28. Yu X, Chen J. DNA Damage-Induced Cell Cycle Checkpoint Control Requires CtIP, a Phosphorylation-Dependent Binding Partner of BRCA1 C-Terminal Domains. *Mol Cell Biol*. 2004; 24: 9478–86.
29. Huertas P, Jackson SP. Human CtIP Mediates Cell Cycle Control of DNA End Resection and Double Strand Break Repair. *J Biol Chem*. 2009; 284: 9558–65.
30. Ferretti LP, Lafranchi L, Sartori AA. Controlling DNA-end resection: a new task for CDKs. *Front Genet*. 2013; 4: 1–7.
31. Li S, Ting NSY, Zheng L, Chen P-L, Ziv Y, Shiloh Y, Lee EY-HP, Lee W-H. Functional link of BRCA1 and ataxia telangiectasia gene product in DNA damage response. *Nature*. 2000; 406: 210–5.
32. Sartori AA, Lukas C, Coates J, Mistrik M, Fu S, Bartek J, Baer R, Lukas J, Jackson SP. Human CtIP promotes DNA end resection. *Nature*. 2007; 450: 509–14.
33. Chen L, Nievera CJ, Lee AY-L, Wu X. Cell Cycle-dependent Complex Formation of BRCA1-CtIP-MRN Is Important for DNA Double-strand Break Repair. *J Biol Chem*. 2008; 283: 7713–20.
34. Yun MH, Hiom K. CtIP-BRCA1 modulates the choice of DNA double-strand-break repair pathway throughout the cell cycle. *Nature*. 2009; 459: 460–3.
35. Chapman JR, Sossick AJ, Boulton SJ, Jackson SP. BRCA1-associated exclusion of 53BP1 from DNA damage sites underlies temporal control of DNA repair. *J Cell Sci*. 2012; 125: 3529–34.
36. Isono M, Niimi A, Oike T, Hagiwara Y, Sato H, Sekine R, Yoshida Y, Isobe S-Y, Obuse C, Nishi R, Petricci E, Nakada S, Nakano T, et al. BRCA1 Directs the Repair Pathway to Homologous Recombination by Promoting 53BP1 Dephosphorylation. *Cell Rep*. 2017; 18: 520–32.
37. Shibata A, Moiani D, Arvai AS, Perry J, Harding SM, Genoia M-M, Maity R, van Rossum-Fikkert S, Kertokallio A, Romoli F, Ismail A, Ismalaj E, Petricci E, et al. DNA Double-Strand Break Repair Pathway Choice Is Directed by Distinct MRE11 Nuclease Activities. *Mol Cell*. 2014; 53: 7–18.
38. Symington LS. Mechanism and regulation of DNA end resection in eukaryotes. *Crit Rev Biochem Mol Biol*. 2016; 51: 195–212.

39. Heyer W-D, Ehmsen KT, Liu J. Regulation of Homologous Recombination in Eukaryotes. *Annu Rev Genet.* 2010; 44: 113–39.
40. Mazón G, Mimitou EP, Symington LS. SnapShot: Homologous recombination in DNA double-strand break repair. *Cell.* 2010; 142: 646, 646.e1.
41. Roth DB, Proctor GN, Stewart LK, Wilson JH. Oligonucleotide capture during end joining in mammalian cells. *Nucleic Acids Res.* 1991; 19: 7201–5.
42. Little KCE, Chartrand P. Genomic DNA is captured and amplified during double-strand break (DSB) repair in human cells. *Oncogene.* 2004; 23: 4166–72.
43. Difilippantonio MJ, Zhu J, Chen HT, Meffre E, Nussenzweig MC, Max EE, Ried T, Nussenzweig A. DNA repair protein Ku80 suppresses chromosomal aberrations and malignant transformation. *Nature.* 2000; 404: 510–4.
44. Deriano L, Roth DB. Modernizing the Nonhomologous End-Joining Repertoire: Alternative and Classical NHEJ Share the Stage. *Annu Rev Genet.* 2013; 47: 433–55.
45. Ceccaldi R, Rondinelli B, D'Andrea AD. Repair Pathway Choices and Consequences at the Double-Strand Break. *Trends Cell Biol.* 2016; 26: 52–64.
46. Sallmyr A, Tomkinson AE. Repair of DNA double-strand breaks by mammalian alternative end-joining pathways. *J Biol Chem.* 2018; 293: 10536–46.
47. Ju Y-J, Lee K-H, Park J-E, Yi Y-S, Yun M-Y, Ham Y-H, Kim T-J, Choi HM, Han GJ, Lee J-H, Lee J, Han JS, Lee K-M, et al. Decreased expression of DNA repair proteins Ku70 and Mre11 is associated with aging and may contribute to the cellular senescence. *Exp Mol Med.* 2006; 38: 686–93.
48. Seluanov A, Danek J, Hause N, Gorbunova V. Changes in the level and distribution of Ku proteins during cellular senescence. *DNA Repair.* 2007; 6: 1740–8.
49. Titus S, Li F, Stobezki R, Akula K, Unsal E, Jeong K, Dickler M, Robson M, Moy F, Goswami S, Oktay K. Impairment of BRCA1-Related DNA Double-Strand Break Repair Leads to Ovarian Aging in Mice and Humans. *Sci Transl Med.* 2013; 5: 172ra21.
50. Suzuki K, Yamauchi M, Oka Y, Suzuki M, Yamashita S. Creating localized DNA double-strand breaks with microirradiation. *Nat Protoc.* 2011; 6: 134–9.
51. Shibata A, Conrad S, Birraux J, Geuting V, Barton O, Ismail A, Kakarougkas A, Meek K, Taucher-Scholz G, Löbrich M, Jeggo PA. Factors determining DNA double-strand break repair pathway choice in G2 phase. *EMBO J.* 2011; 30: 1079–92.

52. Jin Y, Xu XL, Yang M-CW, Wei F, Ayi T-C, Bowcock AM, Baer R. Cell cycle-dependent colocalization of BARD1 and BRCA1 proteins in discrete nuclear domains. *Proc Natl Acad Sci.* 1997; 94: 12075–80.
53. 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.
54. Munoz IM, Jowsey PA, Toth R, Rouse J. Phospho-epitope binding by the BRCT domains of hPTIP controls multiple aspects of the cellular response to DNA damage. *Nucleic Acids Res.* 2007; 35: 5312–22.
55. Harding SM, Bristow RG. Discordance between phosphorylation and recruitment of 53BP1 in response to DNA double-strand breaks. *Cell Cycle.* 2012; 11: 1432–44.
56. Doil C, Mailand N, Bekker-Jensen S, Menard P, Larsen DH, Pepperkok R, Ellenberg J, Panier S, Durocher D, Bartek J, Lukas J, Lukas C. RNF168 Binds and Amplifies Ubiquitin Conjugates on Damaged Chromosomes to Allow Accumulation of Repair Proteins. *Cell.* 2009; 136: 435–46.
57. Al-Hakim A, Escribano-Diaz C, Landry M-C, O'Donnell L, Panier S, Szilard RK, Durocher D. The ubiquitous role of ubiquitin in the DNA damage response. *DNA Repair.* 2010; 9: 1229–40.
58. Panier S, Durocher D. Push back to respond better: regulatory inhibition of the DNA double-strand break response. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2013; 14: 661–72.
59. Booth LN, Brunet A. The Aging Epigenome. *Mol Cell.* 2016; 62: 728–44.
60. Sen P, Shah PP, Nativio R, Berger SL. Epigenetic Mechanisms of Longevity and Aging. *Cell.* 2016; 166: 822–39.
61. Tang J, Cho NW, Cui G, Manion EM, Shanbhag NM, Botuyan MV, Mer G, Greenberg RA. Acetylation limits 53BP1 association with damaged chromatin to promote homologous recombination. *Nat Struct Mol Biol.* 2013; 20: 317–25.
62. Bakr A, Köcher S, Volquardsen J, Petersen C, Borgmann K, Dikomey E, Rothkamm K, Mansour WY. Impaired 53BP1/RIF1 DSB mediated end-protection stimulates CtIP-dependent end resection and switches the repair to PARP1-dependent end joining in G1. *Oncotarget.* 2016; 7: 57679–93.
63. Barton O, Naumann SC, Diemer-Biehs R, Künzel J, Steinlage M, Conrad S, Makharashvili N, Wang J, Feng L, Lopez BS, Paull TT, Chen J, Jeggo PA, et al. Polo-like kinase 3 regulates CtIP during DNA double-strand break repair in G1. *J Cell Biol.* 2014; 206: 877–94.
64. Orthwein A, Noordermeer SM, Wilson MD, Landry S, Enchev RI, Sherker A, Munro M, Pinder J, Salsman J, Delliare G, Xia B, Peter M, Durocher D. A mechanism for the suppression of homologous recombination in G1 cells. *Nature.* 2015; 528: 422–6.

65. Truong LN, Li Y, Shi LZ, Hwang PY-H, He J, Wang H, Razavian N, Berns MW, Wu X. Microhomology-mediated End Joining and Homologous Recombination share the initial end resection step to repair DNA double-strand breaks in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci.* 2013; 110: 7720–5.
66. Iliakis G, Murmann T, Soni A. Alternative end-joining repair pathways are the ultimate backup for abrogated classical non-homologous end-joining and homologous recombination repair: Implications for the formation of chromosome translocations. *Mutat Res/Toxicol Environ Mutagen.* 2015; 793: 166–75.
67. Zhang Y, Jasin M. An essential role for CtIP in chromosomal translocation formation through an alternative end-joining pathway. *Nat Struct Mol Biol.* 2011; 18: 80–4.
68. Reczek CR, Shakya R, Miteva Y, Szabolcs M, Ludwig T, Baer R. The DNA resection protein CtIP promotes mammary tumorigenesis. *Oncotarget.* 2016; 7: 32172–83.
69. Garbe JC, Bhattacharya S, Merchant B, Bassett E, Swisshelm K, Feiler HS, Wyrobek AJ, Stampfer MR. Molecular Distinctions between Stasis and Telomere Attrition Senescence Barriers Shown by Long-term Culture of Normal Human Mammary Epithelial Cells. *Cancer Res.* 2009; 69: 7557–68.
70. Darzynkiewicz Z, Juan G, Bedner E. Determining Cell Cycle Stages by Flow Cytometry. *Current Protocols in Cell Biology.* 1999. 8.4.1-8.4.18.
71. Everitt BS, Landau S, Leese M, Stahl D. *Cluster Analysis.* 5th ed. Quality and Quantity. 2011. 348 p.

Discussió

En els últims anys hi ha hagut una creixent evidència sobre la possible implicació de les vies de reparació dels DSBs en l'increment de la inestabilitat genòmica associada a l'envelliment. No obstant, la falta d'evidències que puguin establir una causalitat directa i l'obtenció de resultats poc concloents, o fins i tot contradictoris en alguns estudis, ha impedit arribar a un consens general al respecte. A més, la desconeixença del mecanisme o mecanismes responsables de la possible disminució en l'eficiència de la reparació dels DSBs amb l'edat, ha dificultat l'avenç del coneixement en aquest àmbit.

El present treball descriu un defecte associat a l'edat en el reclutament de 53BP1 als DSBs, que impacta sobre l'elecció de la via de reparació. Degut a l'antagonisme entre les proteïnes 53BP1 i BRCA1 que determina l'elecció de la via de reparació del trencament, la deficiència en el reclutament de 53BP1 desvia la reparació cap a mecanismes més mutagènics que podrien afavorir l'increment de reorganitzacions potencialment oncogèniques observades en organismes envellits i que, en general, suposen una font d'inestabilitat genòmica.

1. Valoració del model cel·lular d'envelliment

Les HMEC pre-*stasis* utilitzades en els dos treballs inclosos en aquesta tesi, suposen un bon model per estudiar l'envelliment cronològic en humans, ja que provenen de donants sanes de diferents edats. Treballar amb cèl·lules envellides *in situ* i amb un nombre baix de PDs en cultiu permet estudiar els processos biològics que es donen a l'organisme, reduint la interferència de factors associats al cultiu *in vitro*. A més, la coexistència de cèl·lules dels llinatges mioepitelial i luminal en les mostres utilitzades i els canvis en la seva proporció en funció de l'edat, són un reflex fidel de l'ambient en què es troben aquestes cèl·lules a la glàndula mamària i dels canvis que es produeixen en aquesta durant l'envelliment (Garbe et al. 2012).

El medi de cultiu M87A+X suposa un important avantatge respecte les formulacions anteriors, ja que redueix les condicions d'estrès i perllonga el període pre-*stasis* (Garbe et al. 2009). Tot i així, les HMECs continuen sotmeses a un cert nivell d'estrès *in vitro*, tal i com demostra l'increment progressiu en la proporció de cèl·lules amb morfologia senescent i positives per l'activitat beta-galactosidasa, característiques pròpies de l'*stasis* (Garbe et al. 2009; Campisi 2013). La selecció d'aquells PDs amb un percentatge de cèl·lules senescent inferior al 10% per totes les donants permet reduir el nombre de cèl·lules senescent portadores de DSBs associats al procés de senescència (Sedelnikova

et al. 2004), però alhora limita la quantitat de PDs disponibles per obtenir cèl·lules per dur a terme els experiments aquí descrits, requerint molta organització per expandir el nombre de cèl·lules sense incrementar excessivament el nombre de passis. A més a més, i degut a les divisions que han patit les cèl·lules a l'organisme de la donant, no podem descartar que s'hagi produït un cert grau d'escurçament telomèric que pugui correspondre a algun dels DSBs basals en les donants grans.

En definitiva, tot i les limitacions tècniques pel que fa a la quantitat de mostra i a la necessitat de planificació experimental, aquestes cèl·lules provinents de donants joves i grans que han passat molt poc temps en cultiu *in vitro* són un bon model d'envelliment biològic, adequat per l'estudi dels possibles canvis associats a l'edat que puguin afectar l'eficiència dels mecanismes de reparació dels DSBs.

2. Deficiència en el reclutament de 53BP1 associada a l'edat

La utilització de les HMECs pre-stasis provinents de donants joves i d'edat avançada ha permès detectar un reclutament deficient de 53BP1 als DSBs radioinduïts associat a l'edat de les donants. 53BP1 no és considerada una proteïna pròpia de la c-NHEJ perquè actua abans que les proteïnes efectores d'aquesta via. No obstant això, diversos treballs han demostrat que la deficiència en 53BP1 té efectes sobre la via de la c-NHEJ. El treball de Nakamura i col·laboradors (2006) va demostrar que la deleció de 53BP1 en cèl·lules DT40 donava lloc a hipersensibilitat a la radiació ionitzant a la fase G1, un efecte molt similar al de la deleció de Ku70, una proteïna efectora essencial de la c-NHEJ. A més, l'associació de 53BP1 al DNA a G1 promou la reparació per la via de la c-NHEJ (Escribano-Díaz et al. 2013; Panier i Boulton 2014), participa en la recombinació V(D)J i és essencial per la CSR (*class-switch recombination*) (Manis et al. 2004; Ward et al. 2004; Difilippantonio et al. 2008; Bothmer et al. 2011; Zimmermann i de Lange 2014), tots ells processos fisiològics de generació de DSBs que després són reparats per la via de la c-NHEJ. Per tant, d'aquests resultats es desprèn el paper crític de 53BP1 en la reparació dels DSBs per la via de c-NHEJ.

En aquest sentit, la disminució en l'activitat de la c-NHEJ detectada en les HMECs de donants grans mitjançant l'assaig amb el plàsmid reporter, és probablement resultat de la deficiència en el reclutament de 53BP1 als DSBs. De fet, existeix una correlació positiva significativa entre el reclutament de 53BP1 als DSBs i l'activitat de la c-NHEJ a les cèl·lules de les diferents donants. D'aquesta manera, les cèl·lules de donants grans, que

presenten un reclutament de 53BP1 deficient, són també les que mostren una menor activitat de la via c-NHEJ. L'associació entre el defecte en la c-NHEJ i l'envelliment està d'acord amb estudis realitzats en ratolins, en què s'ha descrit que la mutació de proteïnes involucrades en la c-NHEJ, com Ku o DNA-PKcs, resulten en una manifestació prematura de característiques típiques d'envelliment en els organismes afectats (Li et al. 2007; Espejel et al. 2004).

L'observada disminució en la c-NHEJ associada al defecte en el reclutament de 53BP1 sembla cursar amb un retard en l'inici de la reparació en les cèl·lules de donants grans, que es va posar de manifest en quantificar el nombre de foci de γ H2AX després de l'exposició de les HMECs a radiació ionitzant (primer treball d'aquesta tesi). Cal tenir en compte que el recompte de foci de γ H2AX es va restringir a cèl·lules que es trobaven a la fase G1 per tal de reduir la variabilitat que mostra el marcatge de γ H2AX a les diferents fases del cicle cel·lular. Per tant, el defecte en l'inici de la reparació a G1 ha d'estar relacionat amb una disfunció que afecti la via predominant de reparació en aquest estadi, que és la c-NHEJ. Aquesta via actua de manera ràpida en resposta a la inducció de DSBs (Mao et al. 2008; Löbrich i Jeggo 2017) i, en canvi, al nostre primer treball demostrem que l'acumulació d'aquests trencaments es manifesta dins la primera hora després de l'exposició, el que identifiquem com un '*delayed firing*' de la resposta al dany en cèl·lules de donants grans. Les dades obtingudes del recompte de foci de γ H2AX s'ajusten molt bé a la modelització matemàtica quan s'afegeix la variable 'retard en l'inici de la reparació' per les donants grans, permetent validar l'observació. A més, el nombre de foci residuals de γ H2AX (a les 24h pIR) en les diferents donants correlaciona negativament tant amb el reclutament de 53BP1 com amb l'activitat de la c-NHEJ, suggerint que la deficiència en el reclutament de 53BP1 i en l'engegada de la c-NHEJ contribueixen a l'acumulació de DSBs no reparats. No obstant, no podem descartar que altres factors involucrats en la reparació dels DSBs pateixin alteracions amb l'edat que també puguin contribuir a l'acumulació de dany residual observada.

Existeix, per tant, una estreta relació entre el reclutament de 53BP1 als DSBs radioinduits, l'activitat de la via c-NHEJ i el nombre de foci de γ H2AX a diferents temps pIR, paràmetres que varien de manera coordinada en funció de l'edat de les donants. En exposar les HMECs de dones grans a radiació ionitzant hi ha reducció en el reclutament de 53BP1 als DSBs, fet que es tradueix en una disminució en l'activitat d'aquesta via c-NHEJ. Donat que és la via de reparació que actua de manera més ràpida, la seva

deficiència es manifesta amb un retard en l'inici de la resolució dels DSBs afectats que, alhora, podria estar contribuint a l'acumulació de dany no reparat en aquestes cèl·lules. Finalment, i d'acord amb tot el que s'ha exposat, 53BP1 apareix com un marcador prometedora d'envelliment, tal i com demostra l'anàlisi de clústers realitzada, amb la que s'obtenen dues agrupacions de donants que coincideixen perfectament amb els dos grups d'edat.

2.1. Origen del defecte en el reclutament de 53BP1

El reclutament de 53BP1 als DSBs radioinduits incrementa entre els 15 i els 30 minuts i posteriorment s'estabilitza, arribant a una fase de *plateau* dins la primera hora. Aquests resultats confirmen el ràpid reclutament de 53BP1 descrit per altres autors (Schultz et al. 2000; Anderson et al. 2001; Rappold et al. 2001) i alhora indiquen que 53BP1 és reclutada a la majoria dels trencaments dins aquest període, tant en donants joves com en grans. No és d'estranyar que dins el període analitzat no tots els foci de γ H2AX es trobin ocupats per 53BP1. Segons les dades obtingudes a partir de l'anàlisi del cicle cel·lular, al voltant d'un 10% de les cèl·lules, independentment de l'edat de les donants, es troben en G2/M i, per tant, poden reparar els DSBs per la via de la HR, independent de 53BP1.

Tot i que el patró de reclutament de 53BP1 als DSBs radioinduits sigui similar per cèl·lules de donants joves i grans, arribant a la fase *plateau* dins la primera hora post-irradiació, la fracció de DSBs que en què s'ha reclutat 53BP1 és inferior en les HMECs de donants grans a tots els temps analitzats. La disminució en el reclutament de 53BP1 als DSBs radioinduits en les HMECs de donants grans es podria deure a diversos factors com ara problemes a nivell de senyalització del dany al DNA, disminució en la quantitat de proteïnes implicades en la reparació del DNA que puguin actuar als DSBs o bé característiques estructurals de la cromatina que impedeixin el seu correcte reclutament al lloc del dany.

Un defecte en la detecció dels DSBs comportaria una disminució en la resposta al dany en el DNA. Davant la generació d'un DSB, el complex sensor del dany MRN és ràpidament reclutat al lloc del trencament i participa en l'activació d'ATM, que juntament amb DNA-PKcs, fosforila la histona H2AX. Per tant, una deficiència en la detecció del dany es traduiria en una disminució o en un defecte en la fosforilació de la H2AX. Tanmateix, els nostres resultats demostren que la formació de foci de γ H2AX no

està alterada amb l'edat, ja que les cèl·lules de donants grans formen foci de γ H2AX en el mateix temps i en més quantitat que les cèl·lules de donants joves, tant a nivell basal com als diferents temps post-irradiació. Aquests resultats concorden amb els obtinguts en altres laboratoris (Sedelnikova et al. 2008; Rbe et al. 2011; Kalfalah et al. 2015; Li et al. 2016) i descarten que les HMECs de donants grans presentin un problema en la detecció de les lesions induïdes al DNA.

ATM és la cinasa encarregada d'activar a 53BP1 en resposta al dany fosforilant els llocs Ser/Thr-Gln del seu extrem N-terminal. Una deficiència d'ATM associada a l'edat comportaria una disminució en la fosforilació de 53BP1. No obstant, aquesta modificació no és necessària per al reclutament de 53BP1 en sí (Harding i Bristow 2012), sinó per a la seva funció i per al reclutament i activació, per part de 53BP1, de la proteïna RIF1 (Chapman et al. 2013; Escribano-Díaz et al. 2013; Zimmermann et al. 2013; Di Virgilio et al. 2013; Feng et al. 2013). Per tant, també descartem la contribució d'ATM al defecte en el reclutament de 53BP1 associat a l'edat.

Després de la formació de foci de γ H2AX, la cascada d'ubiquitinacions a les histones H2A per la via RNF8/RNF168 està implicada en diverses respostes de la DDR, incloent l'activació dels punts de control del cicle cel·lular, la inhibició de la transcripció i la remodelació de la cromatina, a més de participar en la reparació del DNA mitjançant el reclutament de diverses proteïnes (Goodarzi i Jeggo 2013). Més concretament, les marques d'ubiquitina resultants són reconegudes tant per 53BP1 com per BRCA1 i per tant, les alteracions en aquesta via haurien d'afectar al reclutament d'ambdues proteïnes. A diferència de 53BP1, els resultats obtinguts pel que fa al reclutament de BRCA1 a G2 no mostren cap alteració associada a l'envelliment i, per tant, descartem que alteracions en la via RNF siguin les responsables del deficient reclutament de 53BP1 en les donants grans.

La quantitat de proteïnes de reparació disponibles seria un altre factor que podria influir en el seu reclutament amb l'edat, però els estudis publicats fins ara no proporcionen resultats consistents. Alguns treballs han detectat una disminució associada a l'edat en els nivells de diverses proteïnes involucrades en les diferents vies de reparació de les lesions del DNA (revisat a Gorbunova et al. 2007). Pel que fa a les proteïnes que participen en la c-NHEJ, Seluanov i col·laboradors (2007) van detectar una disminució tant en els nivells de Ku70 com de Ku80 en fibroblasts senescents humans. No obstant, Ju i col·laboradors (2006) van observar una disminució associada a l'edat en els nivells

de MRE11 i Ku70, però no de Ku80, en mostres de limfòcits provinents de persones de diferents edats. Més recentment, Li i col·laboradors (2016) no van detectar diferències significatives ni en els nivells de Ku70 ni de Ku80 en fibroblasts de persones grans. En canvi, si que van detectar una reducció de XRCC4 i DNA lligasa IV, proteïnes involucrades en un estadi més avançat de la c-NHEJ. Per tant, sembla ser que el tipus cel·lular és un factor determinant en l'alteració dels nivells de proteïnes pertanyents a la via c-NHEJ amb l'envelliment. L'anàlisi dels nivells de diverses proteïnes de reparació en les HMECs mostren que, tot i haver-hi variabilitat entre les diferents donants analitzades, no hi ha una tendència a la disminució dels nivells basals de 53BP1 associada a l'edat, descartant que la deficiència en el reclutament de 53BP1 sigui deguda a un reducció del seu nivell d'expressió. De la mateixa manera, i en concordança amb els resultats de Li i col·laboradors (2016), tampoc s'han trobat diferències en els nivells de Ku70 associades a l'edat de les donants, descartant que la disminució en l'activitat de la via c-NHEJ en les HMECs de donants grans sigui deguda a canvis en els nivells d'aquesta proteïna, essencial en la via de reparació.

Canvis en l'estructura de la cromatina associats a l'edat podrien dificultar l'accés de 53BP1 als DSBs. Al llarg de la vida, les cèl·lules estan sotmeses a modificacions epigenètiques que comporten alteracions en el patró de metilació del DNA, en les modificacions post-traduccionals de les histones i que suposen la remodelació de la cromatina (Fraga i Esteller 2007; Talens et al. 2012; Booth i Brunet 2016; Sen et al. 2016). 53BP1 és reclutada als DSBs mitjançant el reconeixement de H4K20me2. L'acetilació d'aquesta mateixa histona a la lisina 16 (H4K16ac) impedeix el reconeixement de la marca de metilació i, en conseqüència, dificulta l'accés de 53BP1 al DSB (Hsiao i Mizzen 2013). És per això, que en resposta a la generació d'un DSB es requereix de l'acció de les histones desacetilases per desacetilar la H4K16 i facilitar la unió 53BP1 a la zona del trencament. Per tant, una disminució en els nivells d'aquestes desacetilases comportaria una hiperacetilació de la H4K16 i dificultaria el reclutament de 53BP1. En aquest sentit, s'ha vist que els nivells d'algunes histones desacetilases, com SIRT1, estan disminuïts tant en cèl·lules senescents com en ratolins envellits (Sasaki et al. 2006). Així mateix, la disminució en l'expressió de SIRT1 dona lloc a un fenotip d'envelliment accelerat en ratolins (Sommer et al. 2006) i la seva sobreexpressió augmenta l'esperança de vida d'aquests animals (Satoh et al. 2013). Per tant, una disminució de la desacetilació de la H4K16 associada a l'edat, podria ser un factor que contribuís a la deficiència en el reclutament de 53BP1 als DSBs radioinduits amb l'edat.

No obstant això, es requereixen més treballs que descriguin l'estat de la cromatina amb l'envelliment així com les alteracions epigenètiques que l'acompanyen per poder establir la seva relació amb el reclutament de 53BP1. La caracterització epigenètica d'aquelles regions en què, tot i haver-hi un DSB, 53BP1 no és reclutada, permetria explorar l'origen d'aquesta deficiència en les HMECs de donants d'edat avançada.

3. El reclutament de BRCA1 a G2 no es troba alterat amb l'envelliment

Mentre que el reclutament de 53BP1 es troba disminuït amb l'edat de les donants, el reclutament de BRCA1 a la fase G2 és similar en HMECs provinents de donants joves i grans. BRCA1 és reclutada al DNA de manera dependent del cicle cel·lular (Chen et al. 2008; Huertas i Jackson 2009). A mesura que la cèl·lula progressa per les fases S/G2, són les CDKs les que indueixen la formació i activació del complex BRCA1/CtIP i, juntament amb la PP4C, promouen la defosforilació de 53BP1, la dissociació de RIF1 de 53BP1 i el reposicionament de 53BP1, excloent-la de la zona del trencament i permetent el reclutament de BRCA1 (Chapman et al. 2012a; Kakarougkas et al. 2013; Isono et al. 2017).

L'estudi del reclutament de BRCA1 als DSBs radioinduits en les HMECs en G2 va mostrar una dinàmica similar a l'observada per al reclutament de 53BP1: el percentatge de foci de γ H2AX ocupats per BRCA1 incrementava al llarg dels primers 30 minuts i posteriorment s'estabilitzava. No obstant, durant la primera hora post-irradiació, BRCA1 no es trobava ocupant la totalitat dels foci de γ H2AX induïts a les cèl·lules en G2, independentment de l'edat de la donant. Això no és d'estranyar ja que a S/G2, 53BP1 pot ser reclutada i fosforilada per part d'ATM abans de ser exclosa de la zona del trencament, promovent així la reparació dels DSBs més simples per la via de la c-NHEJ (Chanut et al. 2016; Shibata et al. 2011; Shibata et al. 2014; Isono et al. 2017). BRCA1 és reclutada als DSBs que no han iniciat la reparació i als que, per la seva complexitat, requereixen d'un grau de processament superior al que es genera en la via de la cNHEJ. Per tant, el fet que no tots els DSBs generats a la fase G2 es trobin ocupats per BRCA1 no és indicatiu d'un defecte en el seu reclutament, sinó del ràpid inici de la reparació en alguns trencaments i de la coexistència de la c-NHEJ i la HR en les fases S/G2 del cicle. És més, el reclutament de BRCA1 a G2 és similar per totes les donants independentment de la seva edat, la qual cosa ens permet descartar que independentment de quin sigui el factor que dificulta el reclutament de 53BP1 amb l'edat, aquest no afecta el reclutament de BRCA1, almenys a la fase G2.

Un cop BRCA1 és reclutada al lloc del trencament promou la resecció dels extrems trencats del DNA i, a les etapes S/G2, dirigeix la reparació principalment cap a la via HR (Escribano-Díaz et al. 2013; Ceccaldi et al. 2016). Així ho demostra un estudi amb cèl·lules mare embrionàries de ratolí en què la deficiència de BRCA1 dona lloc a una reducció en la formació de foci de RAD51 així com a una deficiència en la reparació per la via de la HR (Moynahan et al. 1999). Pel que fa a les HMECs, l'assaig del plàsmid reporter va mostrar una disminució en l'activitat d'aquesta via en les cèl·lules de dones grans. Aquesta deficiència no estaria relacionada amb una alteració en el reclutament de BRCA1 en aquestes cèl·lules, ni tampoc amb una disminució en els nivells totals de proteïna, tal com demostra l'anàlisi dels nivells de proteïna mitjançant western blot. Per tant, la disminució en l'activitat de la HR associada a l'edat podria ser deguda a una deficiència en la funcionalitat de la pròpia BRCA1 o a l'alteració d'altres proteïnes efectores implicades en la HR. En aquest sentit vam observar una reducció en el nombre de foci de γ H2AX ocupats per RAD51 a les 4h pIR, indicant que hi ha una reducció en la fracció de DSBs reparats per la via de la HR en donants grans. Li i col·laboradors (2016) van utilitzar línies de fibroblasts provinents de persones d'entre 16 i 75 anys i també van detectar, utilitzant un sistema de plàsmids reporters per la via HR, una disminució en l'activitat d'aquesta via associada a l'edat. Igual que en el nostre estudi, l'anàlisi de western blot en els fibroblasts va mostrar que no hi havia diferències en els nivells d'expressió de les principals proteïnes implicades en la HR, entre les que s'inclouen BRCA1 i RAD51. Finalment, els autors van detectar un retard en el reclutament de la proteïna RAD51 als DSBs mitjançant el recompte de foci de RAD51 a diferents temps post-irradiació. Tot i que la quantificació dels foci de RAD51 en HMECs suggereix un defecte similar, caldria mesurar la formació de foci de RAD51 a diferents temps post-inducció del dany per poder confirmar que la reducció observada en l'activitat de la via HR en les HMECs de donants grans pot ser deguda a un problema en el reclutament d'aquesta proteïna.

4. L'antagonisme 53BP1/BRCA1 en l'elecció de la via de reparació dels DSBs i el seu paper en l'envelliment

Independentment de quina sigui la causa del reclutament deficient de 53BP1 als DSBs en les HMECs de donants d'edat avançada, aquesta no dificulta el reclutament de BRCA1 a la fase G2. La conseqüència directa del defecte en el reclutament de 53BP1 associat a l'edat és una clara reducció en la reparació dels DSBs per la via de la c-NHEJ. No

obstant, les dades de la quantificació del nombre de foci de γ H2AX ens indiquen que, si bé és cert que el quantitat de DSBs residuals és superior en les cèl·lules de dones d'edat avançada, a les 24h pIR són pocs els DSBs radioinduits que romanen sense reparar. Per tant, si la majoria dels DSBs originats en cèl·lules en G1 de dones grans han sigut reparats, tot i fer-ho amb un cert retard, quin és el mecanisme responsable de la reparació d'aquells DSBs en què no s'ha reclutat 53BP1?

En resposta a la generació dels DSBs, 53BP1 és fosforilada i reclutada a la zona del trencament, permetent al seu torn el reclutament de la proteïna RIF1, que bloqueja la unió de BRCA1 al DSB, establint l'antagonisme entre 53BP1 i BRCA1 (Escribano-Díaz et al. 2013). Tant el reclutament de 53BP1 com la fosforilació del seu domini terminal per part d'ATM són crucials per al reclutament de RIF1 (Chapman et al. 2013; Escribano-Díaz et al. 2013; Zimmermann et al. 2013; Di Virgilio et al. 2013; Feng et al. 2013) ja que, el *knockdown* de 53BP1 impedeix la formació de foci de RIF1 als DSBs (Bakr et al. 2016). Per tant, l'absència física de 53BP1 d'alguns DSBs durant la G1 impediria el reclutament de RIF1, deixant la zona del trencament accessible a BRCA1. L'increment en la formació de foci ectòpics de BRCA1 en HMECs en G1 provinents de donants d'edat avançada està d'acord amb aquesta hipòtesi. Tot i que no hem pogut observar la mútua exclusió de BRCA1/53BP1 a G1 per la dificultat tècnica que suposa la detecció simultània de γ H2AX, 53BP1, BRCA1 i CENPF, el sumatori de colocalització de 53BP1 o de BRCA1 amb γ H2AX suposa al voltant del 100%, en totes les donants analitzades, independentment de la seva edat. Aquests resultats suggereixen que tots els DSBs acaben essent ocupats o bé per 53BP1 o bé per BRCA1.

La formació de foci de BRCA1 en cèl·lules en G1 és un fenomen poc comú. Al 2013, Escribano-Díaz i col·laboradors van descriure que el silenciament de l'expressió de 53BP1 amb un siRNA en cèl·lules U2OS donava lloc a l'aparició de foci ectòpics de BRCA1 en cèl·lules en G1, 1h després de ser exposades a 10Gy. Pocs anys després, Bakr i col·laboradors (2016) descrivien la formació de foci de BRCA1 en cèl·lules A594 en G1 exposades a 2Gy després de silenciar l'expressió de 53BP1 o de RIF1. En aquest últim estudi no només es va observar un increment en la formació de foci de BRCA1 a G1 en les A594, sinó també un increment en la formació de foci de CtIP i RPA, indicant que s'induïa una resecció extensa del DNA a G1 en absència tant de 53BP1 com de RIF1. De manera similar, a les HMECs de donants grans no només hem observat un increment en la freqüència de foci ectòpics de BRCA1 en cèl·lules en G1, sinó que en aquestes

mateixes cèl·lules també hem observat un increment en la freqüència de CtIP i RPA. Tot i que en les HMECs no hi ha hagut un silenciament de 53BP1, el defecte en el reclutament de 53BP1 associat a l'envelliment tindria unes conseqüències semblants.

El reclutament de CtIP als DSBs és activat a S/G2 de manera dependent del cicle per les CDKs (Huertas i Jackson 2009), però recentment s'ha descrit un nou mecanisme dependent de la PLK3 (Polo-like kinase 3) responsable de la fosforilació i l'activació de l'activitat endonucleasa de CtIP a la fase G1 (Barton et al. 2014; Bakr et al. 2016). L'inici de la resecció dels extrems trencats del DNA en les cèl·lules en S/G2 per part de CtIP suposa el bloqueig de la via de la c-NHEJ, ja que ATM és desplaçada de la zona del trencament, i 53BP1 deixa de ser fosforilada i reconeguda per RIF1 (Bakr et al. 2016). D'aquesta manera, els DSBs a S/G2, un cop reseccionats els seus extrems, són dirigits cap a la HR, però, quin és el mecanisme que s'ocupa de la reparació dels DSBs reseccionats a G1?

La HR no pot actuar a la fase G1 perquè el reclutament de BRCA2 i, per tant, el seu assemblatge amb BRCA1 i PALB2, està bloquejat de manera dependent del cicle (Orthwein et al. 2015). Aquest assemblatge és requerit per al reclutament de RAD51 i la formació del complex BRCA1-D (Zhang et al. 2009; Sy et al. 2009), involucrat en el reemplaçament d'RPA per RAD51 i en la invasió del ssDNA protuberant a la cromàtide germana. Coherentment amb això, no observem un increment en el reclutament de RAD51 als DSBs de cèl·lules en G1 de donants grans. Si els trencaments que han patit resecció no són reparats per la via de la HR, però la freqüència de DSBs que romanen sense reparar a les 24 hores pIR és baixa, hi ha vies alternatives que estan reparant aquestes lesions. En relació amb això, Bakr i col·laboradors (2016) van demostrar que els trencaments de les cèl·lules en G1 que havien patit resecció per CtIP eren processats per Alt-EJ, ja que en tractar les cèl·lules A594 que presentaven la deleció de 53BP1 amb un inhibidor de PARP1, aquestes acumulaven una major freqüència de foci residuals de γ H2AX.

El processament requerit per a la reparació dels DSBs per la via de la Alt-EJ fa que sigui més lenta que la c-NHEJ (Löbrich i Jeggo 2017), coincidint amb el retard en l'inici de la reparació de foci de γ H2AX observat en les donants grans. La taxa de desaparició de foci de γ H2AX entre el moment immediatament després de l'exposició de les HMECs a 1Gy i 1h pIR és superior per les cèl·lules de donants joves. En canvi, entre 1 i 2h després de la irradiació, aquesta taxa és superior en les cèl·lules de dones grans. Tanmateix, aquesta

dada no indica que les donants de més edat reparin millor, sinó que reflecteix l'inici retardat en la reparació, probablement a conseqüència de la reparació d'alguns DSBs per la via Alt-EJ.

La resecció dels extrems trencats del DNA per part de CtIP i la seva posterior lligació per la via de la Alt-EJ pot donar lloc a reorganitzacions cromosòmiques (Simsek i Jasin 2010; Zhang i Jasin 2011), un tipus d'alteració genòmica que s'ha vist incrementada en organismes envellits (Moskalev et al. 2013). Per tant, les anomalies que es deriven de la Alt-EJ suposen un increment en la inestabilitat genòmica i són una font potencial de càncer (Sallmyr i Tomkinson 2018). De fet, Reczek i col·laboradors (2016), utilitzant un model de càncer de mama en ratolins, van observar que la inactivació de CtIP reduïa la cinètica de desenvolupament de tumors en ratolins deficients per p53, demostrant així que CtIP tindria propietats oncogèniques. Per tant, la resecció per part de CtIP observada en les HMECs de donants grans podria afavorir la formació de reorganitzacions cromosòmiques potencialment oncogèniques.

Una desviació -associada a l'envelliment- en la tria de la via de reparació de DSBs radioinduits cap a mecanismes més mutagènics, té conseqüències especialment perilloses en aquelles persones grans que, per qüestions ocupacionals, es troben exposades de forma perllongada a baixes dosis de radiació. S'ha descrit un increment en la taxa relativa de càncer en excés associada a l'edat en persones que han estat exposades de manera continuada a baixes dosis de radiació (Richardson i Wing 1999; Krestinina et al. 2005; Preston et al. 2016). Per altra banda, si l'envelliment comporta una disminució en l'eficiència de la reparació del DNA, caldria tenir en consideració l'edat a l'hora de sotmetre les persones a processos diagnòstics i terapèutics que utilitzen la radiació, ja que cada vegada són més les persones grans sotmeses a aquests processos amb efecte acumulatiu (Fazel et al. 2009). No obstant, la radiosensibilitat varia entre persones i també varia en funció de l'edat (Kato et al. 2011; Schuster et al. 2018), per tant, disposar d'un bon marcador d'envelliment cel·lular relacionat amb l'eficiència de les vies de reparació podria resultar de gran utilitat per a la protecció radiològica de les persones. En aquest sentit, l'acumulació de foci residuals de γ H2AX correlaciona amb la radiosensibilitat (Taneja et al. 2004) i es considera un marcador d'envelliment (Siddiqui et al. 2015). Així mateix, proposem 53BP1 com a marcador d'envelliment cel·lular ja que és indicatiu de l'eficiència de les vies de reparació i podria ser utilitzat juntament

amb el marcatge de γ H2AX com a marcador predictiu d'instabilitat genòmica i radiosensibilitat associada amb l'edat.

Aquesta tesi suposa un avenç en el coneixement de la contribució de l'eficiència de les vies de reparació dels DSBs a l'increment d'instabilitat genòmica associada a l'envelliment. En futurs treballs caldria comprovar que el defecte en el reclutament de 53BP1 i l'increment en la reparació mediada per BRCA1 i CtIP a G1 que s'han observat en les HMECs de donants grans ocorren de manera generalitzada en altres teixits humans. Així mateix aquest treball obre la porta a explorar les causes del reclutament deficient de 53BP1 amb l'edat i a aprofundir sobre la possible implicació de la Alt-EJ en la reparació dels DSBs en persones grans. Conèixer les bases moleculars que acompanyen el procés d'envelliment proporciona eines per endarrerir la vellesa i millorar la qualitat de vida en aquesta etapa de la vida. Així mateix, permet identificar possibles dianes en el tractament de les malalties associades a l'envelliment, com ara el càncer.

Conclusions

1. Tant la freqüència basal de DSBs com la de trencaments a diferents temps post-irradiació és superior en les HMECs provinents de donants d'edat avançada que en les de donants joves.
2. La cinètica de reparació de DSBs a les donants d'edat avançada manifesta un retard en l'inici de la reparació que molt probablement contribueix al defecte de reparació de DSBs d'aquestes donants.
3. L'activitat de les principals vies de reparació de DSBs, la c-NHEJ i la HR, es troba disminuïda en les HMECs provinents de donants d'edat avançada.
4. No s'observen canvis associats a l'edat en els nivells basals de les proteïnes implicades en la reparació per la via c-NHEJ (53BP1, Ku70), ni en els de proteïnes de la via HR (BRCA1, RPA, RAD51).
5. Hi ha una deficiència en el reclutament de 53BP1 als DSBs radioinduits en les HMECs de donants grans. En canvi, el reclutament de BRCA1 als DSBs radioinduits en cèl·lules en G2 és similar en les HMECs provinents de donants joves i d'edat avançada.
6. En donants grans hi ha un reclutament ectòpic de BRCA1 als DSBs radioinduits en G1. En aquestes cèl·lules també hi ha un increment en la formació de foci de CtIP i RPA però no RAD51. Per tant, en una fracció de DSBs a la fase G1, el DNA de la zona del trencament pateix resecció, però aquests DSBs no són finalment reparats per la via de la HR.

Bibliografia

A

- Ahnesorg, P., Smith, P., i Jackson, S. P. (2006). XLF Interacts with the XRCC4-DNA Ligase IV Complex to Promote DNA Nonhomologous End-Joining. *Cell*, 124(2), 301–313. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.12.031>
- Al-Hakim, A., Escribano-Diaz, C., Landry, M.-C., O'Donnell, L., Panier, S., Szilard, R. K., i Durocher, D. (2010). The ubiquitous role of ubiquitin in the DNA damage response. *DNA Repair*, 9(12), 1229–1240. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2010.09.011>
- Anderson, L., Henderson, C., i Adachi, Y. (2001). Phosphorylation and Rapid Relocalization of 53BP1 to Nuclear Foci upon DNA Damage. *Molecular and Cellular Biology*, 21(5), 1719–1729. <https://doi.org/10.1128/MCB.21.5.1719-1729.2001>
- Aparicio, T., Baer, R., i Gautier, J. (2014). DNA double-strand break repair pathway choice and cancer. *DNA Repair*, 19, 169–175. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2014.03.014>
- Atamna, H., Cheung, I., i Ames, B. N. (2000). A method for detecting abasic sites in living cells: Age-dependent changes in base excision repair. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(2), 686–691. <https://doi.org/10.1073/pnas.97.2.686>

B

- Bakr, A., Köcher, S., Volquardsen, J., Petersen, C., Borgmann, K., Dikomey, E., ... Mansour, W. Y. (2016). Impaired 53BP1/RIF1 DSB mediated end-protection stimulates CtIP-dependent end resection and switches the repair to PARP1-dependent end joining in G1. *Oncotarget*, 7(36), 57679–57693. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.11023>
- Barton, O., Naumann, S. C., Diemer-Biehs, R., Künzel, J., Steinlage, M., Conrad, S., ... Löbrich, M. (2014). Polo-like kinase 3 regulates CtIP during DNA double-strand break repair in G1. *The Journal of Cell Biology*, 206(7), 877–894. <https://doi.org/10.1083/jcb.201401146>
- Bebenek, K., Pedersen, L. C., i Kunkel, T. a. (2014). Structure–Function Studies of DNA Polymerase λ . *Biochemistry*, 53(17), 2781–2792. <https://doi.org/10.1021/bi4017236>
- Bennardo, N., Cheng, A., Huang, N., i Stark, J. M. (2008). Alternative-NHEJ Is a Mechanistically Distinct Pathway of Mammalian Chromosome Break Repair. *PLoS Genetics*, 4(6), e1000110. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1000110>

- Beucher, A., Birraux, J., Tchouandong, L., Barton, O., Shibata, A., Conrad, S., ... Löbrich, M. (2009). ATM and Artemis promote homologous recombination of radiation-induced DNA double-strand breaks in G2. *The EMBO Journal*, 28(21), 3413–3427. <https://doi.org/10.1038/emboj.2009.276>
- Blackford, A. N., i Jackson, S. P. (2017). ATM, ATR, and DNA-PK: The Trinity at the Heart of the DNA Damage Response. *Molecular Cell*, 66(6), 801–817. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2017.05.015>
- Blier, P. R., Griffith, A. J., Craft, J., i Hardin, J. A. (1993). Binding of Ku protein to DNA. Measurement of affinity for ends and demonstration of binding to nicks. *The Journal of Biological Chemistry*, 268(10), 7594–7601. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8463290>
- Bohr, V. A. (2002). Human premature aging syndromes and genomic instability. *Mechanisms of Ageing and Development*, 123(8), 987–993. [https://doi.org/10.1016/S0047-6374\(02\)00039-8](https://doi.org/10.1016/S0047-6374(02)00039-8)
- Bolognesi, C., Abbondandolo, A., Barale, R., Casalone, R., Dalprà, L., De Ferrari, M., ... Bonassi, S. (1997). Age-related increase of baseline frequencies of sister chromatid exchanges, chromosome aberrations, and micronuclei in human lymphocytes. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*, 6(4), 249–256.
- Booth, L. N., i Brunet, A. (2016). The Aging Epigenome. *Molecular Cell*, 62(5), 728–744. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2016.05.013>
- Bothmer, A., Robbiani, D. F., Di Virgilio, M., Bunting, S. F., Klein, I. A., Feldhahn, N., ... Nussenzweig, M. C. (2011). Regulation of DNA End Joining, Resection, and Immunoglobulin Class Switch Recombination by 53BP1. *Molecular Cell*, 42(3), 319–329. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2011.03.019>
- Brenner, A. J., Stampfer, M. R., i Aldaz, C. M. (1998). Increased p16 expression with first senescence arrest in human mammary epithelial cells and extended growth capacity with p16 inactivation. *Oncogene*, 17(2), 199–205. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1201919>
- Britton, S., Coates, J., i Jackson, S. P. (2013). A new method for high-resolution imaging of Ku foci to decipher mechanisms of DNA double-strand break repair. *The Journal of Cell Biology*, 202(3), 579–595. <https://doi.org/10.1083/jcb.201303073>
- Bussard, K. M., i Smith, G. H. (2011). The Mammary Gland Microenvironment Directs Progenitor Cell Fate In Vivo. *International Journal of Cell Biology*, 2011, 1–11. <https://doi.org/10.1155/2011/451676>
- Busuttil, R. A., Garcia, A. M., Reddick, R. L., Dollé, M. E. T., Calder, R. B., Nelson, J. F., i Vijg, J. (2007). Intra-Organ Variation in Age-Related Mutation Accumulation in the Mouse. *PLoS ONE*, 2(9), e876. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0000876>

C

- Campisi, J. (2013). Aging, Cellular Senescence, and Cancer. *Annual Review of Physiology*, 75(1), 685–705. <https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-030212-183653>
- Campisi, J., i d'Adda di Fagagna, F. (2007). Cellular senescence: when bad things happen to good cells. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 8(9), 729–740. <https://doi.org/10.1038/nrm2233>
- Cantor, S. B., Bell, D. W., Ganesan, S., Kass, E. M., Drapkin, R., Grossman, S., ... Livingston, D. M. (2001). BACH1, a Novel Helicase-like Protein, Interacts Directly with BRCA1 and Contributes to Its DNA Repair Function. *Cell*, 105(1), 149–160. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(01\)00304-X](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(01)00304-X)
- Ceccaldi, R., Rondinelli, B., i D'Andrea, A. D. (2016). Repair Pathway Choices and Consequences at the Double-Strand Break. *Trends in Cell Biology*, 26(1), 52–64. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2015.07.009>
- Cesare, A. J., i Reddel, R. R. (2010). Alternative lengthening of telomeres: models, mechanisms and implications. *Nature Reviews Genetics*, 11(5), 319–330. <https://doi.org/10.1038/nrg2763>
- Chang, H. H. Y., i Lieber, M. R. (2016). Structure-Specific nuclease activities of Artemis and the Artemis: DNA-PKcs complex. *Nucleic Acids Research*, 44(11), 4991–4997. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw456>
- Chang, H. H. Y., Pannunzio, N. R., Adachi, N., i Lieber, M. R. (2017). Non-homologous DNA end joining and alternative pathways to double-strand break repair. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 18(8), 495–506. <https://doi.org/10.1038/nrm.2017.48>
- Chang, H. H. Y., Watanabe, G., i Lieber, M. R. (2015). Unifying the DNA End-processing Roles of the Artemis Nuclease. *Journal of Biological Chemistry*, 290(40), 24036–24050. <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.680900>
- Chanut, P., Britton, S., Coates, J., Jackson, S. P., i Calsou, P. (2016). Coordinated nuclease activities counteract Ku at single-ended DNA double-strand breaks. *Nature Communications*, 7, 12889. <https://doi.org/10.1038/ncomms12889>
- Chapman, J. R., Barral, P., Vannier, J.-B., Borel, V., Steger, M., Tomas-Loba, A., ... Boulton, S. J. (2013). RIF1 Is Essential for 53BP1-Dependent Nonhomologous End Joining and Suppression of DNA Double-Strand Break Resection. *Molecular Cell*, 49(5), 858–871. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2013.01.002>
- Chapman, J. R., Sossick, A. J., Boulton, S. J., i Jackson, S. P. (2012a). BRCA1-associated exclusion of 53BP1 from DNA damage sites underlies temporal control of DNA repair. *Journal of Cell Science*, 125(15), 3529–3534. <https://doi.org/10.1242/jcs.105353>

- Chapman, J. R., Taylor, M. R. G., i Boulton, S. J. (2012b). Playing the End Game: DNA Double-Strand Break Repair Pathway Choice. *Molecular Cell*, 47(4), 497–510. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2012.07.029>
- Chen, J.-H., Hales, C. N., i Ozanne, S. E. (2007). DNA damage, cellular senescence and organismal ageing: causal or correlative? *Nucleic Acids Research*, 35(22), 7417–7428. <https://doi.org/10.1093/nar/gkm681>
- Chen, L., Nievera, C. J., Lee, A. Y.-L., i Wu, X. (2008). Cell Cycle-dependent Complex Formation of BRCA1·CtIP·MRN Is Important for DNA Double-strand Break Repair. *Journal of Biological Chemistry*, 283(12), 7713–7720. <https://doi.org/10.1074/jbc.M710245200>
- Chen, L., i Oshima, J. (2002). Werner Syndrome. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2(2), 46–54. <https://doi.org/10.1155/S1110724302201011>
- Ciccía, A., i Elledge, S. J. (2010). The DNA Damage Response: Making It Safe to Play with Knives. *Molecular Cell*, 40(2), 179–204. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2010.09.019>
- Coppede, F., i Migliore, L. (2010). DNA Repair in Premature Aging Disorders and Neurodegeneration. *Current Aging Science*, 3(1), 3–19. <https://doi.org/10.2174/1874609811003010003>
- Cruz-García, A., López-Saavedra, A., i Huertas, P. (2014). BRCA1 Accelerates CtIP-Mediated DNA-End Resection. *Cell Reports*, 9(2), 451–459. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2014.08.076>
- Curtis, H., i Crowley, C. (1963). Chromosome Aberrations in Liver Cells in Relation to the Somatic Mutation Theory of Aging. *Radiation Research*, 19(2), 337. <https://doi.org/10.2307/3571455>
- Curtis, H. J. (1963). Biological mechanisms underlying the aging process. *Science*, 141(3582), 686–694. <https://doi.org/10.1007/sl0869-007-9037-x>

D

- Dance, D., Christofides, S., Maidment, A. D., Mclean, I. D., i K.H., Ng. (2014). Diagnostic Radiology Physics: A handbook for teachers and students. *International Atomic Energy Agency*. ISBN: 978–92–131010–1
- Derheimer, F. A., i Kastan, M. B. (2010). Multiple roles of ATM in monitoring and maintaining DNA integrity. *FEBS Letters*, 584(17), 3675–3681. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2010.05.031>
- Deriano, L., i Roth, D. B. (2013). Modernizing the Nonhomologous End-Joining Repertoire: Alternative and Classical NHEJ Share the Stage. *Annual Review of Genetics*, 47(1), 433–455. <https://doi.org/10.1146/annurev-genet-110711-155540>

- Di Virgilio, M., Callen, E., Yamane, A., Zhang, W., Jankovic, M., Gitlin, A. D., ... Nussenzweig, M. C. (2013a). Rif1 Prevents Resection of DNA Breaks and Promotes Immunoglobulin Class Switching. *Science*, 339(6120), 711–715. <https://doi.org/10.1126/science.1230624>
- Difilippantonio, S., Gapud, E., Wong, N., Huang, C.-Y., Mahowald, G., Chen, H. T., ... Nussenzweig, A. (2008). 53BP1 facilitates long-range DNA end-joining during V(D)J recombination. *Nature*, 456(7221), 529–533. <https://doi.org/10.1038/nature07476>
- Doil, C., Mailand, N., Bekker-Jensen, S., Menard, P., Larsen, D. H., Pepperkok, R., ... Lukas, C. (2009). RNF168 Binds and Amplifies Ubiquitin Conjugates on Damaged Chromosomes to Allow Accumulation of Repair Proteins. *Cell*, 136(3), 435–446. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.12.041>
- Dollé, M. E. T., Giese, H., Hopkins, C. L., Martus, H.-J., Hausdorff, J. M., i Vijg, J. (1997). Rapid accumulation of genome rearrangements in liver but not in brain of old mice. *Nature Genetics*, 17(4), 431–434. <https://doi.org/10.1038/ng1297-431>
- Dollé, M. E. T., Snyder, W. K., Gossen, J. A., Lohman, P. H. M., i Vijg, J. (2000). Distinct spectra of somatic mutations accumulated with age in mouse heart and small intestine. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(15), 8403–8408. <https://doi.org/10.1073/pnas.97.15.8403>

E

- Escribano-Díaz, C., Orthwein, A., Fradet-Turcotte, A., Xing, M., Young, J. T. F., Tkáč, J., ... Durocher, D. (2013). A Cell Cycle-Dependent Regulatory Circuit Composed of 53BP1-RIF1 and BRCA1-CtIP Controls DNA Repair Pathway Choice. *Molecular Cell*, 49(5), 872–883. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2013.01.001>
- Espejel, S., Martín, M., Klatt, P., Martín-Caballero, J., Flores, J. M., i Blasco, M. A. (2004). Shorter telomeres, accelerated ageing and increased lymphoma in DNA-PKcs-deficient mice. *EMBO Reports*, 5(5), 503–509. <https://doi.org/10.1038/sj.embor.7400127>

F

- Fazel, R., Krumholz, H. M., Wang, Y., Ross, J. S., Chen, J., Ting, H. H., ... Nallamothu, B. K. (2009). Exposure to Low-Dose Ionizing Radiation from Medical Imaging Procedures. *New England Journal of Medicine*, 361(9), 849–857. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa0901249>

- Fell, V. L., i Schild-Poulter, C. (2015). The Ku heterodimer: Function in DNA repair and beyond. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 763, 15–29. <https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2014.06.002>
- Feng, L., Fong, K.-W., Wang, J., Wang, W., i Chen, J. (2013). RIF1 Counteracts BRCA1-mediated End Resection during DNA Repair. *Journal of Biological Chemistry*, 288(16), 11135–11143. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.457440>
- Fradet-Turcotte, A., Canny, M. D., Escibano-Díaz, C., Orthwein, A., Leung, C. C. Y., Huang, H., ... Durocher, D. (2013). 53BP1 is a reader of the DNA-damage-induced H2A Lys 15 ubiquitin mark. *Nature*, 499(7456), 50–54. <https://doi.org/10.1038/nature12318>
- Fraga, M. F., i Esteller, M. (2007). Epigenetics and aging: the targets and the marks. *Trends in Genetics*, 23(8), 413–418. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2007.05.008>
- Franken, N. A., ten Cate, R., Krawczyk, P. M., Stap, J., Haveman, J., Aten, J., i Barendsen, G. W. (2011). Comparison of RBE values of high-LET α -particles for the induction of DNA-DSBs, chromosome aberrations and cell reproductive death. *Radiation Oncology*, 6(1), 64. <https://doi.org/10.1186/1748-717X-6-64>
- Freitas, A. A., i de Magalhães, J. P. (2011). A review and appraisal of the DNA damage theory of ageing. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 728(1–2), 12–22. <https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2011.05.001>

G

- Garbe, J. C., Bhattacharya, S., Merchant, B., Bassett, E., Swisshelm, K., Feiler, H. S., ... Stampfer, M. R. (2009). Molecular Distinctions between Stasis and Telomere Attrition Senescence Barriers Shown by Long-term Culture of Normal Human Mammary Epithelial Cells. *Cancer Research*, 69(19), 7557–7568. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-09-0270>
- Garbe, J. C., Holst, C. R., Bassett, E., Tlsty, T. D., i Stampfer, M. R. (2007). Inactivation of p53 Function in Cultured Human Mammary Epithelial Cells Turns the Telomere-Length Dependent Senescence Barrier from Agonescence into Crisis. *Cell Cycle*, 6(15), 1927–1936. <https://doi.org/10.4161/cc.6.15.4519>
- Garbe, J. C., Pepin, F., Pelissier, F. A., Sputova, K., Fridriksdottir, A. J., Guo, D. E., ... LaBarge, M. A. (2012). Accumulation of Multipotent Progenitors with a Basal Differentiation Bias during Aging of Human Mammary Epithelia. *Cancer Research*, 72(14), 3687–3701. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-12-0157>

- Garbe, J. C., Vrba, L., Sputova, K., Fuchs, L., Novak, P., Brothman, A. R., ... Stampfer, M. R. (2014). Immortalization of normal human mammary epithelial cells in two steps by direct targeting of senescence barriers does not require gross genomic alterations. *Cell Cycle*, *13*(21), 3423–3435. <https://doi.org/10.4161/15384101.2014.954456>
- Garinis, G. A., van der Horst, G. T. J., Vijg, J., i H.J. Hoeijmakers, J. (2008). DNA damage and ageing: new-age ideas for an age-old problem. *Nature Cell Biology*, *10*(11), 1241–1247. <https://doi.org/10.1038/ncb1108-1241>
- Garm, C., Moreno-Villanueva, M., Bürkle, A., Petersen, I., Bohr, V. A., Christensen, K., i Stevnsner, T. (2013). Age and gender effects on DNA strand break repair in peripheral blood mononuclear cells. *Aging Cell*, *12*(1), 58–66. <https://doi.org/10.1111/accel.12019>
- Gensler, H. L., i Bernstein, H. (1981). DNA Damage as the Primary Cause of Aging. *The Quarterly Review of Biology*, *56*(3), 279–303. <https://doi.org/10.1086/412317>
- Goodarzi, A. A., i Jeggo, P. A. (2013). The repair and signalling responses to DNA double-strand breaks. In *Advances in Genetics*, *82*, 1–45. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-380860-8.00010-0>
- Gorbunova, V., i Seluanov, A. (2016). DNA double strand break repair, aging and the chromatin connection. *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, *788*, 2–6. <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2016.02.004>
- Gorbunova, V., Seluanov, A., Mao, Z., i Hine, C. (2007). Changes in DNA repair during aging. *Nucleic Acids Research*, *35*(22), 7466–7474. <https://doi.org/10.1093/nar/gkm756>
- Grawunder, U., Wilm, M., Wu, X., Kulesza, P., Wilson, T. E., Mann, M., i Lieber, M. R. (1997). Activity of DNA ligase IV stimulated by complex formation with XRCC4 protein in mammalian cells. *Nature*, *388*(6641), 492–495. <https://doi.org/10.1038/41358>
- Griffiths, A., Miller, J., Suzuki, D., Lewontin, R., Gelbart, W. (2000). An Introduction to Genetic Analysis. 7th edition. ISBN-10: 0-7167-3520-2
- Guleria, A., i Chandna, S. (2016). ATM kinase: Much more than a DNA damage responsive protein. *DNA Repair*, *39*, 1–20. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2015.12.009>

H

- Hamilton, M. L., Van Remmen, H., Drake, J. A., Yang, H., Guo, Z. M., Kewitt, K., ... Richardson, A. (2001). Does oxidative damage to DNA increase with age? *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *98*(18), 10469–10474. <https://doi.org/10.1073/pnas.171202698>

- Hammond, S. L., Ham, R. G., i Stampfer, M. R. (1984). Serum-free growth of human mammary epithelial cells: rapid clonal growth in defined medium and extended serial passage with pituitary extract. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 81(17), 5435–5439. <https://doi.org/10.1073/pnas.81.17.5435>
- Harding, S. M., i Bristow, R. G. (2012). Discordance between phosphorylation and recruitment of 53BP1 in response to DNA double-strand breaks. *Cell Cycle*, 11(7), 1432–1444. <https://doi.org/10.4161/cc.19824>
- Harman, D. (1956). Aging: A Theory Based on Free Radical and Radiation Chemistry. *Journal of Gerontology*, 11(3), 298–300. <https://doi.org/10.1093/geronj/11.3.298>
- Hashizume, R., Fukuda, M., Maeda, I., Nishikawa, H., Oyake, D., Yabuki, Y., ... Ohta, T. (2001). The RING Heterodimer BRCA1-BARD1 Is a Ubiquitin Ligase Inactivated by a Breast Cancer-derived Mutation. *Journal of Biological Chemistry*, 276(18), 14537–14540. <https://doi.org/10.1074/jbc.C000881200>
- Hassiotou, F., i Geddes, D. (2013). Anatomy of the human mammary gland: Current status of knowledge. *Clinical Anatomy*, 26(1), 29–48. <https://doi.org/10.1002/ca.22165>
- Hekimi, S., Lapointe, J., i Wen, Y. (2011). Taking a “good” look at free radicals in the aging process. *Trends in Cell Biology*, 21(10), 569–576. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2011.06.008>
- Hennighausen, L., i Robinson, G. W. (2005). Information networks in the mammary gland. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 6(9), 715–725. <https://doi.org/10.1038/nrm1714>
- Henshaw, P. S., Riley, E. F., i Stapleton, G. E. (1947). The Biologic Effects of Pile Radiations. *Radiology*, 49(3), 349–360. <https://doi.org/10.1148/49.3.349>
- Her, J., i Bunting, S. F. (2018). How cells ensure correct repair of DNA double-strand breaks. *Journal of Biological Chemistry*, 293(27), 10502–10511. <https://doi.org/10.1074/jbc.TM118.000371>
- Her, J., Soo Lee, N., Kim, Y., i Kim, H. (2016). Factors forming the BRCA1-A complex orchestrate BRCA1 recruitment to the sites of DNA damage. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 48(7), 658–664. <https://doi.org/10.1093/abbs/gmw047>
- Hernández, L., Terradas, M., Martín, M., Feijoo, P., Soler, D., Tusell, L., i Genescà, A. (2013). Increased Mammogram-Induced DNA Damage in Mammary Epithelial Cells Aged In Vitro. *PLoS ONE*, 8(5), e63052. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0063052>
- Heyer, W.-D., Ehmsen, K. T., i Liu, J. (2010). Regulation of Homologous Recombination in Eukaryotes. *Annual Review of Genetics*, 44(1), 113–139. <https://doi.org/10.1146/annurev-genet-051710-150955>

- Himmels, S.-F., i Sartori, A. A. (2016). Controlling DNA-End Resection: An Emerging Task for Ubiquitin and SUMO. *Frontiers in Genetics*, 7(AUG), 1–7. <https://doi.org/10.3389/fgene.2016.00152>
- Hoeijmakers, J. H. J. (2001). Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. *Nature*, 411(6835), 366–374. <https://doi.org/10.1038/35077232>
- Hoeijmakers, J. H. J. (2009). DNA Damage, Aging, and Cancer. *New England Journal of Medicine*, 361(15), 1475–1485. <https://doi.org/10.1056/NEJMra0804615>
- Hogg, M., Sauer-Eriksson, A. E., i Johansson, E. (2012). Promiscuous DNA synthesis by human DNA polymerase θ . *Nucleic Acids Research*, 40(6), 2611–2622. <https://doi.org/10.1093/nar/gkr1102>
- Höglund, E., Blomquist, E., Carlsson, J., i Stenerlöv, B. (2000). DNA damage induced by radiation of different linear energy transfer: initial fragmentation. *International Journal of Radiation Biology*, 76(4), 539–547. <https://doi.org/10.1080/095530000138556>
- Hsiao, K.-Y., i Mizzen, C. a. (2013). Histone H4 deacetylation facilitates 53BP1 DNA damage signaling and double-strand break repair. *Journal of Molecular Cell Biology*, 5(3), 157–165. <https://doi.org/10.1093/jmcb/mjs066>
- Huertas, P., i Jackson, S. P. (2009). Human CtIP Mediates Cell Cycle Control of DNA End Resection and Double Strand Break Repair. *Journal of Biological Chemistry*, 284(14), 9558–9565. <https://doi.org/10.1074/jbc.M808906200>
- Hunter, N., i Muirhead, C. R. (2009). Review of relative biological effectiveness dependence on linear energy transfer for low-LET radiations. *Journal of Radiological Protection*, 29(1), 5–21. <https://doi.org/10.1088/0952-4746/29/1/R01>
- Hustedt, N., i Durocher, D. (2017). The control of DNA repair by the cell cycle. *Nature Cell Biology*, 19(1), 1–9. <https://doi.org/10.1038/ncb3452>
- |
- Iliakis, G., Murmann, T., i Soni, A. (2015). Alternative end-joining repair pathways are the ultimate backup for abrogated classical non-homologous end-joining and homologous recombination repair: Implications for the formation of chromosome translocations. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 793, 166–175. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2015.07.001>
- Iliakis, G., Wang, H., Perrault, A. R., Boecker, W., Rosidi, B., Windhofer, F., ... Pantelias, G. (2004). Mechanisms of DNA double strand break repair and chromosome aberration formation. *Cytogenetic and Genome Research*, 104(1–4), 14–20. <https://doi.org/10.1159/000077461>

- Isono, M., Niimi, A., Oike, T., Hagiwara, Y., Sato, H., Sekine, R., ... Shibata, A. (2017). BRCA1 Directs the Repair Pathway to Homologous Recombination by Promoting 53BP1 Dephosphorylation. *Cell Reports*, 18(2), 520–532. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.12.042>
- Iyama, T., i Wilson, D. M. (2013). DNA repair mechanisms in dividing and non-dividing cells. *DNA Repair*, 12(8), 620–636. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2013.04.015>

J

- Jackson, S. P., i Bartek, J. (2009). The DNA-damage response in human biology and disease. *Nature*, 461(7267), 1071–1078. <https://doi.org/10.1038/nature08467>
- Jensen, R. B., Carreira, A., i Kowalczykowski, S. C. (2010). Purified human BRCA2 stimulates RAD51-mediated recombination. *Nature*, 467(7316), 678–683. <https://doi.org/10.1038/nature09399>
- Jette, N., i Lees-Miller, S. P. (2015). The DNA-dependent protein kinase: A multifunctional protein kinase with roles in DNA double strand break repair and mitosis. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, 117(2–3), 194–205. <https://doi.org/10.1016/j.pbiomolbio.2014.12.003>
- Joyce, N. C., Harris, D. L., i Zhu, C. C. (2011). Age-Related Gene Response of Human Corneal Endothelium to Oxidative Stress and DNA Damage. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 52(3), 1641–1649. <https://doi.org/10.1167/iovs.10-6492>
- Ju, Y.-J., Lee, K.-H., Park, J.-E., Yi, Y.-S., Yun, M.-Y., Ham, Y.-H., ... Park, G.-H. (2006). Decreased expression of DNA repair proteins Ku70 and Mre11 is associated with aging and may contribute to the cellular senescence. *Experimental & Molecular Medicine*, 38(6), 686–693. <https://doi.org/10.1038/emm.2006.81>
- Jungmichel, S., i Stucki, M. (2010). MDC1: The art of keeping things in focus. *Chromosoma*, 119(4), 337–349. <https://doi.org/10.1007/s00412-010-0266-9>

K

- Kaidi, A., Weinert, B. T., Choudhary, C., i Jackson, S. P. (2010). Human SIRT6 Promotes DNA End Resection Through CtIP Deacetylation. *Science*, 329(5997), 1348–1353. <https://doi.org/10.1126/science.1192049>
- Kakarougkas, A., Ismail, A., Katsuki, Y., Freire, R., Shibata, A., i Jeggo, P. A. (2013). Co-operation of BRCA1 and POH1 relieves the barriers posed by 53BP1 and RAP80 to resection. *Nucleic Acids Research*, 41(22), 10298–10311. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt802>

- Kalfalah, F., Seggewiß, S., Walter, R., Tigges, J., Moreno-Villanueva, M., Bürkle, A., ... Boege, F. (2015). Structural chromosome abnormalities, increased DNA strand breaks and DNA strand break repair deficiency in dermal fibroblasts from old female human donors. *Aging*, 7(2), 110–122. <https://doi.org/10.18632/aging.100723>
- Kato, K., Kuwabara, M., i Kashiwakura, I. (2011). The Influence of Gender- and Age-related Differences in the Radiosensitivity of Hematopoietic Progenitor Cells Detected in Steady-state Human Peripheral Blood. *Journal of Radiation Research*, 52(3), 293–299. <https://doi.org/10.1269/jrr.10142>
- Kent, T., Chandramouly, G., McDevitt, S. M., Ozdemir, A. Y., i Pomerantz, R. T. (2015). Mechanism of microhomology-mediated end-joining promoted by human DNA polymerase θ . *Nature Structural & Molecular Biology*, 22(3), 230–237. <https://doi.org/10.1038/nsmb.2961>
- Kent, T., Mateos-Gomez, P. A., Sfeir, A., i Pomerantz, R. T. (2016). Polymerase θ is a robust terminal transferase that oscillates between three different mechanisms during end-joining. *eLife*, 5(JUN), 1–25. <https://doi.org/10.7554/eLife.13740>
- Khanna, K. K., i Jackson, S. P. (2001). DNA double-strand breaks: signaling, repair and the cancer connection. *Nature Genetics*, 27(3), 247–254. <https://doi.org/10.1038/85798>
- Kirkwood, T. B. L. (2005). Understanding the Odd Science of Aging. *Cell*, 120(4), 437–447. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.01.027>
- Krestinina, L. Y., Preston, D. L., Ostroumova, E. V., Degteva, M. O., Ron, E., Vyushkova, O. V., ... Akleyev, A. V. (2005). Protracted Radiation Exposure and Cancer Mortality in the Techa River Cohort. *Radiation Research*, 164(5), 602–611. <https://doi.org/10.1667/RR3452.1>

L

- LaBarge, M. A., Garbe, J. C., i Stampfer, M. R. (2013). Processing of Human Reduction Mammoplasty and Mastectomy Tissues for Cell Culture. *Journal of Visualized Experiments*, (71), 1–7. <https://doi.org/10.3791/50011>
- Li, H., Vogel, H., Holcomb, V. B., Gu, Y., i Hasty, P. (2007). Deletion of Ku70, Ku80, or Both Causes Early Aging without Substantially Increased Cancer. *Molecular and Cellular Biology*, 27(23), 8205–8214. <https://doi.org/10.1128/MCB.00785-07>
- Li, X., Stith, C. M., Burgers, P. M., i Heyer, W.-D. (2009). PCNA Is Required for Initiation of Recombination-Associated DNA Synthesis by DNA Polymerase δ . *Molecular Cell*, 36(4), 704–713. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2009.09.036>

- Li, Z., Zhang, W., Chen, Y., Guo, W., Zhang, J., Tang, H., ... Mao, Z. (2016). Impaired DNA double-strand break repair contributes to the age-associated rise of genomic instability in humans. *Cell Death & Differentiation*, 23(11), 1765–1777. <https://doi.org/10.1038/cdd.2016.65>
- Lieber, M. R. (2010). The Mechanism of Double-Strand DNA Break Repair by the Nonhomologous DNA End-Joining Pathway. *Annual Review of Biochemistry*, 79(1), 181–211. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.052308.093131>
- Liu, J., Doty, T., Gibson, B., i Heyer, W.-D. (2010). Human BRCA2 protein promotes RAD51 filament formation on RPA-covered single-stranded DNA. *Nature Structural & Molecular Biology*, 17(10), 1260–1262. <https://doi.org/10.1038/nsmb.1904>
- Löbrich, M., i Jeggo, P. (2017). A Process of Resection-Dependent Nonhomologous End Joining Involving the Goddess Artemis. *Trends in Biochemical Sciences*, 42(9), 690–701. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2017.06.011>
- López-Otín, C., Blasco, M. A., Partridge, L., Serrano, M., i Kroemer, G. (2013). The Hallmarks of Aging. *Cell*, 153(6), 1194–1217. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.05.039>
- Lu, T., Pan, Y., Kao, S.-Y., Li, C., Kohane, I., Chan, J., i Yankner, B. A. (2004). Gene regulation and DNA damage in the ageing human brain. *Nature*, 429(6994), 883–891. <https://doi.org/10.1038/nature02661>

M

- Mäkinen, M., Hillukkala, T., Tuusa, J., Reini, K., Vaara, M., Huang, D., ... Syväoja, J. E. (2001). BRCT Domain-containing Protein TopBP1 Functions in DNA Replication and Damage Response. *Journal of Biological Chemistry*, 276(32), 30399–30406. <https://doi.org/10.1074/jbc.M102245200>
- Maloisel, L., Fabre, F., i Gangloff, S. (2008). DNA polymerase delta is preferentially recruited during homologous recombination to promote heteroduplex DNA extension. *Molecular and Cellular Biology*, 28(4), 1373–1382. <https://doi.org/10.1128/MCB.01651-07>
- Mandavilli, B. S., i Rao, K. S. (1996). Accumulation of DNA Damage in Aging Neurons Occurs Through a Mechanism Other than Apoptosis. *Journal of Neurochemistry*, 67(4), 1559–1565. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.1996.67041559.x>
- Manis, J. P., Morales, J. C., Xia, Z., Kutok, J. L., Alt, F. W., i Carpenter, P. B. (2004). 53BP1 links DNA damage-response pathways to immunoglobulin heavy chain class-switch recombination. *Nature Immunology*, 5(5), 481–487. <https://doi.org/10.1038/ni1067>

- Mao, Z., Bozzella, M., Seluanov, A., i Gorbunova, V. (2008). Comparison of nonhomologous end joining and homologous recombination in human cells. *DNA Repair*, 7(10), 1765–1771. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2008.06.018>
- Mateos-Gomez, P. A., Gong, F., Nair, N., Miller, K. M., Lazzarini-Denchi, E., i Sfeir, A. (2015). Mammalian polymerase θ promotes alternative NHEJ and suppresses recombination. *Nature*, 518(7538), 254–257. <https://doi.org/10.1038/nature14157>
- Mattioli, F., Vissers, J. H. A., van Dijk, W. J., Ikpa, P., Citterio, E., Vermeulen, W., ... Sixma, T. K. (2012). RNF168 Ubiquitinates K13-15 on H2A/H2AX to Drive DNA Damage Signaling. *Cell*, 150(6), 1182–1195. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.08.005>
- Mazin, A. V., Mazina, O. M., Bugreev, D. V., i Rossi, M. J. (2010). Rad54, the motor of homologous recombination. *DNA Repair*, 9(3), 286–302. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2009.12.006>
- Mazón, G., Mimitou, E. P., i Symington, L. S. (2010). SnapShot: Homologous recombination in DNA double-strand break repair. *Cell*, 142(4), 646, 646.e1. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.08.006>
- McCord, R. A., Michishita, E., Hong, T., Berber, E., Boxer, L. D., Kusumoto, R., ... Chua, K. F. (2009). SIRT6 stabilizes DNA-dependent Protein Kinase at chromatin for DNA double-strand break repair. *Aging*, 1(1), 109–121. <https://doi.org/10.18632/aging.100011>
- Mecocci, P., Fanó, G., Fulle, S., MacGarvey, U., Shinobu, L., Polidori, M. C., ... Beal, M. F. (1999). Age-dependent increases in oxidative damage to DNA, lipids, and proteins in human skeletal muscle. *Free Radical Biology & Medicine*, 26(3–4), 303–308. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(98\)00208-1](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(98)00208-1)
- Medina, D. (1996). The mammary gland: A unique organ for the study of development and tumorigenesis. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*, 1(1), 5–19. <https://doi.org/10.1007/BF02096299>
- Miller, K. M., Tjeertes, J. V., Coates, J., Legube, G., Polo, S. E., Britton, S., i Jackson, S. P. (2010). Human HDAC1 and HDAC2 function in the DNA-damage response to promote DNA nonhomologous end-joining. *Nature Structural & Molecular Biology*, 17(9), 1144–1151. <https://doi.org/10.1038/nsmb.1899>
- Mimitou, E. P., i Symington, L. S. (2010). Ku prevents Exo1 and Sgs1-dependent resection of DNA ends in the absence of a functional MRX complex or Sae2. *The EMBO Journal*, 29(19), 3358–3369. <https://doi.org/10.1038/emboj.2010.193>
- Moon, A. F., Pryor, J. M., Ramsden, D. A., Kunkel, T. A., Bebenek, K., i Pedersen, L. C. (2014). Sustained active site rigidity during synthesis by human DNA polymerase μ . *Nature Structural & Molecular Biology*, 21(3), 253–260. <https://doi.org/10.1038/nsmb.2766>

- Moskalev, A. A., Shaposhnikov, M. V., Plyusnina, E. N., Zhavoronkov, A., Budovsky, A., Yanai, H., i Fraifeld, V. E. (2013). The role of DNA damage and repair in aging through the prism of Koch-like criteria. *Ageing Research Reviews*, 12(2), 661–684. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2012.02.001>
- Mostoslavsky, R., Chua, K. F., Lombard, D. B., Pang, W. W., Fischer, M. R., Gellon, L., ... Alt, F. W. (2006). Genomic Instability and Aging-like Phenotype in the Absence of Mammalian SIRT6. *Cell*, 124(2), 315–329. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.11.044>
- Moynahan, M. E., Chiu, J. W., Koller, B. H., i Jasin, M. (1999). Brca1 Controls Homology-Directed DNA Repair. *Molecular Cell*, 4(4), 511–518. [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(00\)80202-6](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(00)80202-6)

N

- Nakamura, A. J., Rao, V. A., Pommier, Y., i Bonner, W. M. (2010). The complexity of phosphorylated H2AX foci formation and DNA repair assembly at DNA double-strand breaks. *Cell Cycle*, 9(2), 389–397. <https://doi.org/10.4161/cc.9.2.10475>
- Nakamura, K., Sakai, W., Kawamoto, T., Bree, R. T., Lowndes, N. F., Takeda, S., i Taniguchi, Y. (2006). Genetic dissection of vertebrate 53BP1: A major role in non-homologous end joining of DNA double strand breaks. *DNA Repair*, 5(6), 741–749. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2006.03.008>
- Nick McElhinny, S. A., Havener, J. M., Garcia-Diaz, M., Juárez, R., Bebenek, K., Kee, B. L., ... Ramsden, D. A. (2005). A Gradient of Template Dependence Defines Distinct Biological Roles for Family X Polymerases in Nonhomologous End Joining. *Molecular Cell*, 19(3), 357–366. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2005.06.012>
- Novak, P., Jensen, T. J., Garbe, J. C., Stampfer, M. R., i Futscher, B. W. (2009). Stepwise DNA Methylation Changes Are Linked to Escape from Defined Proliferation Barriers and Mammary Epithelial Cell Immortalization. *Cancer Research*, 69(12), 5251–5258. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-08-4977>

O

- Ochi, T., Blackford, A. N., Coates, J., Jhujh, S., Mehmood, S., Tamura, N., ... Jackson, S. P. (2015). PAXX, a paralog of XRCC4 and XLF, interacts with Ku to promote DNA double-strand break repair. *Science*, 347(6218), 185–188. <https://doi.org/10.1126/science.1261971>
- Opresko, P. L., Cheng, W.-H., von Kobbe, C., Harrigan, J. A., i Bohr, V. A. (2003). Werner syndrome and the function of the Werner protein; what they can teach us about the molecular aging process. *Carcinogenesis*, 24(5), 791–802. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgg034>

Orthwein, A., Noordermeer, S. M., Wilson, M. D., Landry, S., Enchev, R. I., Sherker, A., ... Durocher, D. (2015). A mechanism for the suppression of homologous recombination in G1 cells. *Nature*, *528*(7582), 422–426. <https://doi.org/10.1038/nature16142>

Ou, H.-L., i Schumacher, B. (2018). DNA damage responses and p53 in the aging process. *Blood*, *131*(5), 488–495. <https://doi.org/10.1182/blood-2017-07-746396>

P

Pandya, S., i Moore, R. G. (2011). Breast Development and Anatomy. *Clinical Obstetrics and Gynecology*, *54*(1), 91–95. <https://doi.org/10.1097/GRF.0b013e318207ffe9>

Panier, S., i Boulton, S. J. (2014). Double-strand break repair: 53BP1 comes into focus. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *15*(1), 7–18. <https://doi.org/10.1038/nrm3719>

Panier, S., i Durocher, D. (2013). Push back to respond better: regulatory inhibition of the DNA double-strand break response. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *14*(10), 661–672. <https://doi.org/10.1038/nrm3659>

Panier, S., Ichijima, Y., Fradet-Turcotte, A., Leung, C. C. Y., Kaustov, L., Arrowsmith, C. H., i Durocher, D. (2012). Tandem Protein Interaction Modules Organize the Ubiquitin-Dependent Response to DNA Double-Strand Breaks. *Molecular Cell*, *47*(3), 383–395. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2012.05.045>

Pannunzio, N. R., Watanabe, G., i Lieber, M. R. (2018). Nonhomologous DNA end-joining for repair of DNA double-strand breaks. *Journal of Biological Chemistry*, *293*(27), 10512–10523. <https://doi.org/10.1074/jbc.TM117.000374>

Paul, K., Wang, M., Mladenov, E., Bencsik-Theilen, A., Bednar, T., Wu, W., ... Iliakis, G. (2013). DNA Ligases I and III Cooperate in Alternative Non-Homologous End-Joining in Vertebrates. *PLoS ONE*, *8*(3), e59505. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0059505>

Paull, T. T. (2015). Mechanisms of ATM Activation. *Annual Review of Biochemistry*, *84*(1), 711–738. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-060614-034335>

Paull, T. T., Rogakou, E. P., Yamazaki, V., Kirchgessner, C. U., Gellert, M., i Bonner, W. M. (2000). A critical role for histone H2AX in recruitment of repair factors to nuclear foci after DNA damage. *Current Biology*, *10*(15), 886–895. [https://doi.org/10.1016/S0960-9822\(00\)00610-2](https://doi.org/10.1016/S0960-9822(00)00610-2)

Polato, F., Callen, E., Wong, N., Faryabi, R., Bunting, S., Chen, H.-T., ... Nussenzweig, A. (2014). CtIP-mediated resection is essential for viability and can operate independently of BRCA1. *The Journal of Experimental Medicine*, *211*(6), 1027–1036. <https://doi.org/10.1084/jem.20131939>

- Polo, S. E., i Jackson, S. P. (2011). Dynamics of DNA damage response proteins at DNA breaks: a focus on protein modifications. *Genes & Development*, 25(5), 409–433. <https://doi.org/10.1101/gad.2021311>
- Preston, D. L., Kitahara, C. M., Freedman, D. M., Sigurdson, A. J., Simon, S. L., Little, M. P., ... Linet, M. S. (2016). Breast cancer risk and protracted low-to-moderate dose occupational radiation exposure in the US Radiologic Technologists Cohort, 1983–2008. *British Journal of Cancer*, 115(9), 1105–1112. <https://doi.org/10.1038/bjc.2016.292>

R

- Ramsey, M. J., Moore, D. H., Briner, J. F., Lee, D. A., Olsen, L. A., Senft, J. R., i Tucker, J. D. (1995). The effects of age and lifestyle factors on the accumulation of cytogenetic damage as measured by chromosome painting. *Mutation Research/DNAging*, 338(1–6), 95–106. [https://doi.org/10.1016/0921-8734\(95\)00015-X](https://doi.org/10.1016/0921-8734(95)00015-X)
- Rappold, I., Iwabuchi, K., Date, T., i Chen, J. (2001). Tumor Suppressor p53 Binding Protein 1 (53BP1) Is Involved in DNA Damage–signaling Pathways. *The Journal of Cell Biology*, 153(3), 613–620. <https://doi.org/10.1083/jcb.153.3.613>
- Reczek, C. R., Szabolcs, M., Stark, J. M., Ludwig, T., i Baer, R. (2013). The interaction between CtIP and BRCA1 is not essential for resection-mediated DNA repair or tumor suppression. *The Journal of Cell Biology*, 201(5), 693–707. <https://doi.org/10.1083/jcb.201302145>
- Richardson, D. B., i 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), 649–656. <https://doi.org/10.1289/ehp.99107649>
- Rogakou, E. P., Boon, C., Redon, C., i Bonner, W. M. (1999). Megabase Chromatin Domains Involved in DNA Double-Strand Breaks in Vivo. *The Journal of Cell Biology*, 146(5), 905–916. <https://doi.org/10.1083/jcb.146.5.905>
- Rogakou, E. P., Pilch, D. R., Orr, A. H., Ivanova, V. S., i Bonner, W. M. (1998). DNA Double-stranded Breaks Induce Histone H2AX Phosphorylation on Serine 139. *Journal of Biological Chemistry*, 273(10), 5858–5868. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.10.5858>
- Romanov, S. R., Kozakiewicz, B. K., Holst, C. R., Stampfer, M. R., Haupt, L. M., i Tlsty, T. D. (2001). Normal human mammary epithelial cells spontaneously escape senescence and acquire genomic changes. *Nature*, 409(6820), 633–637. <https://doi.org/10.1038/35054579>

- Rothblum-Oviatt, C., Wright, J., Lefton-Greif, M. A., McGrath-Morrow, S. A., Crawford, T. O., i Lederman, H. M. (2016). Ataxia telangiectasia: a review. *Orphanet Journal of Rare Diseases*, 11(1), 159. <https://doi.org/10.1186/s13023-016-0543-7>
- Rothkamm, K., Barnard, S., Moquet, J., Ellender, M., Rana, Z., i Burdak-Rothkamm, S. (2015). DNA damage foci: meaning and significance. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 56(6), 491–504. <https://doi.org/10.1002/em.21944>
- Rübe, C. E., Fricke, A., Widmann, T. A., Fürst, T., Madry, H., Pfreundschuh, M., i Rübe, C. (2011). Accumulation of DNA Damage in Hematopoietic Stem and Progenitor Cells during Human Aging. *PLoS ONE*, 6(3), e17487. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0017487>

S

- Sallmyr, A., i Tomkinson, A. E. (2018). Repair of DNA double-strand breaks by mammalian alternative end-joining pathways. *Journal of Biological Chemistry*, 293(27), 10536–10546. <https://doi.org/10.1074/jbc.TM117.000375>
- San Filippo, J., Sung, P., i Klein, H. (2008). Mechanism of Eukaryotic Homologous Recombination. *Annual Review of Biochemistry*, 77(1), 229–257. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.77.061306.125255>
- Sartori, A. A., Lukas, C., Coates, J., Mistrik, M., Fu, S., Bartek, J., ... Jackson, S. P. (2007). Human CtIP promotes DNA end resection. *Nature*, 450(7169), 509–514. <https://doi.org/10.1038/nature06337>
- Sasaki, T., Maier, B., Bartke, A., i Scoble, H. (2006). Progressive loss of SIRT1 with cell cycle withdrawal. *Aging Cell*, 5(5), 413–422. <https://doi.org/10.1111/j.1474-9726.2006.00235.x>
- Satoh, A., Brace, C. S., Rensing, N., Cliften, P., Wozniak, D. F., Herzog, E. D., ... Imai, S. (2013). Sirt1 Extends Life Span and Delays Aging in Mice through the Regulation of Nk2 Homeobox 1 in the DMH and LH. *Cell Metabolism*, 18(3), 416–430. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2013.07.013>
- Savage, K. I., i Harkin, D. P. (2015). BRCA1, a ‘complex’ protein involved in the maintenance of genomic stability. *The FEBS Journal*, 282(4), 630–646. <https://doi.org/10.1111/febs.13150>
- Schultz, L. B., Chehab, N. H., Malikzay, A., i Halazonetis, T. D. (2000). p53 Binding Protein 1 (53BP1) Is an Early Participant in the Cellular Response to DNA Double-Strand Breaks. *The Journal of Cell Biology*, 151(7), 1381–1390. <https://doi.org/10.1083/jcb.151.7.1381>

- Schuster, B., Ellmann, A., Mayo, T., Auer, J., Haas, M., Hecht, M., ... Distel, L. V. (2018). Rate of individuals with clearly increased radiosensitivity rise with age both in healthy individuals and in cancer patients. *BMC Geriatrics*, 18(1), 105. <https://doi.org/10.1186/s12877-018-0799-y>
- Schwertman, P., Bekker-Jensen, S., i Mailand, N. (2016). Regulation of DNA double-strand break repair by ubiquitin and ubiquitin-like modifiers. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 17(6), 379–394. <https://doi.org/10.1038/nrm.2016.58>
- Sedelnikova, O. A., Horikawa, I., Redon, C., Nakamura, A., Zimonjic, D. B., Popescu, N. C., i Bonner, W. M. (2008). Delayed kinetics of DNA double-strand break processing in normal and pathological aging. *Aging Cell*, 7(1), 89–100. <https://doi.org/10.1111/j.1474-9726.2007.00354.x>
- Sedelnikova, O. A., Horikawa, I., Zimonjic, D. B., Popescu, N. C., Bonner, W. M., i Barrett, J. C. (2004). Senescing human cells and ageing mice accumulate DNA lesions with unrepairable double-strand breaks. *Nature Cell Biology*, 6(2), 168–170. <https://doi.org/10.1038/ncb1095>
- Seluanov, A., Danek, J., Hause, N., i Gorbunova, V. (2007). Changes in the level and distribution of Ku proteins during cellular senescence. *DNA Repair*, 6(12), 1740–1748. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2007.06.010>
- Seluanov, A., Mittelman, D., Pereira-Smith, O. M., Wilson, J. H., i Gorbunova, V. (2004). DNA end joining becomes less efficient and more error-prone during cellular senescence. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(20), 7624–7629. <https://doi.org/10.1073/pnas.0400726101>
- Sen, P., Shah, P. P., Nativio, R., i Berger, S. L. (2016). Epigenetic Mechanisms of Longevity and Aging. *Cell*, 166(4), 822–839. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.07.050>
- Sfeir, A., i Symington, L. S. (2015). Microhomology-mediated end joining: a back-up survival mechanism or dedicated pathway? *Trends in Biochemical Sciences*, 40(11), 701–714. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2015.08.006>
- Sharma, P. M., Ponnaiya, B., Taveras, M., Shuryak, I., Turner, H., i Brenner, D. J. (2015). High Throughput Measurement of γ H2AX DSB Repair Kinetics in a Healthy Human Population. *PLOS ONE*, 10(3), e0121083. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0121083>
- Sharma, S. (2007). Age-related nonhomologous end joining activity in rat neurons. *Brain Research Bulletin*, 73(1–3), 48–54. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2007.02.001>
- Shibata, A., Conrad, S., Birraux, J., Geuting, V., Barton, O., Ismail, A., ... Jeggo, P. A. (2011). Factors determining DNA double-strand break repair pathway choice in G2 phase. *The EMBO Journal*, 30(6), 1079–1092. <https://doi.org/10.1038/emboj.2011.27>

- Shibata, A., Moiani, D., Arvai, A. S., Perry, J., Harding, S. M., Genois, M.-M., ... Tainer, J. A. (2014). DNA Double-Strand Break Repair Pathway Choice Is Directed by Distinct MRE11 Nuclease Activities. *Molecular Cell*, 53(1), 7–18. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2013.11.003>
- Shiloh, Y. (2001). ATM (ataxia telangiectasia mutated): expanding roles in the DNA damage response and cellular homeostasis. *Biochemical Society Transactions*, 29(6), 661–666. <https://doi.org/10.1042/bst0290661>
- Shiloh, Y. (2003). ATM and related protein kinases: safeguarding genome integrity. *Nature Reviews Cancer*, 3(3), 155–168. <https://doi.org/10.1038/nrc1011>
- Siddiqui, M. S., François, M., Fenech, M. F., i Leifert, W. R. (2015). Persistent γ H2AX: A promising molecular marker of DNA damage and aging. *Mutation Research - Reviews in Mutation Research*, 766, 1–19. <https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2015.07.001>
- Silver, D. P., i Livingston, D. M. (2012). Mechanisms of BRCA1 Tumor Suppression. *Cancer Discovery*, 2(8), 679–684. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-12-0221>
- Simsek, D., Brunet, E., Wong, S. Y.-W., Katal, 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. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002080>
- Simsek, D., i Jasin, M. (2010). Alternative end-joining is suppressed by the canonical NHEJ component Xrcc4–ligase IV during chromosomal translocation formation. *Nature Structural & Molecular Biology*, 17(4), 410–416. <https://doi.org/10.1038/nsmb.1773>
- Soler, D., Genescà, A., Arnedo, G., Egozcue, J., i Tusell, L. (2005). Telomere dysfunction drives chromosomal instability in human mammary epithelial cells. *Genes, Chromosomes and Cancer*, 44(4), 339–350. <https://doi.org/10.1002/gcc.20244>
- Solinger, J. A., Kiianitsa, K., i Heyer, W.-D. (2002). Rad54, a Swi2/Snf2-like Recombinational Repair Protein, Disassembles Rad51:dsDNA Filaments. *Molecular Cell*, 10(5), 1175–1188. [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(02\)00743-8](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(02)00743-8)
- Sommer, M., Poliak, N., Upadhyay, S., Ratovitski, E., Nelkin, B. D., Donehower, L. A., i Sidransky, D. (2006). DeltaNp63alpha overexpression induces downregulation of Sirt1 and an accelerated aging phenotype in the mouse. *Cell Cycle*, 5(17), 2005–2011. <https://doi.org/10.4161/cc.5.17.3194>
- Stampfer, M., Hallowes, R. C., i Hackett, A. J. (1980). Growth of normal human mammary cells in culture. *In Vitro*, 16(5), 415–425.

- Stampfer, M. R. (1982). Cholera toxin stimulation of human mammary epithelial cells in culture. *In Vitro*, 18(6), 531–537.
- Stampfer, M. R., i Bartley, J. C. (1985). Induction of transformation and continuous cell lines from normal human mammary epithelial cells after exposure to benzo[a]pyrene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 82(8), 2394–2398.
- Stampfer, M. R., LaBarge, M. A., i Garbe, J. C. (2013). An Integrated Human Mammary Epithelial Cell Culture System for Studying Carcinogenesis and Aging. In *Cell and Molecular Biology of Breast Cancer* (pp. 323–361). https://doi.org/10.1007/978-1-62703-634-4_15
- Stenerlöv, B., Höglund, E., Carlsson, J., i Blomquist, E. (2000). Rejoining of DNA fragments produced by radiations of different linear energy transfer. *International Journal of Radiation Biology*, 76(4), 549–557. <https://doi.org/10.1080/095530000138565>
- Stewart, G. S., Panier, S., Townsend, K., Al-Hakim, A. K., Kolas, N. K., Miller, E. S., ... Durocher, D. (2009). The RIDDLE Syndrome Protein Mediates a Ubiquitin-Dependent Signaling Cascade at Sites of DNA Damage. *Cell*, 136(3), 420–434. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.12.042>
- Stucki, M., Clapperton, J. A., Mohammad, D., Yaffe, M. B., Smerdon, S. J., i Jackson, S. P. (2005). MDC1 directly binds phosphorylated histone H2AX to regulate cellular responses to DNA double-strand breaks. *Cell*, 123(7), 1213–1226. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.09.038>
- Sukup-Jackson, M. R., Kiraly, O., Kay, J. E., Na, L., Rowland, E. A., Winther, K. E., ... Engelward, B. P. (2014). Rosa26-GFP Direct Repeat (RaDR-GFP) Mice Reveal Tissue- and Age-Dependence of Homologous Recombination in Mammals In Vivo. *PLoS Genetics*, 10(6), e1004299. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1004299>
- Sulli, G., Di Micco, R., i di Fagagna, F. d'Adda. (2012). Crosstalk between chromatin state and DNA damage response in cellular senescence and cancer. *Nature Reviews Cancer*, 12(10), 709–720. <https://doi.org/10.1038/nrc3344>
- Suwaki, N., Klare, K., i Tarsounas, M. (2011). RAD51 paralogs: Roles in DNA damage signalling, recombinational repair and tumorigenesis. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 22(8), 898–905. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2011.07.019>
- Sy, S. M. H., Huen, M. S. Y., i Chen, J. (2009). PALB2 is an integral component of the BRCA complex required for homologous recombination repair. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(17), 7155–7160. <https://doi.org/10.1073/pnas.0811159106>
- Symington, L. S. (2016). Mechanism and regulation of DNA end resection in eukaryotes. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 51(3), 195–212. <https://doi.org/10.3109/10409238.2016.1172552>

Szilard, L. (1959). On the nature of the aging process. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 45(1), 30–45.

T

- Talens, R. P., Christensen, K., Putter, H., Willemsen, G., Christiansen, L., Kremer, D., ... Heijmans, B. T. (2012). Epigenetic variation during the adult lifespan: cross-sectional and longitudinal data on monozygotic twin pairs. *Aging Cell*, 11(4), 694–703. <https://doi.org/10.1111/j.1474-9726.2012.00835.x>
- Taneja, N., Davis, M., Choy, J. S., Beckett, M. A., Singh, R., Kron, S. J., i Weichselbaum, R. R. (2004). Histone H2AX Phosphorylation as a Predictor of Radiosensitivity and Target for Radiotherapy. *Journal of Biological Chemistry*, 279(3), 2273–2280. <https://doi.org/10.1074/jbc.M310030200>
- Tang, J., Cho, N. W., Cui, G., Manion, E. M., Shanbhag, N. M., Botuyan, M. V., ... Greenberg, R. A. (2013). Acetylation limits 53BP1 association with damaged chromatin to promote homologous recombination. *Nature Structural i Molecular Biology*, 20(3), 317–325. <https://doi.org/10.1038/nsmb.2499>
- Titus, S., Li, F., Stobezki, R., Akula, K., Unsal, E., Jeong, K., ... Oktay, K. (2013). Impairment of BRCA1-Related DNA Double-Strand Break Repair Leads to Ovarian Aging in Mice and Humans. *Science Translational Medicine*, 5(172), 172ra21. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3004925>
- Tlsty, T. D., Romanov, S. R., Kozakiewicz, B. K., Holst, C. R., Haupt, L. M., i Crawford, Y. G. (2001). Loss of chromosomal integrity in human mammary epithelial cells subsequent to escape from senescence. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*, 6(2), 235–243. <https://doi.org/10.1023/A:1011369026168>
- 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*, 110(19), 7720–7725. <https://doi.org/10.1073/pnas.1213431110>
- Tucker, J. D., Spruill, M. D., Ramsey, M. J., Director, A. D., i Nath, J. (1999). Frequency of spontaneous chromosome aberrations in mice: effects of age. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 425(1), 135–141. [https://doi.org/10.1016/S0027-5107\(99\)00036-6](https://doi.org/10.1016/S0027-5107(99)00036-6)

V

- Vaidya, A., Mao, Z., Tian, X., Spencer, B., Seluanov, A., i Gorbunova, V. (2014). Knock-In Reporter Mice Demonstrate that DNA Repair by Non-homologous End Joining Declines with Age. *PLoS Genetics*, *10*(7), e1004511. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1004511>
- Vignard, J., Mirey, G., i Salles, B. (2013). Ionizing-radiation induced DNA double-strand breaks: A direct and indirect lighting up. *Radiotherapy and Oncology*, *108*(3), 362–369. <https://doi.org/10.1016/j.radonc.2013.06.013>
- Vijg, J. (2000). Somatic mutations and aging: a re-evaluation. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, *447*(1), 117–135. [https://doi.org/10.1016/S0027-5107\(99\)00202-X](https://doi.org/10.1016/S0027-5107(99)00202-X)
- Vijg, J. (2007). *Aging of the genome: The dual role of DNA in life and death*. 1st edition. ISBN 978-0-19-856922-0
- Vijg, J., i Dollé, M. E. T. (2002). Large genome rearrangements as a primary cause of aging. *Mechanisms of Ageing and Development*, *123*(8), 907–915. [https://doi.org/10.1016/S0047-6374\(02\)00028-3](https://doi.org/10.1016/S0047-6374(02)00028-3)
- Vijg, J., i Montagna, C. (2017). Genome instability and aging: Cause or effect? *Translational Medicine of Aging*, *1*, 5–11. <https://doi.org/10.1016/j.tma.2017.09.003>
- Vijg, J., i Suh, Y. (2013). Genome Instability and Aging. *Annual Review of Physiology*, *75*(1), 645–668. <https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-030212-183715>
- Visvader, J. E., i Stingl, J. (2014). Mammary stem cells and the differentiation hierarchy: current status and perspectives. *Genes & Development*, *28*(11), 1143–1158. <https://doi.org/10.1101/gad.242511.114>
- Vorobtsova, I., Semenov, A., Timofeyeva, N., Kanayeva, A., i Zvereva, I. (2001). An investigation of the age-dependency of chromosome abnormalities in human populations exposed to low-dose ionising radiation. *Mechanisms of Ageing and Development*, *122*(13), 1373–1382. [https://doi.org/10.1016/S0047-6374\(01\)00275-5](https://doi.org/10.1016/S0047-6374(01)00275-5)
- Vyjayanti, V. N., i Rao, K. S. (2006). DNA double strand break repair in brain: Reduced NHEJ activity in aging rat neurons. *Neuroscience Letters*, *393*(1), 18–22. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2005.09.053>

W

- Wang, B., Matsuoka, S., Ballif, B. A., Zhang, D., Smogorzewska, A., Gygi, S. P., i Elledge, S. J. (2007). Abraxas and RAP80 Form a BRCA1 Protein Complex Required for the DNA Damage Response. *Science*, 316(5828), 1194–1198. <https://doi.org/10.1126/science.1139476>
- Wang, H., Perrault, A. R., Takeda, Y., Qin, W., Wang, H., i Iliakis, G. (2003). Biochemical evidence for Ku-independent backup pathways of NHEJ. *Nucleic Acids Research*, 31(18), 5377–5388. <https://doi.org/10.1093/nar/gkg728>
- Ward, I. M., Reina-San-Martin, B., Olaru, A., Minn, K., Tamada, K., Lau, J. S., ... Chen, J. (2004). 53BP1 is required for class switch recombination. *The Journal of Cell Biology*, 165(4), 459–464. <https://doi.org/10.1083/jcb.200403021>
- West, R. B., Yaneva, M., i Lieber, M. R. (1998). Productive and Nonproductive Complexes of Ku and DNA-Dependent Protein Kinase at DNA Termini. *Molecular and Cellular Biology*, 18(10), 5908–5920. <https://doi.org/10.1128/MCB.18.10.5908>
- White, R. R., Sung, P., Vestal, C. G., Benedetto, G., Cornelio, N., i Richardson, C. (2013). Double-Strand Break Repair by Interchromosomal Recombination: An In Vivo Repair Mechanism Utilized by Multiple Somatic Tissues in Mammals. *PLoS ONE*, 8(12), e84379. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0084379>
- White, R. R., i Vijg, J. (2016). Do DNA Double-Strand Breaks Drive Aging? *Molecular Cell*, 63(5), 729–738. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2016.08.004>
- Wu, L., i Hickson, I. D. (2003). The Bloom's syndrome helicase suppresses crossing over during homologous recombination. *Nature*, 426(6968), 870–874. <https://doi.org/10.1038/nature02253>
- Wyatt, D. W., Feng, W., Conlin, M. P., Yousefzadeh, M. J., Roberts, S. A., Mieczkowski, P., ... Ramsden, D. A. (2016). Essential Roles for Polymerase θ -Mediated End Joining in the Repair of Chromosome Breaks. *Molecular Cell*, 63(4), 662–673. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2016.06.020>

X

- Xing, M., Yang, M., Huo, W., Feng, F., Wei, L., Jiang, W., ... Xu, D. (2015). Interactome analysis identifies a new paralogue of XRCC4 in non-homologous end joining DNA repair pathway. *Nature Communications*, 6(1), 6233. <https://doi.org/10.1038/ncomms7233>

Y

- Yousefzadeh, M. J., i Wood, R. D. (2013). DNA polymerase POLQ and cellular defense against DNA damage. *DNA Repair*, 12(1), 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2012.10.004>
- Yu, X., i Chen, J. (2004). DNA Damage-Induced Cell Cycle Checkpoint Control Requires CtIP, a Phosphorylation-Dependent Binding Partner of BRCA1 C-Terminal Domains. *Molecular and Cellular Biology*, 24(21), 9478–9486. <https://doi.org/10.1128/MCB.24.21.9478-9486.2004>

Z

- Zhang, F., Ma, J., Wu, J., Ye, L., Cai, H., Xia, B., i Yu, X. (2009). PALB2 Links BRCA1 and BRCA2 in the DNA-Damage Response. *Current Biology*, 19(6), 524–529. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2009.02.018>
- Zhang, Y., i Jasin, M. (2011). An essential role for CtIP in chromosomal translocation formation through an alternative end-joining pathway. *Nature Structural & Molecular Biology*, 18(1), 80–84. <https://doi.org/10.1038/nsmb.1940>
- Zimmermann, M., i de Lange, T. (2014). 53BP1: pro choice in DNA repair. *Trends in Cell Biology*, 24(2), 108–117. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2013.09.003>
- Zimmermann, M., Lottersberger, F., Buonomo, S. B., Sfeir, A., i de Lange, T. (2013). 53BP1 Regulates DSB Repair Using Rif1 to Control 5' End Resection. *Science*, 339(6120), 700–704. <https://doi.org/10.1126/science.1231573>



UAB

Universitat Autònoma
de Barcelona